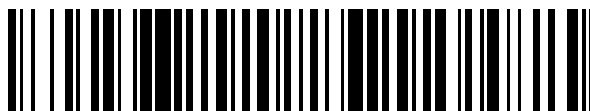


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 066**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08733324 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2142673**

54 Título: **Enzimas y complejos de ácidos nucleicos y métodos para su uso**

30 Prioridad:

05.04.2007 AU 2007901833 P

05.04.2007 US 697021

05.04.2007 US 910427 P

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

11.10.2013

73 Titular/es:

**SPEEDX PTY LTD (100.0%)
Suite G16, National Innovation Centre, Australian
Technology Park, 4 Cornwallis St.
Eveleigh, NSW 2015, AU**

72 Inventor/es:

**TODD, ALISON VELYIAN;
MOKANY, ELISA;
DOAN, TRAM BICH;
YOUNG, PAUL EAN y
SWAIN, HELEN ANNE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 066 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 y complejos de ácidos nucleicos y métodos para su uso

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a métodos que utilizan complejos de ácidos nucleicos multi-componente (MNA). Los complejos MNA pueden ser enzimas activas (por ejemplo, MNAzimas incluyendo apta-MNAzimas) con actividad modificadora tal como actividad ligasa o de escisión. Además, la invención se refiere a cascadas que usan MNAzimas y también pueden incluir una o más ADNzimas. La invención también se refiere a métodos que usan estas cascadas para la identificación, detección y cuantificación de dianas.

Antecedentes de la Invención

10 Varias publicaciones, que pueden incluir patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos especializados, se citan a lo largo de esta especificación en paréntesis, y las citaciones completas de cada uno pueden encontrarse al final de la especificación.

15 Además de sus funciones evolutivas optimizadas, las propiedades físicas y funcionales extraordinarias de los ácidos nucleicos proporcionan la oportunidad de una plétora de nuevos dispositivos y métodos biomoleculares. Los ácidos nucleicos de diseño se han contemplado para entidades terapéuticas, biosensores, dispositivos a nano-escala y herramientas para la computación molecular. Los métodos explotan las características del ADN respecto a auto-ensamblaje, electro-conductividad, elementos de información, amplificación, cambio, detección molecular y actividad catalítica. Además, como el ADN es robusto, estable y termoestable, proporciona un material ideal para la ingeniería molecular de dispositivos mecánicos o computacionales.

20 Los ácidos nucleicos monocatenarios, tales como ADN y ARN, tienen la capacidad de plegarse en estructuras tridimensionales complejas que pueden funcionar como receptores altamente específicos (por ejemplo, aptámeros) y catalizadores (por ejemplo, ribozimas, ADNzimas). Además, el requerimiento de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico para la hibridación forma la base para un amplio rango de técnicas, que permiten la detección de dianas (por ejemplo, análisis con micromatrices, transferencia Northern o transferencia Southern), y/o la amplificación de dianas (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa). Además, la hibridación proporciona la base para la construcción a nano-escala de ácidos nucleicos y para las estrategias computacionales basadas en ADN.

25 En los últimos 20 años se ha descubierto una amplia variedad de moléculas de ácido nucleico, con actividad enzimática o catalítica. Las enzimas de ARN ("ribozimas") aparecen en la naturaleza pero pueden prepararse por ingeniería para reconocer y modificar específicamente un sustrato de ARN diana (Haseloff y Gerlach, 1988). Las técnicas de desarrollo *in vitro* han facilitado el descubrimiento y desarrollo de muchos más ácidos nucleicos catalíticos, incluyendo ácidos desoxirribonucleicos frecuentemente referidos como "enzimas de ADN" o "ADNzimas" (revisado Emillson y Breaker, 2002). Se han descubierto ADNzimas y/o ribozimas desarrolladas *in vitro* que tienen la capacidad de catalizar un rango extenso de reacciones incluyendo, pero no limitado a, escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactor, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcohol, reducción de aldehído, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina o escisión fosforamidato (revisado Silverman, 2007)

35 En particular, se han caracterizado ADNzimas y ribozimas que escinden específicamente distintas secuencias de ácidos nucleicos después de hibridar mediante emparejamiento de bases de Watson Crick. Las ADNzimas son capaces de escindir bien moléculas de ARN (Breaker y Joyce, 1994; Santoro y Joyce, 1997; Santoro y Joyce, 1998) o ADN (Carmi *et al.*, 1996). Las ribozimas también son capaces de escindir secuencias diana tanto de ARN (Haseloff y Gerlach, 1988) como de ADN (Raillard y Joyce, 1996).

40 Las ADNzimas "10:23" y "8:17" son capaces de escindir sustratos de ácido nucleico en enlaces fosfodiéster de ARN específicos. Estas ADNzimas escinden las uniones fosfodiéster nativas 3'-5' para crear productos de reacción que tienen grupos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5' (Santoro y Joyce, 1997; revisado Emillson y Breaker, 2002).

45 También se han caracterizado ADNzimas que ligan específicamente distintas secuencias de ácido nucleico después de hibridar con dos ácidos nucleicos sustrato independientes. Las desoxiribozimas específicas (ADNzimas) pueden ligar productos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5' y crear uniones 2'-5' no nativas. Los ejemplos de dichas ADNzimas incluyen las ligasas "7Z81" y "7Z48" (Prior *et al.*, 2004) así como la ADNzima ligasa "7Q10" (Flynn-Charlebois *et al.*, 2003) Se han descrito otras ADNzimas (Coppins y Silverman, 2004) que pueden ligar productos diol 2', 3' y 5'-trifosfato y crear uniones 3'-5' nativas. Tabhor *et al.* (2006) produjeron una ligasa desoxiribozima binaria por ingeniería fusionando dos dominios catalíticos a través de una estructura tallo común.

Varios ácidos nucleicos catalíticos tienen estructuras básicas similares con múltiples dominios incluyendo un dominio catalítico conservado ("núcleo catalítico") flanqueado por dos dominios de unión a sustrato no conservados ("brazos"), que reconocen y se hibridan específicamente con el sustrato. Los ejemplos de ácidos nucleicos con esta estructura básica incluyen, pero no están limitados a, la ribozima de cabeza de martillo, las ADNzimas 10:23 y 8:17, las ADNzimas ligasas "7Z81", "7Z48" y "7Q10", la ADNzima "UV1C" de fotoreversión de dímeros de timina y la ADNzima "DAB22" formadora de enlaces carbono-carbono. Hasta la fecha, los ácidos nucleicos catalíticos son típicamente uni-moleculares aunque se conocen ejemplos de ácidos nucleicos catalíticos con más de un componente pero éstos requieren un procesamiento por ingeniería extenso (Tabor *et al.*, 2006, Kurata *et al.*, 2000).

Se ha mostrado que los ácidos nucleicos catalíticos sólo toleran determinadas modificaciones en el área que forma el núcleo catalítico (Perreault *et al.*, 1990; Perreault *et al.*, 1991; Zaborowska *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2004; Silverman, 2004). Dependiendo de la astringencia de las condiciones de reacción, puede tolerarse algún grado de emparejamiento erróneo en los brazos del sustrato. Sin embargo, el requerimiento para el emparejamiento de bases de Watson Crick es lo suficientemente estricto como para haber permitido el desarrollo de protocolos que usan ácidos nucleicos catalíticos para facilitar la discriminación de secuencias muy relacionadas (Cairns *et al.*, 2000) (WO 99/50452).

Las tecnologías de amplificación y detección de dianas, tales como PCR, se han usado ampliamente en investigación y/o diagnóstico clínico. Sin embargo, a pesar de su potencia, cada una tiene desventajas inherentes. Todas requieren el uso de enzimas proteicas (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa y/o ligasa). La inclusión de enzimas proteicas incrementa la complejidad y coste de la fabricación de los reactivos y disminuye la vida a temperatura ambiente de los kits que contienen los reactivos. Otros retos técnicos asociados incluyen la contaminación por replicones (amplicones diana) de reacciones previas que da lugar a una señal de falso positivo y/o señal de fondo causada por la replicación de secuencias de cebador (dímeros de cebador) o fondo causada por la ligación independiente de diana.

Las enzimas de ácidos nucleicos y las cascadas de enzimas de ácidos nucleicos se han considerado para un rango de aplicaciones biotecnológicas, especialmente en diagnóstico. Podrían permitir la detección de proteínas y ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades facilitando la amplificación de la señal.

Varios grupos han indicado el uso de ácidos nucleicos catalíticos para la detección de dianas de ácido nucleico y otros análisis con lecturas colorimétricas (Elghanian *et al.*, 1997, Mirkin *et al.*, 1996, y Liu y Lu, 2004). Los ejemplos de cascadas de amplificación de la señal, que usan ácidos nucleicos catalíticos uni-moleculares, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Paul y Joyce (2004) describieron una cascada de replicación mediada por una ribozima con actividad ligasa. En otra estrategia, una cascada de amplificación de la señal usó dos ADNzimas inactivas, circularizadas 10:23 que fueron capaces de activarse entre sí por escisión cruzada que resulta en linealización (Levy y Ellington, 2003).

Existe una necesidad en curso en la técnica para la detección de dianas, en particular la detección usando sistemas de amplificación tales como cascadas, por ejemplo, sistemas de detección que implican cascadas que comprenden una pluralidad de enzimas de ácidos nucleicos y en particular al menos una enzima de ácidos nucleicos multicomponente (MNAzima). La presente descripción proporciona métodos de detección que implican cascadas de enzimas de ácidos nucleicos que incorporan al menos una enzima de ácidos nucleicos con actividad ligasa. Además, el uso de enzimas de ácidos nucleicos con actividad ligasa permite la formación de componentes para complejos de ácidos nucleicos, tal como facilitadores del ensamblaje, partzimas, sustratos, ADNzimas o componentes de éstos.

Resumen de la Invención

La invención proporciona el uso de una enzima de ácidos nucleicos multi-componente con actividad ligasa (MNAzima ligasa) para ligar dos sustratos en el que dichos sustratos son ligados por dicha MNAzima ligasa sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje de la MNAzima, para formar un producto después del reclutamiento de dichos sustratos por los brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa, en el que dicho producto se asocia con los componentes de al menos un complejo de ácidos nucleicos.

En un aspecto de la descripción se proporciona un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

(a) proporcionar al menos dos o más componentes oligonucleotídicos y al menos un sustrato de al menos un primer complejo de ácidos nucleicos en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico son capaces de auto-ensamblarse en presencia de una diana para formar al menos una primera enzima de ácidos nucleicos que comprende una enzima de ácidos nucleicos multi-componente catalíticamente activa con actividad ligasa (MNAzima ligasa),

(b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos y al menos un sustrato con una muestra que contiene potencialmente la al menos una diana en condiciones que permitan:

(1) el auto-ensamblaje de dicha al menos una MNAzima ligasa catalíticamente activa y

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

(c) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha al menos una MNAzima ligasa, en el que la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha al menos una diana.

En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para la detección de una diana que comprende

5 a) proporcionar un primer complejo de ácidos nucleicos que comprende componentes que requieren la asociación con dicha diana para facilitar la formación de una primera enzima de ácidos nucleicos, en el que dicho primer complejo de ácidos nucleicos comprende además al menos un sustrato, y

b) proporcionar al menos un componente de un segundo complejo de ácidos nucleicos capaz de asociarse con un producto de una reacción catalizada por la primera enzima de ácidos nucleicos

10 y formar un segundo complejo de ácidos nucleicos capaz de funcionar como una segunda enzima de ácidos nucleicos en el que al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos tiene actividad ligasa y al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos es una MNAzima, y en el que dicho método comprende:

15 i) poner en contacto una muestra que potencialmente contiene una diana con el primer complejo de ácidos nucleicos, en el que dicha diana se asocia con dicho primer complejo de ácidos nucleicos para facilitar la formación de dicha primera enzima de ácidos nucleicos, y

ii) poner en contacto un producto de la reacción catalizada por la primera enzima de ácidos nucleicos con dicho al menos un componente del segundo complejo de ácidos nucleicos permitiendo de esta manera la formación del segundo complejo de ácidos nucleicos que funciona como dicha segunda enzima de ácidos nucleicos, y

20 en el que la actividad de al menos una de la primera o segunda enzimas de ácidos nucleicos o ambas es indicativa de la presencia de dicha diana.

En una realización, el método comprende además

proporcionar al menos un componente de un tercer complejo de ácidos nucleicos capaz de asociarse con un producto de una reacción catalizada por la primera o segunda enzima de ácidos nucleicos o ambas

25 y formar un tercer complejo de ácidos nucleicos capaz de funcionar como una tercera enzima de ácidos nucleicos en el que dicho método comprende

poner en contacto un producto de la reacción catalizada por la primera o segunda enzima de ácidos nucleicos o ambas con dicho al menos un componente del tercer complejo de ácidos nucleicos permitiendo de esta manera la formación de un tercer complejo de ácidos nucleicos que funciona como dicha tercera enzima de ácidos nucleicos, y

30 en el que la actividad de la primera, segunda o tercera enzimas de ácidos nucleicos o cualquier combinación de éstas es indicativa de la presencia de dicha diana.

En otra realización, el método comprende además

proporcionar al menos un componente de al menos un complejo de ácidos nucleicos adicional capaz de asociarse con un producto de al menos una de dicha primera, segunda o tercera enzimas de ácidos nucleicos

35 y formar al menos un complejo de ácidos nucleicos adicional capaz de funcionar como al menos una enzima de ácidos nucleicos adicional en el que dicho método comprende

poner en contacto un producto de la reacción catalizada por al menos una de dichas primera, segunda o tercera enzimas de ácidos nucleicos con dicho al menos un componente del al menos un complejo de ácidos nucleicos adicional permitiendo de esta forma la formación de al menos un complejo de ácidos nucleicos adicional que funciona como dicha al menos una enzima de ácidos nucleicos adicional, y

40 en el que la actividad de la primera, segunda, tercera o al menos una enzima de ácidos nucleicos adicional o cualquier combinación de éstas es indicativa de la presencia de dicha diana.

En una realización, al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos puede tener actividad de escisión o actividad ligasa. Además, la primera enzima de ácidos nucleicos puede ser una MNAzima. Además, al menos una de las enzimas de ácidos nucleicos puede ser una ADNzima.

45 En otra realización, un producto de una reacción catalizada por una cualquiera de las enzimas de ácidos nucleicos puede seleccionarse del grupo que comprende un facilitador del ensamblaje, partzima, sustrato, ADNzima, brazo estabilizador o componente de éstos.

En una realización, la diana puede ser un ácido nucleico.

- 5 En una realización, al menos uno de dichos componentes puede comprender además al menos un aptámero y en el que dicho método puede comprender además proporcionar al menos un facilitador del ensamblaje y al menos un inhibidor del ensamblaje de dicho primer complejo de ácidos nucleicos en el que dicha diana se asocia con dicho aptámero permitiendo que dicho primer complejo de ácidos nucleicos funcione como una primera enzima de ácidos nucleicos.
- En una realización, la diana es una diana distinta de ácido nucleico. El facilitador del ensamblaje puede ser una diana adicional para ser detectada.
- 10 En una realización adicional, un producto de una reacción catalizada por al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos, o cualquier combinación de éstas, se asocia con al menos un componente de al menos uno de los complejos de ácidos nucleicos precedentes permitiendo de esta manera la formación de además al menos uno de dichos complejos de ácidos nucleicos precedentes que funciona como además dicha enzima de ácidos nucleicos precedente.
- En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende
- 15 a) proporcionar componentes para una primera MNAzima, al menos un primer sustrato de MNAzima, una primera ADNzima ligasa, un primer sustrato de ADNzima ligasa, un segundo facilitador del ensamblaje, al menos un segundo sustrato de MNAzima, y una primera partzima para una segunda MNAzima en el que dicho método comprende:
- 20 b) asociar dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para dicha primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilitando así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;
- la modificación del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un segundo sustrato de ADNzima ligasa; y
- 25 en el que la primera ADNzima ligasa se ensambla con el primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa; y
- en el que la actividad catalítica de la ADNzima ligasa produce una segunda partzima para la segunda MNAzima, y en el que;
- la asociación de dicha segunda partzima para las segundas MNAzimas con dicho segundo facilitador del ensamblaje, y la primera partzima para la segunda MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de la segunda MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de al menos el segundo sustrato de MNAzima en el que la modificación de cualquiera de dichos sustratos, o una combinación de éstos, es indicativa de la presencia de dicho primer facilitador del ensamblaje.
- 30 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende
- 35 a) proporcionar componentes para una primera MNAzima, al menos un primer sustrato de MNAzima, una ADNzima ligasa, un primer sustrato de ADNzima ligasa, al menos un segundo sustrato de MNAzima, y una primera y segunda partzima para una segunda MNAzima y en el que dicho método comprende:
- 40 b) asociar dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para las primeras MNAzimas en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilitando así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;
- la modificación del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un segundo sustrato de ADNzima ligasa; y
- en el que la primera ADNzima ligasa se ensambla con el primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa; y
- 45 en el que la actividad catalítica de la ADNzima ligasa produce un segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima, y
- en el que la asociación de dicho segundo facilitador del ensamblaje con dichas primera y segunda partzimas para la segunda MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de al menos el segundo sustrato de MNAzima en el que la modificación de cualquiera de dichos sustratos, o una combinación de éstos, es indicativa de la presencia de dicho primer facilitador del ensamblaje.
- 50

En una realización, un producto de la reacción catalizada por la segunda MNAzima puede ser un componente requerido para permitir la función de una tercera enzima de ácidos nucleicos. Un producto de la reacción catalizada por la tercera enzima de ácidos nucleicos puede ser un componente que participa en una reacción catalizada por la segunda MNAzima o la ADNzima ligasa, o ambas.

5 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende

10 a) proporcionar componentes para una primera MNAzima, al menos un primer sustrato de MNAzima, componentes para una segunda MNAzima en el que dicha segunda MNAzima tiene actividad ligasa, un segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima, un segundo sustrato de MNAzima, un tercer facilitador del ensamblaje para una tercera MNAzima, al menos un tercer sustrato de MNAzima, y una primera partzima para la tercera MNAzima y en el que dicho método comprende:

15 b) asociar dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para dicha primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilitando así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;

la modificación del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un cuarto sustrato de MNAzima; y

en el que el facilitador del ensamblaje de la segunda MNAzima facilita el ensamblaje de los componentes para una segunda MNAzima con el segundo y cuarto sustratos de MNAzima; y

20 en el que la actividad catalítica ligasa de la segunda MNAzima produce una segunda partzima para la tercera MNAzima, y en el que;

25 la asociación de dicha primera y segunda partzimas para la tercera MNAzima con dicho tercer facilitador del ensamblaje en condiciones que permitan la actividad catalítica de la tercera MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha tercera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de al menos el tercer sustrato de MNAzima en el que la modificación de cualquiera de dichos sustratos, o una combinación de éstos, es indicativa de la presencia de dicho primer facilitador del ensamblaje.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende

30 a) proporcionar componentes para una primera MNAzima, al menos un primer sustrato de MNAzima, componentes para una segunda MNAzima en el que dicha segunda MNAzima tiene actividad ligasa, un segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima, un segundo sustrato de MNAzima, una primera y una segunda partzima para una tercera MNAzima y al menos un tercer sustrato de MNAzima, y en el que dicho método comprende:

35 b) asociar dicho primer facilitador del ensamblaje con componentes para dicha primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilitando así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;

la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un cuarto sustrato de MNAzima; y

en el que el facilitador del ensamblaje de la segunda MNAzima facilita el ensamblaje de dichos componentes para una segunda MNAzima con el segundo y cuarto sustratos de MNAzima; y

40 en el que la actividad catalítica ligasa de la segunda MNAzima produce un tercer sustrato de MNAzima, y en el que;

45 la asociación de dicha primera y segunda partzimas para la tercera MNAzima con dicho tercer facilitador del ensamblaje, en condiciones que permitan la actividad catalítica de la tercera MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha tercera MNAzima permitiendo de esta manera la modificación de al menos el tercer sustrato de MNAzima en el que la modificación de uno cualquiera de dichos sustratos, o una combinación de éstos, es indicativa de la presencia de dicho primer facilitador del ensamblaje.

50 En una realización, un producto de la reacción catalizada por la tercera MNAzima puede ser un componente requerido para permitir la función de una cuarta enzima de ácidos nucleicos. Un producto de la reacción catalizada por la cuarta enzima de ácidos nucleicos puede ser un componente que participa en una reacción catalizada por la segunda o tercera MNAzima o ambas.

En una realización, la modificación de uno cualquiera de dichos sustratos, o una combinación de estos, proporciona un efecto detectable. La modificación de al menos un sustrato puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta

5 a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglucosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

El primer facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

10 En una realización, la ADNzima ligasa puede seleccionarse del grupo que comprende ADNzima ligasas 7Z81, 7Z48, 7Q10 y 9DB1.

15 En otra realización, un producto de las segundas MNAzimas puede ser el segundo sustrato de ADNzima ligasa, y en el que la ADNzima ligasa facilita la ligación del primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa produciendo de esta manera segunda partzima adicional para la segunda MNAzima. Un producto de las segunda MNAzima puede ser el segundo sustrato de ADNzima ligasa, y en el que la ADNzima ligasa facilita la ligación del primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa produciendo de esta manera segundo facilitador del ensamblaje adicional para la segunda MNAzima. Además, un producto de la tercera MNAzima puede ser el cuarto sustrato de MNAzima, y en el que la segunda MNAzima facilita la ligación del segundo y cuarto sustratos de MNAzima produciendo de esta manera una segunda partzima adicional para la tercera MNAzima.

20 En una realización adicional, un producto de la tercera MNAzima puede ser el cuarto sustrato de MNAzima, y en el que la segunda MNAzima facilita la ligación del segundo y cuarto sustratos de MNAzima produciendo de esta manera un tercer facilitador del ensamblaje adicional para la tercera MNAzima.

25 En otro aspecto de la descripción, se proporciona el uso de una pareja de ácidos nucleicos aislados como secuencias del núcleo catalítico incorporadas en una pareja de partzimas para una MNAzima ligasa en el que dichas parejas de ácidos nucleicos se seleccionan del grupo que consiste en TGGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 47) y ACG (SEQ ID NO: 48), GGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 49) y ACGT (SEQ ID NO: 50), GGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO : 71) y ACGGCGGAGTGATTG (SEQ ID NO : 72), TGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 73) y ACGGCGGAGTGAT (SEQ ID NO: 74), ATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 75) y ACGGCGGAGTG (SEQ ID NO : 76), TGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 77) y ACGGCGGAG (SEQ ID NO: 78), AGTGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 79) y ACGGCGG (SEQ ID NO : 80), GGAGTGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO : 81) y ACGGC (SEQ ID NO: 82).

35 En otro aspecto de la descripción, se proporciona una MNAzima ligasa que comprende una pareja de ácidos nucleicos aislados como secuencias del núcleo catalítico incorporadas en una pareja de partzimas en el que dichas parejas de ácidos nucleicos se seleccionan del grupo que consiste en TGGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 47) y ACG (SEQ ID NO: 48), GGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 49) y ACGT (SEQ ID NO: 50), GGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 71) y ACGGCGGAGTGATTG (SEQ ID NO: 72), TGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 73) y ACGGCGGAGTGAT (SEQ ID NO: 74), ATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 75) y ACGGCGGAGTG (SEQ ID NO: 76), TGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 77) y ACGGCGGAG (SEQ ID NO: 78), AGTGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 79) y ACGGCGG (SEQ ID NO: 80), GGAGTGATTGGGAGGTTAGCTC (SEQ ID NO: 81) y ACGGC (SEQ ID NO: 82).

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una MNAzima ligasa para ligar dos sustratos en el que dichos sustratos se ligan por dicha MNAzima ligasa para formar un producto después del reclutamiento de dichos sustratos por los brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa.

En una realización, el producto puede asociarse con los componentes de al menos un complejo de ácidos nucleicos.

45 En otra realización, el producto puede seleccionarse del grupo que comprende facilitador del ensamblaje, partzima, sustrato, ADNzima, brazo estabilizador, inhibidor de la actividad, inhibidor del ensamblaje, o componente de éstos. El producto puede participar en una cascada.

En otra realización, al menos un sustrato es el producto de una reacción catalizada por una enzima de ácidos nucleicos,

50 En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para la detección de una pluralidad de dianas que comprende:

a) proporcionar una pluralidad de primeros complejos de ácidos nucleicos comprendiendo cada uno componentes que requieren la asociación con una de dicha pluralidad de dianas para facilitar la formación de una pluralidad de primeras enzimas de ácidos nucleicos, en el que cada uno de dicha pluralidad de primeros complejos de ácidos nucleicos comprende además al menos un sustrato, y

b) proporcionar al menos un componente de cada uno de una pluralidad de segundos complejos de ácidos nucleicos capaz de asociarse con una pluralidad de productos de reacciones catalizadas por la pluralidad de primeras enzimas de ácidos nucleicos y formando una pluralidad de segundos complejos de ácidos nucleicos capaces de funcionar como una pluralidad de segundas enzimas de ácidos nucleicos, en el que al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos tiene actividad ligasa y al menos una de dichas enzimas de ácidos nucleicos es una MNAzima, y en el que dicho método comprende:

i) poner en contacto una muestra que contiene potencialmente dicha pluralidad de dianas con la pluralidad de primeros complejos de ácidos nucleicos, en el que dicha pluralidad de dianas se asocian con dicha pluralidad de primeros complejos de ácidos nucleicos para facilitar la formación de dicha pluralidad de primeras enzimas de ácidos nucleicos, y

ii) poner en contacto una pluralidad de productos de las reacciones catalizadas por la pluralidad de primeras enzimas de ácidos nucleicos con al menos un componente de cada una de la pluralidad de segundos complejos de ácidos nucleicos permitiendo de esta forma la formación de la pluralidad de dichos segundos complejos de ácidos nucleicos que funcionan como dicha pluralidad de segundas enzimas de ácidos nucleicos, y

en el que la actividad de la primera o segunda o ambas pluralidades de enzimas de ácidos nucleicos es indicativa de la presencia de dicha pluralidad de dianas.

En una realización, al menos uno de los productos de las reacciones catalizadas por una cualquiera de la pluralidad de primeras o segundas enzimas de ácidos nucleicos puede ser un componente requerido para permitir la función de al menos una enzima de ácidos nucleicos adicional.

En otra realización, al menos uno de los productos de las reacciones catalizadas por una cualquiera de las enzimas de ácidos nucleicos se asocia con los componentes de uno cualquiera de los complejos de ácidos nucleicos precedentes permitiendo de esta manera que al menos uno de los complejos de ácidos nucleicos funcione como una enzima de ácidos nucleicos adicional.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona el uso de al menos dos oligonucleótidos como sustratos de una enzima ligasa de ácido nucleico multi-componente (MNAzima ligasa) en el que dichos sustratos se modifican por una MNAzima ligasa después del reclutamiento de dichos sustratos por los brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la detección de al menos dos dianas en el que dicho método comprende:

a) proporcionar al menos dos complejos de ácidos nucleicos comprendiendo cada uno componentes que requieren la asociación con al menos una de dichas dianas para facilitar la formación de al menos dos complejos de enzima de ácidos nucleicos, y

b) poner en contacto una muestra que contiene potencialmente dichas al menos dos dianas con dichos al menos dos complejos de ácidos nucleicos, en el que dichas dianas se asocian con dichos complejos de ácidos nucleicos para facilitar la formación de dichos complejos de enzima de ácidos nucleicos y en el que al menos un producto creado por la actividad de cada complejo de enzima de ácidos nucleicos se requiere para la formación de un complejo de enzima de ácidos nucleicos adicional, y

en el que la actividad del complejo de enzima de ácidos nucleicos adicional es indicativa de la presencia de dichas al menos dos dianas.

En una realización, al menos uno de dichos complejos de enzima de ácidos nucleicos puede tener actividad ligasa. Además, al menos uno de dichos complejos de enzima de ácidos nucleicos puede ser un complejo MNAzima.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona el uso de una MNAzima con actividad ligasa (MNAzima ligasa) para cambiar una MNAzima activa a un complejo MNAi; en el que

dicha MNAzima activa se forma en presencia de al menos un primer componente facilitador del ensamblaje y un segundo componente facilitador del ensamblaje y en el que

dicha MNAzima ligasa se forma en presencia de al menos un tercer facilitador del ensamblaje y en el que

dicha MNAzima ligasa facilita la ligación de dicho segundo componente facilitador del ensamblaje con un componente inhibidor de la actividad para formar un inhibidor de la actividad; y en el que

dicho inhibidor de la actividad se asocia con uno o más componentes de dicha MNAzima para formar un complejo MNAi.

En una realización, al menos uno de los facilitadores del ensamblaje, componente inhibidor de la actividad o inhibidor de la actividad puede ser moléculas de ácido nucleico.

En una realización, al menos uno de los facilitadores del ensamblaje, componente inhibidor de la actividad o inhibidor de la actividad puede estar comprendido por ADN o un análogo de éste.

5 Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una enzima de ácidos nucleicos multicomponente con actividad ligasa que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se auto-ensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje de MNAzima ligasa para formar una enzima de ácidos nucleicos multi-componente catalíticamente activa con actividad ligasa (MNAzima ligasa),

10 en el que cada uno de dichos al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprende una parte de brazo de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de brazo sensor;

en el que después del auto-ensamblaje, la parte de brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como brazos sensores de la MNAzima ligasa, la parte de brazo de sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como brazos de sustrato de la MNAzima ligasa, y la parte de núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como un núcleo catalítico de la MNAzima ligasa; y

15

en el que los brazos sensores de la MNAzima ligasa interaccionan con dicho facilitador de ensamblaje de MNAzima ligasa de manera que se mantienen el primero y segundo componentes oligonucleotídicos cerca para la asociación de sus partes respectivas de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima ligasa, dicho núcleo catalítico capaz de ligar al menos dos sustratos, y

20

en el que dichos brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa reclutan el primer y segundo sustratos de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede ligar dichos sustratos.

En una realización, al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje o sustratos de la enzima de ácidos nucleicos multicomponente con actividad ligasa puede comprender ADN o un análogo de éste.

25

En una realización, la ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende al menos dos partzimas oligonucleotídicas comprendiendo cada una al menos una parte de núcleo catalítico, una parte de brazo sensor y una parte de brazo informador, y al menos tres componentes oligonucleotídicos adicionales que comprenden un facilitador del ensamblaje oligonucleotídico y al menos dos ácidos nucleicos sustrato, en el que dicha composición es capaz de formar un complejo de ácidos nucleicos multicomponente capaz de ligar los ácidos nucleicos sustrato.

30

En una realización, al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje o sustratos de la composición puede comprender ADN o un análogo de éste.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se auto-ensamblan en presencia de un facilitador de ensamblaje MNAzima para formar una enzima de ácidos nucleicos multi-componente catalíticamente activa con actividad ligasa (MNAzima ligasa)

35

en el que dicho al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídico comprende una parte de brazo de sustrato, una parte de núcleo catalítico y una parte de brazo sensor;

40

en el que después del auto-ensamblaje, la parte de brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como brazos sensores de la MNAzima ligasa, la parte de brazo de sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como brazos de sustrato de la MNAzima ligasa, y la parte de núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como un núcleo catalítico de la MNAzima ligasa;

45

y en el que los brazos sensores de la MNAzima ligasa interaccionan con dicho factor de ensamblaje MNAzima de manera que se mantienen el primero y segundo componentes oligonucleotídicos cerca para la asociación de sus partes respectivas de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima ligasa, dicho núcleo catalítico capaz de ligar al menos un sustrato a otro, y

50 en el que dichos brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa reclutan el primer y segundo sustratos de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima ligasa puede ligar dichos sustratos.

En una realización, la ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

En una realización, al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje o sustratos de la composición puede comprender ADN o un análogo de éste.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una enzima de ácidos nucleicos multicomponente con actividad ligasa en el que al menos un componente oligonucleotídico de dicha MNAzima comprende además un aptámero.

- 5 En otro aspecto, al menos uno de facilitador del ensamblaje o sustratos comprende además un aptámero.

En una realización, el ensamblaje de la MNAzima ligasa puede estar dirigido por la presencia o ausencia de uno o más analitos capaces de unir el aptámero.

En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende

- 10 (a) proporcionar al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en el que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se auto-ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para formar al menos una enzima de ácidos nucleicos multi-componente catalíticamente activa con actividad ligasa (MNAzima ligasa),

- 15 (b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene potencialmente el facilitador del ensamblaje en condiciones que permitan:

(1) el auto-ensamblaje de dicha al menos una MNAzima ligasa catalíticamente activa y

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

(c) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha al menos una MNAzima ligasa, en el que la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicho al menos un facilitador del ensamblaje.

- 20 En una realización, al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador del ensamblaje puede estar comprendido por ADN o un análogo de éste.

En una realización dicho facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

En una realización, dicha diana puede ser un ácido nucleico.

- 25 En una realización preferida, dicho ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificadores, ARN ribosómico, derivados de éstos, amplicones de éstos o cualquier combinación de éstos.

- 30 En una realización, la fuente del ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende fuentes sintéticas, de mamíferos, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, archaea o cualquier combinación de éstas.

En una realización, el método puede comprender además una etapa de amplificación del facilitador del ensamblaje.

- 35 En una realización, la etapa de amplificación puede comprender una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación en círculo rodante, amplificación mediada por transcripción, replicación de secuencia auto-sostenida, reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencias de ácido nucleicos o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

En una realización, al menos uno de dicho facilitador del ensamblaje, dichos componentes oligonucleotídicos o sustratos para la reacción o una combinación de éstos puede estar comprendido por más de una molécula.

- 40 En una realización, el método puede comprender además la determinación de la presencia de dicha actividad catalítica durante o después de dicha amplificación.

En una realización, el auto ensamblaje de la MNAzima ligasa puede requerir poner en contacto el facilitador del ensamblaje con uno o ambos de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos.

- 45 En una realización, el método puede comprender además proporcionar al menos un tercer componente oligonucleotídico que se pone en contacto con al menos una parte de uno o ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos para auto-ensamblar la MNAzima ligasa.

En una realización, el método dicho tercer componente oligonucleotídico puede estar comprendido por más de una molécula.

- 5 En un aspecto de la descripción, se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada capaz de formar parte de un núcleo catalítico de una MNAzima ligasa que comprende la secuencia seleccionada del grupo que comprende TGGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 47), ACG (SEQ ID NO: 48), GGAGGTGGGCTC (SEQ ID NO: 49), ACGT (SEQ ID NO: 50), GGAGGTAGCTC (SEQ ID NO : 71), ACGGCGGAGTGATTG (SEQ ID NO: 72), TGGGAGGTAGCTC (SEQ ID NO: 73), ACGGCGGAGTGAT (SEQ ID NO: 74), ATTGGGAGGTAGCTC (SEQ ID NO: 75), ACGGCGGAGTG (SEQ ID NO: 76), TGATTGGGAGGTAGCTC (SEQ ID NO: 77), ACGGCGGAG (SEQ ID NO: 78), AGTGATTGGGAGGTAGCTC (SEQ ID NO: 79), ACGGCGG (SEQ ID NO: 80), GGAGTGATTGGGAGGTAGCTC (SEQ ID NO: 81), y ACGGC (SEQ ID NO: 82).
- 10 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima, un primer sustrato de MNAzima, componentes para una segunda MNAzima, un segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima, un segundo sustrato de MNAzima, un tercer facilitador del ensamblaje para la tercera MNAzima, al menos un tercer sustrato de MNAzima, y una primera partzima para la tercera MNAzima en el que
- 15 la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escindiendo de esta manera el dicho primer sustrato de MNAzima en el que;
- la escisión del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un cuarto sustrato de MNAzima; y
- en el que el facilitador del ensamblaje de la segunda MNAzima facilita el ensamblaje de la segunda MNAzima con el segundo y cuarto sustratos de MNAzima; y
- 20 en el que la actividad catalítica ligasa de la segunda MNAzima produce una segunda partzima para la tercera MNAzima, y en el que;
- la asociación de dichas primera y segunda partzimas para la tercera MNAzima con dicho tercer facilitador del ensamblaje, en condiciones que permitan la actividad catalítica de la tercera MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha tercera MNAzima proporcionando de esta manera la modificación de al menos un tercer sustrato de
- 25 MNAzima.
- La modificación del primer, segundo o al menos un tercer sustrato de MNAzima o cualquier combinación de éstos puede proporcionar un efecto detectable.
- La modificación del al menos un tercer sustrato de MNAzima puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta
- 30 a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd,
- 35 isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglucosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.
- En una realización de la descripción, el método comprende además una cascada de amplificación en la que un producto de la tercera MNAzima es el cuarto sustrato de MNAzima, y en la que la segunda MNAzima facilita la ligación del segundo y cuarto sustratos de MNAzima produciendo de esta manera una segunda partzima adicional
- 40 para la tercera MNAzima..
- Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima, un primer sustrato de MNAzima, componentes para una segunda MNAzima, un segundo facilitador del ensamblaje para la MNAzima,
- 45 un segundo sustrato de MNAzima, componentes para una tercera MNAzima y al menos un tercer sustrato de MNAzima, en el que
- la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escindiendo de esta manera el dicho primer sustrato de MNAzima en el que;
- la escisión del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción del cuarto sustrato de MNAzima; y
- 50 en el que el facilitador del ensamblaje de la segunda MNAzima facilita el ensamblaje de la segunda MNAzima con el segundo y cuarto sustratos de MNAzima; y
- en el que la actividad catalítica de la segunda MNAzima produce un tercer sustrato de MNAzima para la tercera MNAzima, y en el que;

la asociación de dicho tercer facilitador del ensamblaje de MNAzima con dichos componentes para una tercera MNAzima, en condiciones que permitan la actividad catalítica de la tercera MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha tercera MNAzima proporcionando de esta manera la modificación del al menos un tercer sustrato de MNAzima.

5 La modificación del primer, segundo o al menos un tercer sustrato de MNAzima o cualquier combinación de éstos puede proporcionar un efecto detectable.

La modificación del al menos un tercer sustrato de MNAzima puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

En una realización de la descripción, el método comprende además una cascada de amplificación en la que un producto de la tercera MNAzima es el cuarto sustrato de MNAzima, y en la que la segunda MNAzima facilita la ligación del segundo y cuarto sustratos de MNAzima produciendo de esta manera además tercer facilitador del ensamblaje para la tercera MNAzima..

20 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima con actividad de escisión, un primer sustrato de MNAzima, una primera ADNzima con actividad ligasa (ADNzima ligasa), un primer sustrato de ADNzima ligasa, un segundo facilitador del ensamblaje, al menos un segundo sustrato de MNAzima y una primera partzima para una segunda MNAzima, en el que

25 la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima proporcionando de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;

la modificación del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción del segundo sustrato de ADNzima ligasa; y en el que la primera ADNzima ligasa se ensambla con el primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa; y

30 en el que la actividad catalítica de la ADNzima ligasa produce una segunda partzima para la segunda MNAzima, y en el que;

la asociación de dicha segunda partzima para la segunda MNAzima con dicho segundo facilitador del ensamblaje y la primera partzima para la segunda MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de la segunda MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima proporcionando de esta manera la modificación del al menos segundo sustrato de MNAzima.

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

El primer facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

40 La modificación del primer o segundo sustrato de MNAzima o sustratos de ligasa o cualquier combinación de éstos puede proporcionar un efecto detectable.

La actividad catalítica de la segunda MNAzima puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

50 La modificación del segundo sustrato de MNAzima puede ser escisión.

La ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

En una realización de la descripción, el método comprende además una cascada de amplificación en la que un producto de la segunda MNAzima es el segundo sustrato de ADNzima ligasa, y en la que la ADNzima ligasa facilita

la ligación del primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa produciendo de esta manera una segunda partzima adicional para la segunda MNAzima.

La ADNzima ligasa puede seleccionarse del grupo que comprende ADNzima ligasas 7Z81, 7Z48 y 7Q10.

5 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima con actividad de escisión, un primer sustrato de MNAzima, una primera ADNzima con actividad ligasa (ADNzima ligasa), un primer sustrato de ADNzima ligasa, componentes para una segunda MNAzima y al menos un segundo sustrato de MNAzima, y en el que

10 la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima proporcionando de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima en el que;

la modificación del primer sustrato de MNAzima resulta en la producción de un segundo sustrato de ADNzima ligasa; y

en el que la primera ADNzima ligasa se ensambla con el primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa; y

15 en el que la actividad catalítica de la ADNzima ligasa produce un segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima, y en el que;

20 la asociación de dicho segundo facilitador del ensamblaje para la segunda MNAzima con dichos componentes para una segunda MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de la segunda MNAzima facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima proporcionando de esta manera la modificación del al menos segundo sustrato de MNAzima.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje o sustratos puede comprender ADN o un análogo de éste.

La modificación del primer o segundo sustrato de MNAzima o sustratos de ligasa o cualquier combinación de éstos puede proporcionar un efecto detectable.

25 El primer facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

30 La actividad catalítica de la segunda MNAzima puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

35 La ADNzima ligasa puede seleccionarse del grupo que comprende ADNzima ligasas 7Z81, 7Z48 y 7Q10.

La modificación del segundo sustrato de MNAzima puede ser escisión.

La ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

40 En una realización de la descripción, el método comprende además una cascada de amplificación en la que un producto de la segunda MNAzima es el segundo sustrato de ADNzima ligasa, y en la que la ADNzima ligasa facilita la ligación del primer y segundo sustratos de ADNzima ligasa produciendo de esta manera un segundo facilitador del ensamblaje adicional para la segunda MNAzima.

45 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima con actividad de escisión (una primera MNAzima escisora), un primer sustrato MNAzima escindible, componentes para una primera MNAzima con actividad ligasa (una primera MNAzima ligasa), un primer facilitador del ensamblaje de MNAzima ligasa, un primer sustrato de MNAzima ligasa, un segundo facilitador del ensamblaje para una segunda MNAzima escisora, un segundo sustrato de MNAzima escindible, y una primera partzima para una segunda MNAzima escisora en el que

50 la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima escisora en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escisora facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escisora proporcionando de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima escindible en el que;

la modificación del primer sustrato de MNAzima escindible resulta en la producción de un segundo sustrato de MNAzima ligasa; y

en el que el facilitador del ensamblaje de la MNAzima ligasa facilita el ensamblaje de la primera MNAzima ligasa con el primer y segundo sustratos de MNAzima ligasa; y

5 en el que la actividad catalítica de la MNAzima ligasa produce una segunda partzima para la segunda MNAzima escisora, y en el que;

la asociación de dicha primera y segunda partzimas para la segunda MNAzima escisora con dicho segundo facilitador del ensamblaje, en condiciones que permitan la actividad catalítica de la segunda MNAzima escisora facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima escisora proporcionando de esta manera la modificación del segundo sustrato de MNAzima escindible.

10

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitadores del ensamblaje o sustratos puede comprender ADN o un análogo de éste.

El primer facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

15 La modificación del primer o segundo sustrato MNAzima escindible o ambos puede proporcionar un efecto detectable.

La ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

En una realización, el método comprende además una cascada de amplificación en la que el producto de la segunda MNAzima es el segundo sustrato de MNAzima ligasa, y en la que la MNAzima ligasa facilita la ligación del primer y segundo sustratos de MNAzima ligasa produciendo de esta manera una segunda partzima adicional para la segunda MNAzima escisora.

20

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para la detección de un primer facilitador del ensamblaje usando una cascada que comprende componentes para una primera MNAzima con actividad de escisión (una primera MNAzima escisora), un primer sustrato MNAzima escindible, componentes para una primera MNAzima con actividad ligasa (una primera MNAzima ligasa), un primer facilitador del ensamblaje de MNAzima ligasa, un primer sustrato de MNAzima ligasa, componentes para una segunda MNAzima escisora y un segundo sustrato de MNAzima escindible, en el que

25

la asociación de dicho primer facilitador del ensamblaje con dichos componentes para una primera MNAzima escisora en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escisora facilita así la actividad catalítica de dicha primera MNAzima escisora proporcionando de esta manera la modificación de dicho primer sustrato de MNAzima escindible en el que;

30

la modificación del primer sustrato de MNAzima escindible resulta en la producción del segundo sustrato de MNAzima ligasa; y

en el que el facilitador del ensamblaje de la MNAzima ligasa facilita el ensamblaje de la primera MNAzima ligasa con el primer y segundo sustratos de MNAzima ligasa; y

35 en el que la actividad catalítica de la MNAzima ligasa produce un segundo facilitador del ensamblaje de MNAzima para la segunda MNAzima escisora, y en el que;

la asociación de dicho segundo facilitador del ensamblaje de MNAzima con dichos componentes para una segunda MNAzima escisora en condiciones que permitan la actividad catalítica de la segunda MNAzima escisora facilita la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima escisora proporcionando de esta manera la modificación del segundo sustrato de MNAzima escindible.

40

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitadores del ensamblaje o sustratos puede comprender ADN o un análogo de éste.

La modificación del primer o segundo sustrato MNAzima escindible o ambos puede proporcionar un efecto detectable.

45 La ligación de los sustratos puede proporcionar un efecto detectable.

El primer facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se quiere identificar, detectar o cuantificar.

En una realización, el método comprende además una cascada de amplificación en la que el producto de la segunda MNAzima es el segundo sustrato de MNAzima ligasa, y en la que la MNAzima ligasa facilita la ligación del primer y segundo sustratos de MNAzima ligasa produciendo de esta manera un segundo facilitador del ensamblaje de MNAzima adicional para la segunda MNAzima escisora.

50

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un uso de al menos un oligonucleótido como un sustrato de una enzima de ácidos nucleicos multi-componente (MNAzima) en el que dicho sustrato se modifica por dicha MNAzima después del reclutamiento de dicho sustrato por los brazos de sustrato de dicha MNAzima.

5 En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para preparar MNAzimas que incorporen secuencias parciales de una ADNzima en el que dicho método comprende las etapas siguientes:

a) seleccionar posiciones en dicha secuencia de ADNzima para división en secuencias parciales de núcleo catalítico

b) incorporar dichas secuencias parciales de núcleo catalítico en partzimas

10 c) detectar la actividad catalítica de las parejas de partzima para determinar qué combinación de dichas secuencias parciales de núcleo catalítico en dichas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.

En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para ensayar secuencias parciales de núcleo catalítico obtenidas de un núcleo catalítico de ADNzima que, después de incorporación en partzimas, generan MNAzimas funcionalmente activas, en el que dicho método comprende

15 a) dividir la secuencia de núcleo catalítico de dicha ADNzima

b) incorporar las secuencias parciales de núcleo catalítico resultantes en partzimas:

c) detectar la actividad MNAzima para determinar qué combinación de dichas secuencias parciales de núcleo catalítico en dichas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.

20 En otro aspecto de la descripción se proporciona un método para identificar qué posiciones en una secuencia de núcleo catalítico de ADNzima son adecuadas para división en secuencias parciales de núcleo catalítico que, después de incorporación en partzimas, resultan en MNAzimas funcionalmente activas en el que dicho método comprende las etapas siguientes:

a) dividir la secuencia de núcleo catalítico de dicha ADNzima

b) incorporar las secuencias parciales de núcleo catalítico resultantes en partzimas:

25 c) detectar la actividad MNAzima para determinar qué combinación de dichas secuencias parciales de núcleo catalítico en dichas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.

Descripción Breve de los Dibujos

Ahora se describirán realizaciones preferidas de la presente descripción, sólo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

30 **Figura 1: Representación de un diseño ejemplar de un ácido nucleico Multi-componente (MNAzima):** Como descripción ejemplar, una MNAzima está comprendida por dos componentes oligonucleotídicos (partzima A y partzima B), que se auto ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje. Cuando las dos partzimas se ensamblan en presencia del facilitador del ensamblaje, se forma una MNAzima catalíticamente activa que es capaz de modificar, por ejemplo escindir, un sustrato. Las dos partzimas componentes tienen (i) brazos sensores, que se unen al facilitador del ensamblaje, (ii) brazos de sustrato, que se unen al sustrato, y (iii) secuencias parciales de núcleo catalítico. La presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje proporciona la señal "de entrada" que dirige el ensamblaje de los componentes de partzima de una manera altamente específica que es susceptible de modulación. En algunas realizaciones, el facilitador del ensamblaje puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana presente en una muestra de ensayo. En otras realizaciones, el facilitador del ensamblaje puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido sintético incluido en el medio para dirigir el auto-ensamblaje de los componentes partzima en presencia de una entidad o evento detectable. La modificación del sustrato por la MNAzima ensamblada puede proporcionar una señal "de salida" que puede detectarse y/o cuantificarse. Por ejemplo, cuando el sustrato está marcado de forma dual con un fluoróforo (F) y un apantallador (Q), la escisión del sustrato por una MNAzima activa separa el fluoróforo y el apantallador lo que resulta en un incremento concomitante de la fluorescencia.

45 **Figura 2: Diseños ejemplares adicionales para MNAzimas activas. Panel (i):** Representación de un diseño ejemplar para MNAzimas en el que se requieren múltiples componentes de facilitador del ensamblaje para la formación de MNAzima. En este diseño, un componente facilitador del ensamblaje (F1) es complementario a regiones de los brazos sensores tanto de la partzima A como B, mientras que un segundo componente facilitador del ensamblaje (F2) es complementario sólo de la partzima B (según esta ilustración), o sólo de la partzima A. Los dos componentes facilitadores del ensamblaje conjuntamente dirigen el ensamblaje de una MNAzima activa que puede modificar (por ejemplo escindir) un sustrato. **Panel (ii):** Representación de un diseño ejemplar en el que un componente partzima A y componentes partzima B bi-partita se ensamblan en presencia de facilitador del ensamblaje para producir una MNAzima activa capaz de modificar (por ejemplo escindir) un sustrato. En este

diagrama, la partzima B tiene un brazo sensor truncado (T), que es insuficiente para permitir el ensamblaje de MNAzima estable en ausencia de un segundo componente, referido como un componente brazo estabilizador (S). La hibridación del brazo estabilizador con el facilitador del ensamblaje en una localización adyacente al brazo sensor truncado de la partzima, permite el ensamblaje de una MNAzima activa.

- 5 Un experto en técnica apreciará que el brazo de partzima, que está truncado, podría ser cualquiera de los siguientes; el brazo sensor de la partzima A, el brazo sensor de la partzima B (como se ilustra), el brazo de sustrato de la partzima A o el brazo de sustrato de la partzima B, o una combinación de éstos.

10 **Figura 3: Cambios en la señal de salida (fluorescencia) con el tiempo en presencia de complejos de ácidos nucleicos multi-componente activos e inactivos.** En este ejemplo, la primera partzima (A) comprende un único componente oligonucleotídico. La segunda partzima (B) tiene un componente que contiene un brazo de sustrato, un núcleo catalítico parcial y un brazo sensor truncado (T), y un segundo componente que sirve como un brazo estabilizador (S).

15 Se observó un incremento en la fluorescencia en la reacción (i), que contenía todos los componentes de las partzimas A y B y un facilitador del ensamblaje. Esto es consistente con el ensamblaje de MNAzimas activas y la escisión del sustrato en esta reacción. La omisión de la parte de brazo estabilizador de la partzima B (reacción (ii)) no resultó en ningún incremento en la señal en el tiempo indicando que este componente es esencial para el ensamblaje de MNAzimas activas en este sistema. Una reacción control que carecía de un facilitador del ensamblaje (reacción (iii)) también mostró una ausencia de incremento de fluorescencia en el tiempo.

20 Estas reacciones representan dos estados alternativos para los complejos de oligonucleótidos. La MNAzima activa (reacción (i)) representa el complejo activo (estado "activado"). Las reacciones en las que se omite bien un componente de brazo estabilizador de la partzima (reacción (ii)), o un componente facilitador del ensamblaje (reacción (iii)), son representativas de complejos de MNA inactivos (estados "inactivos"). Como tal, la actividad catalítica de la MNAzima puede regularse por la presencia o ausencia de varios oligonucleótidos y/o por la capacidad de dichos componentes oligonucleotídicos de ser funcionalmente activos, por ejemplo ser capaces de
25 hibridar con otros componentes oligonucleotídicos para formar MNAzimas estables o complejos de MNAzima. El brazo truncado se diseña para ser insuficiente para permitir el ensamblaje de MNAzima estable en las condiciones de la reacción, a no ser que esté acompañado de un componente de brazo estabilizador. El brazo estabilizador, y el facilitador del ensamblaje, pueden funcionar como interruptores "de activación" para la actividad de MNAzima.

30 **Figura 4: Representación de un diseño ejemplar para un complejo inhibidor de ácido nucleico inactivo multi-componente (MNAi) (lado izquierdo) y una MNAzima activa (lado derecho):** Se forma un complejo MNAi cuando las partzimas A y B forman un complejo con un componente facilitador del ensamblaje y un inhibidor de la actividad (lado izquierdo). El complejo MNAi inactivo es capaz de interaccionar con, pero no de modificar catalíticamente, el sustrato. En algunas realizaciones, el inhibidor de la actividad puede incluir además un conector lábil o escindible (indicado por la flecha punteada), que puede separar dos o más dominios en el inhibidor de la actividad. Dichos
35 dominios pueden incluir, por ejemplo, (i) una parte de inhibidor de la actividad que es sustancialmente no complementaria a los componentes partzima y que ejerce un efecto inhibidor mediante la alteración de la estructura secundaria requerida para la formación de una MNAzima catalíticamente activa y (ii) una parte facilitador del ensamblaje activadora, que si se separa de la parte de inhibidor de la actividad, puede funcionar como un componente facilitador del ensamblaje y dirigir el ensamblaje de una MNAzima activa.

40 **Figura 5: Demostración de la actividad catalítica de varios complejos de ácidos nucleicos multi-componente.** Todas las reacciones contenían partzima A, partzima B, y un sustrato marcado con una pareja de marcadores fluoróforo apantallador. Además, las reacciones contenían bien (i) un facilitador del ensamblaje F1/2, (ii) un facilitador del ensamblaje que comprende las partes F1 y F2 (cuya secuencia conjuntamente corresponde a la del facilitador del ensamblaje F2/2), (iii) parte del facilitador del ensamblaje F1 y un inhibidor de la actividad que contiene
45 dos dominios unidos correspondientes a una parte de inhibidor de la actividad y parte con la misma secuencia que F2 o (iv) sin facilitador del ensamblaje o inhibidor de la actividad.

50 El cambio en la fluorescencia se monitorizó en el tiempo como una medida de la escisión catalítica del sustrato por una MNAzima activa (Figura 5). La fluorescencia se incrementó rápidamente en reacciones que contenían bien el facilitador del ensamblaje F1/2 o los componentes de facilitador del ensamblaje F1 y F2, lo que indica la formación de MNAzimas activas 1 y 2 respectivamente, siendo las dos capaces de escindir el sustrato. Por el contrario, la reacción que contenía F1 y el inhibidor de la actividad no mostró ningún incremento en la fluorescencia en el tiempo, lo que indica la formación de complejos MNAi inactivos. No se observó ningún incremento en la fluorescencia en ausencia del facilitador del ensamblaje.

55 **Figura 6: Estructuras ejemplares para diseños variantes de MNAzima.** Algunos ejemplos de complejos MNAzima activos se muestran en los Paneles A a D. Estas estructuras son todas capaces de formar enzimas catalíticamente activas, que pueden modificar, por ejemplo escindir, un sustrato (S). Se ilustran esquemas para complejos de MNAzima, que incluyen un facilitador del ensamblaje F1 (panel A), dos componentes de facilitador del ensamblaje F1 y F2 (paneles B y D) o tres componentes de facilitador del ensamblaje F1, F2 y F3 (panel C). El Panel A incluye brazos sensores con regiones auto complementarias en los brazos sensores de la partzima. Los

complejos de MNAzima también pueden incluir uno o más brazos estabilizadores (sA) como se muestra en el panel D.

Figura 7: Una estrategia ejemplar para la modulación de la actividad de MNAzimas. La estrategia en este sistema puede usarse bien como (i) un método para controlar la actividad de la MNAzima usando ligandos como moléculas activadoras, y/o (ii) un método de detección de dianas de ácido nucleico y no ácido nucleico usando apta-MNAzimas.

Los oligonucleótidos de ácido nucleico incluidos en esa estrategia ejemplar de detección con apta-MNAzima incluyen;

a) una partzima;

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

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

d) un sustrato por ejemplo un sustrato informador; y

e) un oligonucleótido inhibidor del ensamblaje que hibrida con la apta-partzima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte del brazo de unión al sustrato de la secuencia de la apta-partzima.

En ausencia de un ligando activador (panel de la izquierda), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima compitiendo así con y bloqueando la unión del sustrato informador. Cuando está presente un ligando activador (panel de la derecha), se une a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y permitiendo así el ensamblaje de un complejo apta-MNAzima activo y la modificación posterior, por ejemplo escisión, del sustrato (como se ilustra) o por ejemplo la ligación de sustratos. Como tal, una apta-MNAzima activa sólo puede formarse y causar un incremento o disminución en la señal, por ejemplo, una señal fluorescente, en presencia de un ligando que pueda unirse a la parte de aptámero de la apta-partzima.

Se apreciará que una secuencia de aptámero podría unirse a, por ejemplo, uno o más de un brazo de sustrato y/o un brazo sensor de una o ambas de las partzimas. Si el aptámero estuviera unido a un brazo sensor la unión del facilitador del ensamblaje podría bloquearse por un oligonucleótido inhibidor del ensamblaje en ausencia de un ligando diana.

Cuando la apta-MNAzima tiene actividad de escisión como se muestra en esta figura, la modificación puede causar por ejemplo un incremento en la fluorescencia por la escisión de un sustrato informador doblemente marcado causando así la separación de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador.

Se apreciará que la modificación realizada por una apta-MNAzima podría ser una modificación distinta de escisión, por ejemplo, ligación de dos sustratos. En este caso, el cambio de la señal podría ser, por ejemplo, una disminución en la fluorescencia después de la ligación de dos sustratos ligables cada uno marcado bien con el fluoróforo o el apantallador de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador.

Esta estrategia con apta-MNAzima también podría usarse para desarrollar interruptores moleculares que pueden activar e inactivar la actividad catalítica de un complejo MNA. Alternativamente, también puede aplicarse a la detección de ligandos diana tanto de ácido nucleico como distintos de ácido nucleico.

Figura 8: Un ejemplo de una cascada de escisión/ligación mediada por una ADNzima con actividad ligasa y una MNAzima con actividad de escisión:

Una ADNzima con actividad ligasa puede ligar un primer oligonucleótido (oligo 1) a un segundo oligonucleótido (oligo 2) para crear un tercer producto de ligación (LP-Oligo 3) con la secuencia de oligo 3 y una unión 2'-5' ARN en la unión de ligación, siempre que el oligo 1 y el oligo 2 tengan extremos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5', por ejemplo, como se muestra. A su vez, el LP-oligo 3 podría escindirse por una MNAzima capaz de escindir en una unión 2'-5' ARN para crear los productos de escisión (CP), CP-oligo 1 y CP-oligo 2, regenerando así productos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5', que pueden participar en ciclos adicionales de ligación.

Otras ADNzimas con actividad ligasa pueden ligar un primer oligonucleótido (oligo 1) a un segundo oligonucleótido (oligo 2) para crear un tercer producto de ligación (LP-Oligo 3) con la secuencia de oligo 3 y una unión 3'-5' ARN en la unión de ligación, siempre que el oligo 1 y el oligo 2 tengan extremos diol 2', 3' y trifosfato 5', por ejemplo. A su vez, el LP-oligo 3 puede escindirse por una MNAzima capaz de escindir en una unión 3'-5' ARN para crear los productos de escisión (CP), CP-oligo 1 y CP-oligo 2, produciendo productos con un fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5'.

Figura 9: Un ejemplo de una reacción en cascada que usa dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos concretamente MNAzimas, que pueden escindir sustratos, y ADNzimas ligasas que pueden ligar sustratos. En la etapa (i) la MNAzima A se forma sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un ácido

nucleico diana) y escinde el sustrato de la MNAzima A liberando un producto A 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la etapa (ii) la ADNzima B con actividad ligasa liga el producto A 5' de la etapa (i) con un sustrato de ligación B 3' creando así un producto de ligación que puede servir como un componente partzima de otra MNAzima C. En la etapa (iii) la partzima/producto de ligación de la etapa (ii) se ensambla con una segunda partzima y un facilitador del ensamblaje C para formar la MNAzima C que puede escindir el sustrato C en dos productos, producto C 5' y producto C 3'.

En la etapa (i) un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana, puede dirigir la formación de una primera MNAzima A. La MNAzima A puede escindir un sustrato A generando así un producto de escisión A 5' que a su vez puede usarse como un sustrato para una ADNzima ligasa B. En la etapa (ii) una ADNzima ligasa B puede ligar el producto de escisión A 5' (también referido como sustrato B 5') generado en la etapa (i) a otro oligonucleótido, sustrato de ligación B 3', creando así una nueva partzima para una MNAzima C. En la etapa (iii) la nueva partzima/producto de ligación generado en la etapa (ii), junto con otra partzima, puede formar una nueva MNAzima C en presencia del facilitador del ensamblaje C que puede escindir un sustrato C en dos productos, producto C 5' y producto C 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato C si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador.

Además, si la secuencia del producto C 5' fuera la misma que el producto A 5' este producto también puede servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima C podría generar de manera constante el sustrato B 5' que a su vez podría ligarse por la ADNzima ligasa B para crear más partzimas para la formación de más MNAzima C. Esta estrategia proporciona una cascada o mecanismo con retroalimentación para la amplificación de la señal después del inicio de una reacción por un analito diana que permite el ensamblaje de MNAzima A. La estrategia en cascada permite la detección de analitos diana después de la amplificación de la señal usando una ADNzima que puede ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir un sustrato.

Figura 10: Ejemplo de una estructura de una MNAzima con actividad ligasa (una MNAzima ligasa). La MNAzima ligasa ejemplar está comprendida por secuencias de partzima que contienen tres dominios incluyendo (i) un brazo sensor que hibrida con un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana), (ii) un dominio que constituye parte de un núcleo catalítico y (iii) un brazo de unión a sustrato (Figura 10A). En presencia del facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana, las partzimas se ensamblan y forman MNAzima ligasas activas. Estas MNAzimas pueden ligar un sustrato 5' con un fosfato cíclico 2'3' y un sustrato 3' con hidroxilo 5' (Figura 10B) para crear productos de ligación que contienen uniones 2'-5' no nativas.

Alternativamente, las MNAzimas podrían ligar dos sustratos con extremo diol 2'3' en el sustrato 5' con un extremo trifosfato 5' en el sustrato 3' para crear productos de ligación que contienen una unión 3'-5' nativa.

Figura 11: Una estrategia ejemplar para reacciones que usan MNAzimas con actividad ligasa y MNAzimas con actividad de escisión.

Una MNAzima con actividad ligasa podría ligar un primer oligonucleótido (A) a un segundo oligonucleótido (B) para crear un tercer producto de ligación (C) con una unión 2'-5' ARN en la unión de ligación, siempre que A y B tengan extremos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5'. A su vez, el producto C podría escindirse por una MNAzima capaz de escindir en una unión 2'-5' ARN para crear los productos de escisión A y B, regenerando así productos fosfato cíclico 2',3' e hidroxilo 5', que pueden participar en ciclos adicionales de ligación.

Otras MNAzimas con actividad ligasa podrían ligar un primer oligonucleótido (A) a un segundo oligonucleótido (B) para crear un tercer producto de ligación (C) con una unión 3'-5' ARN en la unión de ligación, siempre que A y B tengan extremos diol 2', 3' y trifosfato 5'. A su vez, el producto C podría escindirse por una MNAzima capaz de escindir en una unión 3'-5' ARN para crear los productos de escisión A y B, produciendo productos con extremos fosfato cíclico 2',3' e hidroxilo 5'.

Figura 12: Una estrategia para la detección de la señal que usa MNAzimas que escinden y MNAzimas que ligan. En la etapa (i) un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana, puede dirigir la formación de una primera MNAzima A. La MNAzima A puede escindir un sustrato A generando así un producto de escisión A 5' que puede a su vez ser usado como un sustrato para una MNAzima B que tiene actividad ligasa. En la etapa (ii) una MNAzima ligasa B puede ligar el producto de escisión A 5' (también denominado sustrato B 5') generado en la etapa (i) a otro oligonucleótido, sustrato B 3', creando así una nueva partzima para una MNAzima C. En la etapa (iii) la nueva partzima/producto de ligación generado en la etapa (ii), junto con otra partzima, puede formar una nueva MNAzima C en presencia del facilitador del ensamblaje C que puede escindir un sustrato C en dos productos, producto C 5' y producto C 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato C si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador. La estrategia permite la detección de analitos diana usando dos tipos de MNAzimas, concretamente MNAzimas que pueden ligar sustratos (MNAzima ligasas) y MNAzimas que pueden escindir un sustrato (MNAzima escisoras).

Además, si la secuencia del producto C 5' fuera la misma que el producto A 5' este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la

MNAzima C podría estar generando de manera constante el sustrato B 5' que podría a su vez ligarse por la MNAzima ligasa B para crear más partzimas para la formación de más MNAzima C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un analito diana que permite el ensamblaje de MNAzima A.

5 **Figura 13: Representación de una estrategia ejemplar para cambiar un complejo MNA entre el "estado activado" de una MNAzima activa al "estado inactivado" de un complejo MNAi usando una segunda MNAzima con actividad ligasa.** Una MNAzima A activa, que podría ser capaz de modificar (por ejemplo escindir o ligar) un o unos sustratos A podría formarse en presencia del componente facilitador del ensamblaje 1 (AFC 1) y el
 10 componente facilitador del ensamblaje 2 (AFC 2). Una segunda MNAzima B, que tiene actividad ligasa, podría formarse en presencia del facilitador del ensamblaje 3 (AF3) y podría ligar AFC 2 con un componente inhibidor de la actividad (AIC) resultando en la formación de un inhibidor de la actividad (AI). Este AI podría unirse a los componentes partzima para la MNAzima A resultando en la formación de un complejo MNAi inactivo. Como tal, la MNAzima ligasa en este ejemplo puede operar como un interruptor de desactivación para inactivar una MNAzima A. El complejo MNAi inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representan dos estados alternativos para los
 15 componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivado" y el estado "activado" respectivamente.

Figura 14: Representación de un método general para preparar por ingeniería MNAzimas a partir de ADNzimas uni-moleculares.

Muchas ADNzimas tienen estructuras básicas similares con múltiples dominios. Estas ADNzimas tienen un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios de unión a sustrato no conservados ("brazos de sustrato"), que reconocen e hibridan específicamente con el sustrato (estructura de la parte superior izquierda). Los dominios de unión al sustrato pueden personalizarse para cualquier sustrato siempre que el sustrato contenga un sitio que pueda modificarse por la ADNzima.

En la primera etapa, se identifican posiciones en el núcleo catalítico de la ADNzima en los que puede ser dividido, de manera que cada parte parcial del núcleo catalítico pueda distribuirse entre dos secuencias parciales de manera que
 25 los dos núcleos parciales conjuntamente constituyen un núcleo catalítico completo (estructura de la parte superior derecha). Pueden sintetizarse dos oligonucleótidos A y B (partzimas candidatas) (estructura de la parte inferior izquierda). Puede sintetizarse un oligonucleótido A para contener (i) una parte de brazo de unión a sustrato capaz de unirse a un sustrato, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial, y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitador del ensamblaje. Puede sintetizarse un segundo oligonucleótido B de manera que contiene (i) un
 30 brazo de unión al sustrato capaz de unirse al mismo sustrato que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al sustrato en una posición adyacente a la del oligonucleótido A, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial que contiene aquellas bases del núcleo catalítico completo de ADNzima que no están incorporadas en el oligonucleótido A y (iii) una secuencia de brazo sensor capaz de unirse al mismo facilitador del ensamblaje que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al facilitador del ensamblaje en una posición
 35 adyacente a la del oligonucleótido A (estructura de la parte inferior izquierda).

Este proceso puede repetirse haciendo así una serie de parejas de oligonucleótidos A y B que incorporan la estructura y dominios de las partzimas, pero pueden o no tener actividad catalítica en presencia de un sustrato y un facilitador del ensamblaje. Un experto en la técnica apreciará que puede realizarse un proceso similar para una
 40 (parejas de oligonucleótidos A y B de la serie) pueden mezclarse con sustrato(s) que se emparejan con los brazos de sustrato más el o los facilitadores del ensamblaje que se emparejan con los brazos sensores (estructura de la parte inferior derecha) y ensayando para la presencia del mismo tipo de actividad modificadora que la presentada por la ADNzima (parte superior izquierda). Las parejas de oligonucleótidos A y B que pueden catalizar el mismo tipo de modificación de la ADNzima son útiles para el ensamblaje de MNAzimas activas.

45 **Figura 15: Una reacción en cascada usando enzimas de ácidos nucleicos que escinden sustratos, y enzimas que ligan sustratos para formar un nuevo facilitador del ensamblaje.** En esta ilustración el extremo 5' de los oligonucleótidos se indica con un círculo. En la etapa (1) la MNAzima escisora se ensambla en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana) y escinde el sustrato 1 de la MNAzima liberando un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la etapa (2) la ADNzima ligasa (o MNAzima ligasa)
 50 liga el producto de escisión 5' de la etapa (1) a un sustrato de ligación 3' creando así un producto de ligación que puede servir como un facilitador del ensamblaje para otra MNAzima escisora 2. En la etapa (3) el facilitador del ensamblaje formado por ligación en la etapa (2) dirige el ensamblaje de las partzimas que forman MNAzima escisora 2 que escinde el sustrato 2 en dos productos, un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de escisión 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato 2 cuando este sustrato está marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador. La estrategia permite la
 55 detección de analitos diana usando múltiples tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente enzimas que pueden ligar sustratos y enzimas que pueden escindir un sustrato.

Además, si la secuencia del producto 5' de la MNAzima escisora 2 fuera el mismo que el producto 5' de la MNAzima escisora 1 este producto también podría servir como un sustrato para la ligasa y se podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora 2 podría estar generando de manera
 60

constante el sustrato 5' para la ligasa que podría a su vez ligarse por la ligasa para crear más facilitadores del ensamblaje para la formación de más MNAzima escisora 2. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje tal como un ácido nucleico diana que permite el ensamblaje de MNAzima escisora 1.

- 5 **Figura 16: Un posible esquema para una reacción en cascada con retroalimentación que usa dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos concretamente enzimas que pueden escindir sustratos, y enzimas que pueden ligar sustratos.** En esta ilustración el extremo 5' de los oligonucleótidos se indica con un círculo. En la etapa (1) la MNAzima escisora 1 podría ensamblarse sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana) y podría escindir el sustrato 1 de la MNAzima liberando un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de desecho 3'. En la etapa (2) la ADNzima ligasa (o MNAzima ligasa) podría ligar el producto de escisión 5' de la etapa (1) a un sustrato de ligación 3' creando así un producto de ligación que podría servir como un facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 2. En la etapa (3) el facilitador del ensamblaje formado por ligación en la etapa (2) podría dirigir el ensamblaje de las partzimas para formar MNAzima escisora 2 que podría escindir el sustrato 2 en dos productos, un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de escisión 3'. Una señal detectable podría generarse después de la escisión del sustrato 2 si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador.

Además, si la secuencia de uno de los productos de escisión de MNAzima escisora 2 fuera útil como un componente facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 3 esto podría iniciar una cascada con retroalimentación. En este caso, la MNAzima escisora 3 podría tener diferentes brazos sensores que la MNAzima escisora 1 pero podría tener los mismos brazos de sustrato que la MNAzima escisora 1. Así, si la MNAzima escisora 3 se ensamblara en presencia de un componente facilitador del ensamblaje generado por la escisión por la MNAzima escisora 2, y si la MNAzima escisora 3 escindiera el sustrato 1 el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 3 también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación.

En esta reacción en cascada con retroalimentación, la MNAzima escisora 3 podría generar de manera constante el producto de escisión 5' que a su vez podría servir como un sustrato para la ligación por la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) para crear más facilitadores del ensamblaje que podrían dirigir el ensamblaje de más MNAzima escisora 2. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un analito diana) que permite el ensamblaje de MNAzima escisora 1. La estrategia podría permitir la detección de uno o más facilitadores del ensamblaje (por ejemplo analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando una ADNzima o una MNAzima que puede ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir un sustrato.

Definiciones

En la presente memoria se usan determinados términos que tendrán los significados mostrados como sigue.

35 El término "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente solamente". Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tal como "comprenden" y "comprende", tienen de manera correspondiente significados variados.

Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" pueden usarse indistintamente y se refieren a un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de éstos, incluyendo pero no limitado a ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre y pri-microARN, otros ARN no codificadores, ARN ribosomal, derivados de éstos, amplicones de éstos o cualquier combinación de éstos. Como ejemplo no limitativo, la fuente de un ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que comprende fuentes sintéticas, de mamíferos, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, archaea o cualquier combinación de éstas.

El término "oligonucleótido" indica típicamente un segmento de ADN o una molécula de ácido nucleico que contiene ADN, o ARN o molécula que contiene ARN, o una combinación de éstas. Los ejemplos de oligonucleótidos incluyen dianas de ácido nucleico; sustratos, por ejemplo, aquellos que pueden modificarse por una ADNzima o una MNAzima con actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática; cebadores tales como aquellos usados para la amplificación de dianas *in vitro* por métodos tales como PCR; y componentes de complejos de ácidos nucleicos incluyendo pero no limitado a facilitadores del ensamblaje e inhibidores del ensamblaje, activadores, inhibidores de la actividad y/o sustratos, que en determinadas realizaciones, pueden comprender oligonucleótidos como se define en la presente memoria. Las partzimas tal y como se usa en la presente memoria también pueden comprender oligonucleótidos.

55 Un "desplazador" u "oligonucleótido desplazador" es un oligonucleótido que puede unirse a una región monocatenaria en un primer oligonucleótido que comprende al menos una región que es monocatenaria y al menos una región que es bicatenaria mediante las complementariedades de al menos un oligonucleótido adicional; en el que el oligonucleótido desplazador puede causar la disociación del o de los oligonucleótidos adicionales del primer

- oligonucleótido en al menos una región bicatenaria por un proceso de migración de cadena. Durante la migración de cadena la o las regiones de complementariedad entre el o los oligonucleótidos adicionales y el primer oligonucleótido se separan y reemplazan por al menos una región de complementariedad entre el oligonucleótido desplazador y el primer oligonucleótido resultando así en el desplazamiento del o de los oligonucleótidos adicionales. Se requiere que el oligonucleótido desplazador comprenda al menos una región que tiene la misma secuencia que una o más regiones del o de los oligonucleótidos adicionales en la región bicatenaria. El proceso de migración de cadena puede resultar en una nueva región bicatenaria que se forma entre el oligonucleótido desplazador y el primer oligonucleótido y la liberación simultánea del o de los oligonucleótidos adicionales que lo convierte en monocatenario.
- Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" incluyen referencia a cualquier secuencia especificada así como a la complementariedad de secuencia de éstas, a no ser que se indique otra cosa. Los oligonucleótidos pueden comprender al menos una adición o sustitución, incluyendo pero no limitado al grupo que comprende LNA fosforamidita, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxi)metiluridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil tiouridina, dihidrouridina, 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-metoxicarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético, ácido uridina-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, beta D-arabinosil uridina, y beta D-arabinosil timidina.
- El término "derivado" cuando se usa respecto a un ácido nucleico o nucleótido de la presente invención incluye cualesquiera ácidos nucleicos o nucleótidos funcionalmente equivalentes, incluyendo moléculas de fusión producidas íntegramente (por ejemplo, por medios recombinantes) o añadidas posteriormente a la síntesis (por ejemplo, por medios químicos). Dichas fusiones pueden comprender oligonucleótidos de la invención con ARN o ADN añadidos a éstos o conjugados con un polipéptido (por ejemplo, puromicina u otro polipéptido), una molécula pequeña (por ejemplo, psoraleno) o un anticuerpo.
- El término "análogo" cuando se usa respecto a un ácido nucleico o nucleótido incluye un compuesto que tiene una estructura física que está relacionada con una molécula o residuo de ADN o ARN, y puede ser capaz de formar un enlace de hidrógeno con un residuo de ADN o ARN o un análogo de éste (es decir, es capaz de hibridar con un residuo de ADN o ARN o un análogo de éste para formar un emparejamiento de bases), pero dicho enlace no se requiere para que dicho compuesto se englobe en el término "análogo". Dichos análogos pueden poseer diferentes propiedades químicas y biológicas respecto al residuo de ribonucleótido o desoxirribonucleótido con el que están estructuralmente relacionados. Los residuos metilados, yodados, bromados o biotinilados son ejemplos de análogos. Se han descrito ADNzimas activas que contienen análogos de nucleótidos, incluyendo desoxiinosina, C-5-imidazol desoxiuridina, 3-(aminopropinil)-7-deaza-dATP, 2'-O-metil ARN, cubierta 2' O-metilo (Warashina *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2004; Sidorov *et al.*, 2004). Otros análogos también podrían ser compatibles con la actividad catalítica de las ADNzimas y MNAzimas. La alteración de un ácido nucleico con actividad catalítica, por ejemplo por sustitución de una base por otra, por sustitución de un análogo por una base, o alteración del componente de azúcar o núcleo de fosfodiéster, pueden ser sencillas para el experto en la técnica. Por ejemplo, las alteraciones pueden hacerse durante la síntesis, o por modificación de bases específicas después de la síntesis. El ensayo empírico de los ácidos nucleicos catalíticos que incorporan alteraciones tales como cambios de bases o análogos de bases permite la evaluación del impacto de las secuencias alteradas, o análogos específicos, en la actividad catalítica. Los análogos de las bases A, C, G, T y U son conocidos en la técnica, y un subconjunto se lista en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de análogos de nucleótidos útiles en la presente memoria

Abreviatura	Nombre
ac4c	4-acetilcitidina
chm5u	5-(carboxihidroxi)metiluridina
Cm	2'-O-metilcitidina
Cmnm5s2u	5-carboximetilaminometil tiouridina
D	Dihidrouridina

Abreviatura	Nombre
Fm	2'-O-metilpseudouridina
Galq	beta, D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metilguanosina
1	Inosina
i6a	N6-isopenteniladenosina
m1a	1-metiladenosina
m1f	1-metilpseudouridina
m1g	1-metilguanosina
M11	1-metilinosina
m22g	2,2-dimetilguanosina
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	Éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético
o5u	Ácido uridina-5-oxiacético (v)
Osyw	Wibutoxosina
P	Pseudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocitidina
s2t	5-metil-2-tiouridina

Abreviatura	Nombre
s2u	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metiluridina
t6a	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-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-arabinosiltimidina

Los términos "enzima de ácidos nucleicos", "ácido nucleico catalítico", "ácido nucleico con actividad catalítica", y "enzima de ácidos nucleicos catalítica" se usan en la presente memoria indistintamente y deben significar un ADN o molécula o complejo que contiene ADN o un ARN o molécula o complejo que contiene ARN o una combinación de éstos, siendo una molécula o complejo híbrido ADN-ARN, que pueden reconocer al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los residuos de nucleótidos en los ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir las bases A, C, G, T, y U, así como derivados y análogos de éstos. Los términos anteriores incluyen enzimas de ácidos nucleicos uni-moleculares que pueden comprender un único ADN o molécula que contiene ADN (también conocido en la técnica como una "enzima de ADN", "desoxirribosima" o "ADNzima") o un ARN o molécula que contiene ARN (también conocido en la técnica como una "enzima de ARN" o "ribosima") o una combinación de éstas, siendo una molécula híbrida ADN-ARN que puede reconocer al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los términos anteriores incluyen enzimas de ácidos nucleicos que comprenden un ADN o complejo que contiene ADN o un ARN o complejo que contiene ARN o una combinación de éstos, siendo un complejo híbrido ADN-ARN que puede reconocer al menos un sustrato y catalizar una modificación (tal como ligación o escisión) de al menos un sustrato. Los términos "enzima de ácidos nucleicos", "ácido nucleico catalítico", "ácido nucleico con actividad catalítica", y "enzima de ácidos nucleicos catalítica" incluyen en su significado MNAzimas.

El término "MNAzima" o "enzima de ácidos nucleicos multi-componente" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a dos o más secuencias oligonucleotídicas (por ejemplo, partzimas) que, sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima (por ejemplo, una diana), forma una enzima de ácidos nucleicos activa que es capaz de modificar catalíticamente un sustrato. Las MNAzimas pueden catalizar un rango de reacciones incluyendo la escisión de un sustrato, ligación de sustratos y otras modificaciones enzimáticas de un sustrato o sustratos. Una MNAzima ejemplar que comprende partzima A y partzima B que tiene actividad de escisión se representa en la Figura 1. Las MNAzimas con actividad endonucleasa o de escisión también se conocen como "MNAzima escisoras". Respecto a la Figura 1, las partzimas A y B cada una se une a un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick). La MNAzima sólo se forma cuando los brazos sensores de las partzimas A y B hibridan adyacentes entre sí en el facilitador del ensamblaje. Los brazos de sustrato de la MNAzima reclutan el sustrato, cuya modificación (por ejemplo, escisión) es catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima, formado por la interacción de los dominios catalíticos de las partzimas A y B. La escisión de un sustrato informador quimérico ADN/ARN se ejemplifica en el dibujo. La MNAzima escinde el sustrato entre una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador, generando así una señal. Los términos "enzima de ácidos nucleicos multi-componente" y "MNAzima" se usan en la presente memoria indistintamente y comprenden estructuras bipartitas, compuestas por dos moléculas, o estructuras tripartitas, compuestas por tres moléculas de ácido nucleico, u otras estructuras multipartitas, por ejemplo aquellas formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico. El término "complejo de MNAzima" se refiere a un complejo formado por una MNAzima ensamblada con al menos uno de sus sustratos. La MNAzima o complejo de MNAzima puede comprender un aptámero y ser referida como una apta-MNAzima o complejo de apta-MNAzima, respectivamente.

El término "MNAzima ligasa" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a MNAzimas con actividad ligasa que comprenden dos o más secuencias oligonucleotídicas (por ejemplo, partzimas) que, sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima que también puede referirse en la presente memoria como un facilitador del ensamblaje ligasa o facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una diana), forma una enzima de ácidos nucleicos activa que es capaz de ligar dos sustratos. Una MNAzima ejemplar con actividad ligasa se ilustra en la Figura 10. La

MNAzima ligasa liga los dos sustratos. El término "MNAzima ligasa" tal y como se usa en la presente memoria comprende estructuras bipartitas, compuestas por dos moléculas, o estructuras tripartitas, compuestas por tres moléculas de ácido nucleico, u otras estructuras multipartitas, por ejemplo aquellas formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico.

5 El término "ligar" tal y como se usa en la presente memoria significa unir dos o más moléculas. Por ejemplo, una "ligasa" es una enzima que cataliza la formación (ligación) de un enlace entre dos o más moléculas de sustrato para hacer una nueva molécula. El término "ligación" o "actividad ligasa" se refiere a la unión de dos o más moléculas de sustrato.

10 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "partzima", "partzima componente" "componente partzima" y "oligonucleótido componente" se refieren a un oligonucleótido que contiene ADN o que contiene ARN o que contiene ADN-ARN, dos o más de los cuales, sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima tal y como se define en la presente memoria, pueden formar conjuntamente una "MNAzima." En determinadas realizaciones preferidas, una o más partzimas componentes, y preferiblemente al menos dos, pueden comprender tres regiones o dominios: un dominio "catalítico", que forma parte del núcleo catalítico que cataliza una modificación;

15 un dominio de "brazo sensor", que puede asociarse con y/o unirse a un facilitador del ensamblaje; y un dominio de "brazo de sustrato", que puede asociarse con y/o unirse a un sustrato. Las ilustraciones de estas regiones o dominios se muestran en la Figura 1 y la Figura 10. Las partzimas pueden comprender al menos un componente adicional incluyendo pero no limitado a un aptámero, referido en la presente memoria como una "apta-partzima."

20 Un ejemplo de una MNAzima que está compuesta por más de dos moléculas se ilustra en la Figura 2(ii). Una partzima puede comprender múltiples componentes, incluyendo pero no limitado a, un componente partzima con un brazo sensor truncado y un componente de brazo estabilizador que estabiliza la estructura de la MNAzima interaccionando bien con un facilitador del ensamblaje (como se representa en la Figura 2(ii)) o con un sustrato.

25 El término "complejo de ácidos nucleicos" se refiere a complejos catalíticamente activos o inactivos que comprenden dos o más componentes seleccionados del grupo que comprende pero no está limitado a, ADNzimas, partzimas, facilitadores del ensamblaje, sustratos, y otros componentes MNA incluyendo brazos estabilizadores, inhibidores de la actividad, inhibidores del ensamblaje y componentes o partes de éstos.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "complejo de ácidos nucleicos" incluye complejos de ácidos nucleicos multicomponentes (complejos MNA). Además, el término "complejo de ácidos nucleicos" incluye enzimas de ácidos nucleicos uni-moleculares formando un complejo con al menos un sustrato, por ejemplo, una ADNzima con actividad de escisión unida a un sustrato o una ADNzima ligasa unida a al menos uno de sus dos sustratos requeridos. El término "complejo de enzimas de ácidos nucleicos" se refiere a un complejo de ADNzima o un complejo de MNAzima. El término "complejo de ADNzima" incluye ADNzimas con al menos un sustrato, por ejemplo, una ADNzima con actividad de escisión unida a un sustrato o una ADNzima ligasa unida a al menos uno de sus dos sustratos requeridos.

35 Los términos "complejo de ácidos nucleicos multi-componente" o "complejo de MNA" se refieren a complejos que comprenden dos o más componentes seleccionados del grupo que comprende pero no está limitado a, partzimas, facilitadores del ensamblaje, sustratos, y otros componentes incluyendo brazos estabilizadores, inhibidores de la actividad, inhibidores del ensamblaje y componentes o partes de éstos. En algunas realizaciones, el complejo de MNA comprende una MNAzima activa. En otras realizaciones, el complejo de MNA es un complejo inactivo tal como un complejo MNAi que también puede referirse en la presente memoria como un complejo de inhibidor de ácido nucleico multi-componente (MNAi) o complejo MNAi. En otras realizaciones más, el complejo MNA es un complejo MNA inactivo que puede carecer de uno o más componentes requeridos para el ensamblaje y/o catálisis por una MNAzima incluyendo, pero no limitado al facilitador del ensamblaje, y las partzimas, o componentes de éstos. En otra realización más, el complejo MNA comprende componentes para una apta-MNAzima en presencia o ausencia

40 de un facilitador del ensamblaje.

45

50 Las referencias a "formar un complejo de ácidos nucleicos capaz de funcionar como una enzima de ácidos nucleicos" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a proporcionar un componente necesario para la formación de una enzima de ácidos nucleicos formando un complejo con su(s) sustrato(s) de manera que la enzima pueda modificar el o los sustratos. "Permitir la formación de un complejo de ácidos nucleicos que funciona como una enzima de ácidos nucleicos" y "permitir que un complejo de ácidos nucleicos funcione como una enzima de ácidos nucleicos" tal y como se usan en la presente memoria se refiere al proceso que ocurre cuando un componente permite la formación de una enzima de ácidos nucleicos formando un complejo con su(s) sustrato(s) de manera que la enzima pueda modificar el o los sustratos.

55 El término "modulador" tal y como se usa en la presente memoria es una entidad que puede incrementar o disminuir la actividad catalítica de un complejo MNA. Los moduladores pueden ser "activadores", que activan o producen la activación de la actividad de una MNAzima. En algunas realizaciones, los moduladores son "inhibidores" que pueden inactivar o inhibir la actividad de la MNAzima o complejo MNAzima, incluyendo pero no limitado a, "inhibidores del ensamblaje" o "inhibidores de la actividad".

Los términos "molécula facilitadora del ensamblaje", "facilitador del ensamblaje", "molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima", "facilitador" y "facilitador del ensamblaje de MNAzima" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a entidades que pueden facilitar el auto-ensamblaje de partzimas componentes para formar una MNAzima catalíticamente activa por interacción con los brazos sensores de la MNAzima. Tal y como se usa en la presente memoria, los facilitadores del ensamblaje pueden facilitar el ensamblaje de MNAzimas que tienen actividad de escisión, ligasa u otras actividades enzimáticas. El término "facilitador del ensamblaje de ligasa" se refiere a un facilitador del ensamblaje que facilita el ensamblaje de una MNAzima con actividad ligasa. Un facilitador del ensamblaje para MNAzimas con actividad ligasa también puede referirse por cualquiera de los demás términos anteriores. En realizaciones preferidas, se requiere un facilitador del ensamblaje para el auto-ensamblaje de una MNAzima. Un facilitador del ensamblaje puede estar comprendido por una molécula, o puede estar comprendido por dos o más "componentes facilitadores del ensamblaje" que pueden emparejarse con, o unirse a, los brazos sensores de una o más "partzimas" oligonucleotídicas. Las partes de facilitador del ensamblaje pueden estar contenidas en otros componentes, por ejemplo, en una molécula inhibidora de la actividad, cuando están presentes en un estado en el que no pueden contribuir al ensamblaje de MNAzima activa hasta que se liberan del componente, por ejemplo, por escisión. Los facilitadores del ensamblaje pueden estar comprendidos por una (por ejemplo, Figura 1, Figura 2(ii)) o más moléculas (por ejemplo, Figura 2(i), Figura 4-6).

El facilitador del ensamblaje puede ser una diana. La diana puede ser un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificadores, ARN ribosómico, derivados de éstos, amplicones o cualquier combinación de éstos. El ácido nucleico puede amplificarse. La amplificación puede comprender una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación en círculo rodante, amplificación mediada por transcripción, replicación de secuencia auto-sostenida, reacción en cadena de la ligasa, amplificación basada en secuencias de ácido nucleicos o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

Un "activador" tal y como se usa en la presente memoria es cualquier componente oligonucleotídico MNA estructural o modulador, cualquier "ligando", "diana", o "evento" que resulta en activación de MNAzimas. Los oligonucleótidos activadores incluyen, pero no están limitados a, un facilitador del ensamblaje o componente facilitador del ensamblaje; un oligonucleótido desplazador; una partzima o componente de ésta, por ejemplo aquellas con truncamientos del brazo sensor o de sustrato, y componentes del brazo estabilizador de la partzima.

En otras realizaciones, los activadores pueden activar MNAzimas eliminando oligonucleótidos que ejercen un efecto inhibitor. Los ejemplos de oligonucleótidos que pueden activar a través de dicho mecanismo incluyen oligonucleótidos moduladores que pueden desplazar (eliminar) componentes inhibitor, o partes de éstos, incluyendo pero no limitado a, un "inhibidor de la actividad" o un "inhibidor del ensamblaje".

El término "diana" tal y como se usa en la presente memoria incluye cualquier entidad, constituyente o analito natural o sintético, que se quiere detectar, identificar o cuantificar por un método que usa una enzima de ácidos nucleicos particular tal como una MNAzima(s), con o sin una etapa y/o cascada de amplificación adicional. Las dianas engloban por lo tanto el rango más amplio de entidades, constituyentes o analitos detectables para los que son deseables métodos de detección, identificación y/o cuantificación sensibles. Algunas dianas ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, ácido nucleico, proteína, polipéptido, péptido, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, archaea, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de éstos. Otras dianas también se contemplan para uso en la presente memoria. Se entenderá que la diana también puede ser un facilitador del ensamblaje o activador.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "evento detectable" incluye un cambio en el microentorno de una MNAzima o complejo MNAzima y/o complejo MNA inactivo, por ejemplo, un complejo MNAi o un complejo que comprende componentes para una apta-MNAzima en presencia de un inhibidor del ensamblaje. El cambio puede ser, por ejemplo, manipulación física, un cambio en la temperatura, un cambio en el pH, concentración de sal, carga eléctrica, carga magnética, un cambio en la concentración de uno o más analitos, aniones, cationes, quelantes o un cambio en la concentración de MNA o componentes moduladores, o cualquier combinación de éstos. También se entenderá que la referencia a un "cambio en la concentración de" incluye un incremento o una disminución en la concentración y también incluye la aparición de una entidad, incluyendo cualquier componente(s) para uno o más complejos MNA, por ejemplo un facilitador del ensamblaje o componente facilitador del ensamblaje, que estaba previamente ausente o a concentración indetectable en el microentorno del complejo MNA, incluyendo uno o más componente(s) para uno o más complejos MNA incluyendo MNAzimas y apta-MNAzimas, complejos MNAzima y complejos apta-MNAzima y/o complejos MNA inactivos.

Las entidades que representan eventos detectables también pueden usarse como "activadores" o "inhibidores" de la actividad catalítica de las MNAzimas ya que los cambios en el microentorno pueden usarse para manipular la actividad catalítica de los complejos MNA. Como tales, estas entidades permiten que la actividad catalítica de las MNAzimas se "active" o "inactive", por ejemplo estimulando la transición de un complejo MNA inactivo a una MNAzima activa, o viceversa. En algunas realizaciones, el evento o entidad estimula el ensamblaje y activación de las MNAzimas. En algunas realizaciones, el evento o entidad estimula el desensamblaje e inactivación de las

MNAzimas. En otras realizaciones, el evento o entidad puede dirigir el ensamblaje o desensamblaje de complejos MNA inactivos. En realizaciones preferidas, el proceso de activación e inactivación de la actividad catalítica de la MNAzima es reversible.

5 Alternativamente, los complejos de ácidos nucleicos multi-componente pueden ser inactivos debido a la composición del microentorno, que puede estimular bien el desensamblaje de los componentes del complejo MNA o el ensamblaje sólo de un subconjunto de aquellas moléculas requeridas para la formación de MNAzimas catalíticamente activas. En algunas realizaciones, el componente activador facilitador del ensamblaje es el producto de una reacción que ocurre en el microentorno del complejo MNA inactivo y/o MNAzima.

10 Un "efecto detectable" o señal "de salida" es un efecto que puede detectarse o cuantificarse como una indicación de que se ha producido la modificación de un o unos sustratos. La magnitud del efecto puede ser indicativa de la cantidad de una entrada tal como un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una diana). El efecto detectable puede detectarse por una variedad de métodos, incluyendo espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación de éstos.

15 Un facilitador del ensamblaje "activador" o parte facilitadora del ensamblaje es una molécula que puede usarse para controlar el ensamblaje de MNAzimas activas o facilitar la transición de complejos de ácidos nucleicos multi-componente inactivos a MNAzimas activas. Dichos complejos de ácido nucleico multi-componente pueden ser catalíticamente inactivos debido a la presencia de un inhibidor de la actividad, tal como en los complejos MNAi.

20 El término "inhibidor de la actividad" se refiere a cualquier entidad que puede unirse a uno o más componentes de un complejo MNA y dirigir el ensamblaje del complejo "MNAi" catalíticamente inactivo (por ejemplo, Figuras 4, Figura 5(iii), Figura 13). La inhibición de la actividad catalítica por el inhibidor de la actividad está mediada por una "parte inhibidora de la actividad", también denominada un "componente inhibidor de la actividad" o un "dominio inhibidor de la actividad" que es sustancialmente non-complementario a las partzimas. En realizaciones preferidas, un inhibidor de la actividad puede comprender varios dominios funcionales distintos, por ejemplo, incluyendo pero no limitado a, dominios funcionales en cualquier combinación seleccionados de un dominio inhibidor de la actividad, un dominio facilitador del ensamblaje, un dominio de sustrato, y/o un dominio informador. Dichos dominios funcionales distintos pueden o no coincidir con varios dominios estructurales distintos en un inhibidor de la actividad. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, un inhibidor de la actividad puede comprender un dominio inhibidor de la actividad que es sustancialmente no complementario a los componentes partzima y que ejerce un efecto inhibidor mediante la alteración de la estructura secundaria requerida para la formación de una MNAzima catalíticamente activa. La presencia de un inhibidor de la actividad dirige el ensamblaje de complejos MNAi inactivos que son capaces de interactuar con, pero no modificar catalíticamente, un sustrato. En algunas realizaciones, un inhibidor de la actividad puede comprender un dominio facilitador del ensamblaje.

35 En algunas realizaciones, el inhibidor de la actividad puede incluir además un conector o sustrato lábil o escindible, que puede estar localizado entre dos o más dominios en el inhibidor de la actividad, por ejemplo un dominio inhibidor de la actividad y un dominio facilitador del ensamblaje activador. La escisión en el sitio del sustrato o conector puede permitir la separación de una parte inhibidora de la actividad de una parte facilitadora del ensamblaje activadora, que puede funcionar como un componente facilitador del ensamblaje y dirigir el ensamblaje de una MNAzima activa.

40 En algunas realizaciones, un componente MNA tal como un inhibidor de la actividad puede conjugarse con otras entidades. En algunas realizaciones, el componente (por ejemplo, inhibidor de la actividad) podría conjugarse con una nanopartícula de oro acoplada a un campo magnético de radio-frecuencia para permitir el control electrónico remoto de la hibridación. En esta estrategia, los campos magnéticos de radio-frecuencia funcionan como antenas que permiten la desnaturalización térmica reversible de oligonucleótidos específicos, a la vez que dejan las moléculas circundantes relativamente inalteradas. En algunas realizaciones, el componente (por ejemplo, inhibidor de la actividad) podría marcarse con biotina para facilitar la captura y aislamiento físico del componente.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, un "inhibidor del ensamblaje" es un componente que inhibe el ensamblaje de una MNAzima o un complejo MNAzima por unión complementaria a un componente esencial de una MNAzima activa o complejo MNAzima, por ejemplo por unión a un componente partzima o un facilitador del ensamblaje o un sustrato. La unión de la secuencia del inhibidor del ensamblaje al menos a un primer componente MNAzima o complejo MNAzima da lugar a la competición entre el inhibidor del ensamblaje y dicho primer componente para unirse a un segundo componente MNAzima o complejo MNAzima. Por ejemplo, el inhibidor del ensamblaje puede unirse bien a un brazo de sustrato de partzima (que se une al sustrato) o un brazo sensor de partzima (que se une al facilitador del ensamblaje). Cuando el inhibidor del ensamblaje es complementario a (y se une a) el brazo de sustrato, compite (y bloquea) la unión del sustrato a la partzima (Figura 7) y por lo tanto bloquea la formación de complejos MNAzima. Cuando el inhibidor del ensamblaje es complementario a (y se une a) el brazo sensor, compite (y bloquea) la unión del facilitador del ensamblaje a la partzima y por lo tanto bloquea la formación de MNAzimas activas. De esta manera un inhibidor del ensamblaje bloquea el ensamblaje de MNAzimas y/o complejos MNAzima. La molécula inhibidora del ensamblaje puede usarse para controlar el ensamblaje de

MNAzimas y complejos MNAzima, y permitir además el desarrollo de estrategias para la detección de analitos tanto distintos de ácido nucleico como de ácido nucleico.

Los términos "sustrato" y "molécula sustrato" tal y como se usan en la presente memoria incluyen cualquier molécula que es capaz de ser reconocida, sobre la que puede actuar o ser modificada por una enzima incluyendo una enzima de ácidos nucleicos. La modificación del o de los sustratos proporciona la señal "de salida" para la monitorización de la actividad del sistema MNA. En realizaciones particulares, uno o más sustratos pueden ser reconocidos y modificados por una enzima. En otras realizaciones, uno o más sustratos pueden ser reconocidos y modificados por un ácido nucleico con actividad catalítica. En realizaciones preferidas, un sustrato o sustratos pueden ser reconocidos y modificados por una MNAzima. La modificación de un sustrato o sustratos puede medirse por la aparición de, o incremento de, un o unos productos de la reacción de modificación, o por la desaparición de, o disminución de, un o unos sustratos modificados en la reacción o reacciones. Se entenderá que la referencia a un sustrato puede referirse al menos a uno de dos o más sustratos cuando se usa en el contexto de una reacción que requiere dos o más sustratos tal como una reacción de ligación.

Un sustrato o sustratos pueden modificarse por varias actividades enzimáticas incluyendo pero no limitado a escisión o ligación. Tal y como se usa en la presente memoria, un sustrato puede incluir un "sustrato escindible" que se puede escindir enzimáticamente o un "sustrato ligable" o "sustrato de ligasa" que se puede ligar enzimáticamente.

Un "sustrato informador" tal y como se usa en la presente memoria es un sustrato (o sustratos) que está particularmente adaptado a facilitar la medida de la desaparición de un sustrato o la aparición de un producto respecto a una reacción catalizada. Los sustratos informadores pueden estar libres en disolución o unidos (o "ligados"), por ejemplo, a una superficie, o a otra molécula. Un sustrato informador puede estar marcado con cualquiera de una gran variedad de medios incluyendo, por ejemplo, fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como apantalladores), marcadores radiactivos, biotina (por ejemplo, biotilación) o marcadores quimioluminiscentes.

Tal y como se usa en la presente memoria, "sustratos genéricos" son sustratos, por ejemplo sustratos informadores, que son reconocidos por y sobre los que actúa catalíticamente una pluralidad de MNAzimas, cada una de las cuales puede reconocer un facilitador del ensamblaje diferente. El uso de dichos sustratos facilita el desarrollo de ensayos separados para la detección, identificación o cuantificación de una amplia variedad de facilitadores del ensamblaje usando MNAzimas estructuralmente relacionadas todas las cuales reconocen un sustrato genérico universal. Estos sustratos genéricos puede estar cada uno marcado independientemente con uno o más marcadores. En realizaciones preferidas, se usan marcadores detectables independientemente para marcar uno o más sustratos genéricos para permitir la creación de un sistema conveniente para detectar independientemente o simultáneamente una variedad de facilitadores del ensamblaje usando MNAzimas. En algunas realizaciones, los sustratos escindidos por las MNAzimas podrían reconstituirse, y por lo tanto reciclarse, usando una MNAzima o ADNzima ligasa. En algunas realizaciones, el o los sustratos escindidos o ligados por las MNAzimas pueden usarse además como componentes o moduladores de MNAzima(s) o ADNzima(s) adicionales.

El término "producto" se refiere a la nueva molécula o moléculas que se producen como resultado de la modificación enzimática de un sustrato. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "producto de escisión" se refiere a una nueva molécula producida como resultados de la actividad de escisión o endonucleasa de una enzima. El término "producto de ligación" se refiere a una nueva molécula producida como resultado de la ligación de sustratos por una enzima.

El término complejo "MNAi" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un complejo MNA que está en un estado catalíticamente inactivo, en el que la actividad catalítica está inhibida por un "inhibidor de la actividad" como se define en la presente memoria. En realizaciones preferidas, el complejo MNAi puede ser catalíticamente inactivo debido a la unión de un oligonucleótido inhibidor de la actividad, por ejemplo, como se representa en la Figura 4, que muestra un diseño ejemplar de un complejo MNAi. Un complejo MNAi puede formarse cuando una partzima A, partzima B, un facilitador del ensamblaje y un inhibidor de la actividad se asocian para formar un complejo inactivo que puede unirse a un sustrato pero no modificarlo.

Tal y como se usa en la presente memoria 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 un nivel estructural mayor del aptámero, tal como, un dominio o bolsillo de unión tridimensional. Los aptámeros pueden unirse por lo tanto a proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, archaea, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, parte o combinación de éstos, o cualquier otra entidad. Los aptámeros preferidos de la presente memoria pueden comprender oligómeros de ADN o ARN monocatenarios cortos que pueden aislarse a partir de bibliotecas complejas de ácido nucleico sintético por un proceso iterativo de adsorción, recuperación y reamplificación. Otros aptámeros preferidos de la presente memoria pueden comprender proteína, polipéptido, péptido o filómeros o una combinación de éstos que tiene la capacidad de reconocer uno o más ligandos. Los aptámeros pueden generarse por lo tanto frente a casi cualquier diana, variando de moléculas pequeñas tales como aminoácidos, o antibióticos a estructuras proteicas y de ácido nucleico. Un aptámero puede usarse para construir interruptores moleculares en

complejos MNA que contienen inhibidores del ensamblaje. La presencia de un ligando activador puede activar la actividad de la MNAzima y la eliminación de un ligando activador puede inactivar la actividad de una MNAzima. Además, los aptámeros pueden usarse para facilitar la detección de ligandos que son ácidos nucleicos o no son ácidos nucleicos. La detección de un ligando puede usarse además para desencadenar una cascada de amplificación.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cascada" se refiere a cualquier sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior. Tal y como se usa en la presente memoria una cascada puede ser una "cascada lineal" en la que las etapas (o etapas de reacción) ocurren en una dirección y la ocurrencia de cada etapa (o paso) es dependiente de la ocurrencia de una etapa o paso anterior. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cascada con retroalimentación" o "cascada de amplificación con retroalimentación" se refiere a cualquier sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior y mediante la cual la ocurrencia de una etapa anterior típicamente depende de procesos u operaciones que ocurren en etapas posteriores. En las cascadas con retroalimentación, el producto de cualquier etapa anterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa posterior y el producto de cualquier etapa posterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa anterior. La cascada puede implicar la activación de un complejo MNAi mediante la eliminación de la influencia de un inhibidor de la actividad o componente de éste.

Una cascada puede incluir por lo tanto, pero no está limitada a, una cascada enzimática o cualquier otra cascada de transducción de la señal. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima con actividad de escisión. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima con actividad ligasa. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de ADNzimas o MNAzimas con actividad ligasa y ADNzimas o MNAzimas con actividad de escisión. En realizaciones preferidas, dicha cascada de amplificación puede implicar la amplificación repetida y por lo tanto cíclica de una señal, en la que la actividad catalítica de una primera enzima de ácidos nucleicos crea una molécula requerida para la modificación de un o unos sustratos por una segunda enzima de ácidos nucleicos, que puede a su vez crear una molécula requerida para la modificación de un o unos sustratos por una o más enzimas de ácidos nucleicos adicionales. En algunas realizaciones, la molécula requerida que se crea puede incluir pero no está limitada a una partzima, una enzima de ácidos nucleicos, por ejemplo una ADNzima, un facilitador del ensamblaje, un componente facilitador del ensamblaje, un sustrato, un brazo estabilizador, un componente o parte de éste o una combinación de éstos. En algunas realizaciones, una cascada puede implicar por lo tanto la producción de un efecto acumulativo, y detectar así una diana poco abundante mediante la generación de una señal a un nivel al que puede 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. En realizaciones preferidas, la cascada puede ser una cascada de amplificación con retroalimentación.

Las abreviaturas siguientes se usan en la presente memoria y a lo largo de la especificación:

MNA: ácido nucleico multi-componente;

complejo de MNA: complejo de ácido nucleico multi-componente; *MNAzima*: enzima de ácidos nucleicos multi-componente;

MNAi: inhibidor de ácido nucleico multi-componente;

ADNzima: enzima ácido desoxirribonucleico;

PCR: reacción en cadena de la polimerasa;

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa;

LNA: ácido nucleico bloqueado;

PNA: ácido nucleico peptídico;

An: analito o diana;

F: fluoróforo;

Q: apantallador;

FAM ó *6-FAM*: 6-Carboxifluoresceína.

BHQ1: Apantallador Black Hole 1

BHQ2: Apantallador Black Hole 2

ARNsh: ARN de horquilla corto

ARNsi: ARN de interferencia corto

ARNm: ARN mensajero

5 *ARNt*: ARN de transferencia

ARNsno: ARN nucleolar pequeño

ARNst: ARN temporal pequeño

ARNsm: ARN modulador pequeño

pre-microARN: microARN precursor

10 *pri-microARN*: microARN primario

GTP: guanosina 5'-trifosfato

CTP: citosina 5'-trifosfato

dATP: desoxiadenosina 5'-trifosfato

ATP: adenosina 5'-trifosfato

15 *LP*: producto de ligación

CP: producto de escisión

oligo: oligonucleótido

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

20 Debe entenderse al inicio, que las figuras y ejemplos proporcionados en la presente memoria son para ejemplificar, y no para limitar la invención y sus diferentes realizaciones.

Según la presente invención, se proporcionan métodos que utilizan complejos de ácidos nucleicos multi-componente (MNA). Los complejos MNA son enzimas activas (MNAzimas) con actividad ligasa. Además, la descripción se refiere a cascadas que también pueden incluir una o más ADNzimas. La descripción también se refiere a métodos que usan estas cascadas para la identificación, detección y cuantificación de facilitadores del ensamblaje tales como dianas.

25 1. Complejos MNA incluyendo MNAzimas y complejos MNA inactivos

La enzima de Ácidos Nucleicos Multi-componente (también referida en la presente memoria como "MNAzimas") e inhibidores de éstas se describen con detalle en US 2007/0231810 presentada el 6 de octubre, 2006 y US 2011/0143338 y en las solicitudes internacionales en tramitación con la presente PCT/AU2006/001473 y PCT/AU2007/001517. Las MNAzimas son capaces de auto-ensamblarse a partir de dos o más componentes oligonucleotídicos, también referido en la presente memoria como partzimas. Los oligonucleótidos partzima se auto-ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima para formar una MNAzima. Las MNAzimas son por lo tanto enzimas de ácidos nucleicos catalíticamente activas. En algunas realizaciones, la presencia de una MNAzima puede detectarse y es indicativa de la presencia de una diana, porque la MNAzima sólo se forma en presencia de la diana, en el que la diana comprende el facilitador del ensamblaje. En la presente memoria se proporciona una amplia variedad de ensayos basados en los principios básicos resaltados anteriormente. En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden oligonucleótidos capaces de formar MNAzimas, y MNAzimas con diferentes secuencias. En algunas realizaciones, al menos uno de los componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje, inhibidor de la actividad o sustrato puede comprender un aptámero que es capaz de unirse a un activador o diana.

40 La presente descripción describe nuevos métodos y aplicaciones para enzimas y complejos de ácidos nucleicos. La descripción proporciona componentes oligonucleotídicos que pueden usarse para formar una MNAzima con actividad ligasa que puede ser útil en la detección de analitos, en formatos de una etapa o en reacciones en cascada de enzimas de ácidos nucleicos.

45 Además, las MNAzimas con actividad ligasa u otras actividades catalíticas modificadoras pueden usarse para manipular la actividad de otras MNAzimas creando nuevos componentes que podrían dirigir la formación de una nueva MNAzima activa o complejo MNAzima o para estimular el ensamblaje de una estructura alternativa que carece de actividad catalítica.

Las MNAzimas con actividad ligasa u otra actividad catalítica pueden crear nuevos componentes para enzimas de ácidos nucleicos o complejos de enzimas de ácidos nucleicos tales como nuevas MNAzima o componentes de complejo MNAzima (por ejemplo, facilitadores del ensamblaje, partzimas, sustratos, brazos estabilizadores) o componentes de complejo ADNzima (por ejemplo, ADNzimas activas o sustratos de ADNzima).

5 Alternativamente, las MNAzimas pueden usarse para dirigir la formación de complejos MNA inactivos, incluyendo complejos MNAi. Los complejos MNAi comprenden componentes oligonucleotídicos, que serían capaces de ser ensamblados en MNAzimas activas en condiciones apropiadas, pero que cuando se ensamblan con un "inhibidor de la actividad" resultan en la formación de complejos que son catalíticamente inactivos. Dichos complejos MNA inactivos se definen en la presente memoria como complejo "MNAi", y dicha inactividad puede resultar de ejercer una influencia inhibitoria por un inhibidor de la actividad. Los complejos MNAi pueden interactuar con el sustrato a través de los brazos de sustrato de los componentes partzima, pero no pueden modificar catalíticamente el sustrato. El inhibidor de la actividad pueden incorporar entidades adicionales para facilitar la eliminación por medios físicos que pueden incluir, pero no están limitados a, entidades tales como ácidos nucleicos unidos, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácido nucleico, grupos biotina, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de péptido-ácido nucleico, resto de radio-frecuencia o cualquier combinación de éstos. El complejo MNAi representa un estado "inactivo" mientras que la transición a una MNAzima representa un estado "activo".

La presente descripción describe MNAzima ligasas y su uso como un mecanismo para cambiar de una MNAzima activa a un complejo MNAi inactivo (Figura 13). La MNAzima ligasa podría usarse para ligar un componente inhibidor de la actividad a un componente facilitador del ensamblaje para crear un inhibidor de la actividad. Cuando un inhibidor de la actividad se une y reemplaza un componente facilitador del ensamblaje en una MNAzima activa, el complejo se cambia a un complejo MNAi inactivo.

Otros complejos MNA pueden contener parte o todos los componentes de una MNAzima pero no son catalíticamente activos porque algunos componentes requeridos no se han asociado para formar una MNAzima activa o el microentorno es incompatible con la actividad catalítica de una MNAzima. La actividad catalítica puede activarse después de la aparición de un evento particular, por ejemplo, incluyendo pero no limitado a, la presencia de un componente activador, por ejemplo, un facilitador del ensamblaje, o un cambio en parámetros incluyendo pero no limitado a un cambio en la temperatura, longitud de onda, presión, concentración de sal, detergente, cationes o cualquier otro parámetro. En algunas realizaciones, la actividad catalítica de una enzima de ácidos nucleicos, tal como una MNAzima que está presente en el microentorno, puede crear un nuevo activador para una nueva enzima de ácidos nucleicos o complejo de enzima de ácidos nucleicos que puede incluir, pero no está limitado a, un facilitador del ensamblaje o una partzima.

En realizaciones preferidas, las MNAzimas están basadas en una o más ADNzimas y/o ribozimas. Se sabe que las ADNzimas y/o ribozimas pueden realizar la modificación catalítica de al menos un sustrato en el que la modificación puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforoato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglucosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

Los componentes partzima más preferidos para MNAzimas están basados en una estructura de ADNzima particular. Las estructuras presentemente preferidas para MNAzimas con actividad de escisión están basadas en ADNzimas que escinden, incluyendo las ADNzimas 10:23 y 8:17. Las estructuras presentemente preferidas para MNAzimas con actividad ligasa están basadas en ADNzima ligasas que ligan sustratos y crean uniones 2' 5', tales como las ADNzimas "7Z81" y "7Z48" y 7Q10, así como ADNzima ligasas que ligan sustratos y crean uniones 3'-5' tales como la 9DB1 ligasa. En varias realizaciones, las MNAzimas y complejos MNA inactivos comprenden una o dos bases de ribonucleótido y bases de desoxirribonucleótido. En realizaciones más preferidas, una MNAzima y complejo MNA inactivo está basado al menos en parte en la estructura de una ADNzima. En otras realizaciones preferidas, las MNAzimas y los complejos MNA inactivos comprenden al menos algunas bases de desoxirribonucleótido o análogos de éstas. En realizaciones más preferidas, las partes de núcleo catalítico de la partzima ensambladas en una MNAzima comprenden una o más bases de desoxirribonucleótido o análogos de éstas. En realizaciones aún más preferidas, una o más bases de desoxirribonucleótido o análogos de éstas están implicadas en la catálisis de un sustrato por una MNAzima. En otras realizaciones, al menos una base de desoxirribonucleótido, o su análogo, en el núcleo catalítico mejora la actividad catalítica de una MNAzima. En otras realizaciones más, existe un requerimiento estricto para al menos una base de desoxirribonucleótido, o su análogo, en el núcleo catalítico de la MNAzima para que se produzca la catálisis en una proporción mensurable, respecto a la de una MNAzima comparable en la que no está presente la base de desoxirribonucleótido.

La presente descripción describe MNAzima ligasas que son capaces de auto-ensamblarse a partir de dos o más componentes oligonucleotídicos, también referidos en la presente memoria como partzimas. Los oligonucleótidos partzima se auto-ensamblan en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje de MNAzima ligasa para formar una MNAzima ligasa. Las MNAzima ligasas son por lo tanto ligasas de ácido nucleico catalíticamente activas.

5 Una MNAzima ejemplar con actividad ligasa que comprende una primera partzima y una segunda partzima se representa en la Figura 10. Respecto a la Figura 10, la primera partzima y la segunda partzima cada una se une a un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick). La MNAzima ligasa sólo se forma cuando los brazos sensores (i) de la primera partzima y la segunda partzima hibridan adyacentes entre sí en el facilitador del ensamblaje. Los brazos de sustrato (iii) de la MNAzima reclutan los sustratos, cuya modificación (ligación) está catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima ligasa, formado por la interacción de los dominios catalíticos (ii) de la primera partzima y la segunda partzima. La ligación de dos sustratos de ácido nucleico se ejemplifica en el dibujo.

15 En algunas realizaciones, la presencia de una MNAzima con actividad ligasa puede detectarse y es indicativa de la presencia de una diana, porque la MNAzima ligasa sólo se forma en presencia de la diana, en el que la diana comprende el facilitador del ensamblaje. En la presente memoria se proporciona una amplia variedad de ensayos basados en los principios básicos resaltados anteriormente. En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden oligonucleótidos capaces de formar MNAzimas ligasas, y MNAzimas ligasas con diferentes secuencias.

20 Por ejemplo, las estructuras de MNAzima ligasa están basadas en una o más ADNzima ligasas. Más preferidas son aquellas estructuras de MNAzima ligasa que están basadas en una estructura de ADNzima ligasa particular. Las estructuras presentemente preferidas están basadas en ADNzima ligasas incluyendo las ADNzima ligasas 7Q10, 7Z81, 7Z48 y 9DB1.

25 Un facilitador del ensamblaje tal como un ácido nucleico diana puede detectarse usando una MNAzima con actividad ligasa. En un escenario, el suministro de ácido nucleico diana es la etapa iniciadora que resulta en la formación de una MNAzima con actividad ligasa. Respecto a la Figura 12, el ácido nucleico diana iniciador sería el facilitador del ensamblaje B y el facilitador del ensamblaje A sería una molécula sintética incluida para dirigir el ensamblaje de la MNAzima A. La MNAzima A tendría entonces el único propósito de generar un sustrato ligable B 5' con un extremo fosfato cíclico 2'3' en una reacción que podría añadirse a la reacción que detecta el facilitador del ensamblaje diana B usando una MNAzima B con actividad ligasa. Esta estrategia podría proporcionar un método práctico para producir sustratos con extremos específicos tales como fosfatos cíclicos 2'3' que pueden ser costosos de sintetizar y pueden ser relativamente inestables. Además, respecto a la Figura 12, las partzimas MNAzima A y el facilitador del ensamblaje A podrían reemplazarse por una ADNzima con actividad de escisión presente bien en una reacción preliminar separada para la generación de un sustrato ligable o la ADNzima podría estar presente en la misma mezcla de reacción que la MNAzima con actividad ligasa. El Ejemplo 11 demuestra que la escisión y la ligación usando una combinación de una MNAzima y una ADNzima pueden realizarse en una única mezcla de reacción.

35 Según se proporciona en la presente memoria, las MNAzimas y los complejos MNA inactivos pueden contener una o más sustituciones tales como análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones del núcleo de azúcar o fosfato, varias deleciones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier combinación de éstas, muy conocidas para los expertos en la técnica. Dichas modificaciones, sustituciones, deleciones, inserciones, etc pueden hacerse en los brazos sensores y/o de sustrato y/o en las partes de núcleo catalítico, de manera que la molécula retiene la actividad catalítica. Las sustituciones y modificaciones en los brazos que unen el sustrato o facilitador del ensamblaje pueden tolerarse bien y de hecho son la base de que se permita la personalización de las moléculas a diferentes sustratos/facilitadores del ensamblaje. Por ejemplo, la modificación de los brazos sensores permitirá la personalización a diferentes facilitadores del ensamblaje, mientras que la modificación de los brazos de sustrato permitirá la personalización a diferentes sustratos. El análisis de múltiples sustratos (por ejemplo, sustratos genéricos) permite la monitorización simultánea de múltiples "efectos detectables" o señales de "salida" como una indicación de la presencia del ensamblaje de múltiples MNAzimas activas en respuesta a un evento/s o entidad/es de entrada (por ejemplo, suministro de facilitador/es del ensamblaje) que entonces son capaces de modificar múltiples sustratos

40 En determinadas realizaciones preferidas, la invención prevé MNAzimas con actividad catalítica que están comprendidas por desoxirribonucleótidos o que se obtienen a partir de dichas moléculas por determinadas modificaciones/sustituciones etc. Como regla general, el reemplazo de la molécula completa, por ejemplo, con ribonucleótidos, dará lugar a la molécula inactiva porque se basa para su actividad en determinados desoxirribonucleótidos clave. De una manera correspondiente, algunos ribonucleótidos en una ribozima pueden sustituirse con desoxirribonucleótidos pero el reemplazo de la molécula completa, por ejemplo, con desoxirribonucleótidos dará lugar a la molécula inactiva.

45 El experto en la técnica apreciará que las MNAzimas con actividad de escisión, ligación u otras actividades enzimáticas, y complejos MNA inactivos comprenden bien desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o incluso ambos. Estas MNAzimas y complejos MNA inactivos que comprenden al menos uno y más preferiblemente, todos, oligonucleótidos con componente desoxirribonucleótido son presentemente preferidas. También se prefieren

60

aquellas MNAzimas y complejos MNA inactivos que comprenden al menos una base desoxirribonucleótido, o su análogo, en al menos uno de los núcleos catalíticos de las partzimas. Aún más preferidas son aquellas realizaciones en las que se requiere una base para la actividad catalítica de una MNAzima con actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática.

- 5 En determinadas realizaciones, al menos un componente de un complejo MNA puede comprender una región de auto complementariedad que puede, en algunas condiciones, formar una estructura en horquilla. En una realización, una región de auto complementariedad puede estar localizada en uno o ambos de los brazos sensores de la partzima. En otra realización, la región de auto complementariedad puede estar localizada en uno o ambos de los brazos de sustrato de la partzima. En otra realización, una región o regiones de auto complementariedad pueden estar presentes en un componente facilitador del ensamblaje, un inhibidor del ensamblaje o un inhibidor de la actividad, o cualquier combinación de éstos. En otras realizaciones, los complejos MNA pueden unirse a sustratos que pueden contener regiones de auto complementariedad.

10 En cualquiera de los aspectos anteriores, la modificación catalítica de al menos un sustrato se selecciona del grupo que consiste en escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglucosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidoato.

15 El experto en la técnica también apreciará que las MNAzimas que comprenden ADN tienen ventajas sobre las ribozimas uni-moleculares o multipartitas, por ejemplo, respecto a la estabilidad y facilidad de uso. También debe apreciarse que en algunas realizaciones, las MNAzimas ofrecen ventajas sobre las enzimas de ácidos nucleicos uni-moleculares, por ejemplo ADNzimas, que sólo pueden reconocer una molécula que funciona tanto como diana como sustrato. Además, la modificación catalítica, por ejemplo escisión, puede destruir la diana/sustrato de la ADNzima y como tal la diana no está disponible para otro ciclo de reconocimiento. Por el contrario, una única MNAzima, por ejemplo una MNAzima con actividad de escisión, puede reconocer al menos dos moléculas, concretamente al menos un facilitador del ensamblaje y al menos un sustrato. Como tal, un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana presente en una muestra, no se modifica catalíticamente en la reacción y permanece disponible para ciclos adicionales de modificación de sustrato por la MNAzima. Además, una única MNAzima que puede actuar en dos sustratos (por ejemplo una MNAzima con actividad ligasa) puede reconocer al menos tres moléculas, concretamente al menos un facilitador del ensamblaje y al menos dos sustratos. Estas propiedades de las MNAzimas las hacen adaptables para sistemas o procesos que requieren que los componentes sean capaces de "leer" una señal "de entrada", por ejemplo detectar la presencia de un facilitador del ensamblaje, y "escribir" una señal "de salida", por ejemplo producir una señal detectable indicativa de la modificación enzimática de un sustrato, o por la creación de un nuevo producto (por ejemplo, un nuevo facilitador del ensamblaje o componente) que puede ser útil como una nueva señal de entrada. Dichos procesos incluyen reacciones en cascada, puertas lógicas y otros procesos. Las MNAzimas podrían por lo tanto proporcionar un mecanismo para la transducción de información, por ejemplo, para recibir una señal de entrada y responder con una respuesta de salida apropiada.

2. Métodos para regular el ensamblaje y desensamblaje de complejos MNA y aplicaciones para su uso.

El ensamblaje y desensamblaje de MNAzimas puede controlarse cambiando el microentorno. Los ejemplos de dichos cambios incluyen, pero no están limitados a, temperatura, tipo y concentración de catión divalente, concentración de sal, pH, aditivos, y la presencia o ausencia de componentes críticos esenciales para el ensamblaje y/o actividad de una MNAzima activa.

El ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas puede regularse de una manera dependiente de la temperatura. En una realización, el ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas puede regularse de una manera dependiente del pH. En una realización, el ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas puede regularse de una manera dependiente de la presencia o ausencia de cationes divalentes o quelantes. En una realización, el ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas puede regularse de una manera dependiente de la sal. En una realización, el ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas puede regularse de una manera dependiente de la concentración iónica.

La MNAzima ensamblada representa un estado "activo", mientras que los componentes del complejo MNA desensamblado representan un estado "inactivo". El ensamblaje y desensamblaje de los complejos MNA puede controlarse por la temperatura. El estado "activo" puede inducirse cambiando la temperatura a una en el intervalo que es compatible tanto con el ensamblaje como la actividad catalítica de una MNAzima o complejo MNAzima. A la inversa, los estados "inactivos" pueden inducirse cambiando la temperatura fuera del intervalo que es compatible bien con el ensamblaje y/o la actividad catalítica de una MNAzima o complejo MNAzima. Las temperaturas de fusión de los componentes de los complejos MNA pueden ajustarse para permitir sólo el ensamblaje en un intervalo de temperatura restringido. Los oligonucleótidos que son particularmente útiles en este aspecto de la descripción

incluyen pero no están restringidos a, componentes del brazo estabilizador, componentes de partzima con brazos sensores truncados y componentes del facilitador del ensamblaje y/o oligonucleótidos moduladores. Los complejos MNA rinden una gran flexibilidad en la que los componentes del diseño básico (Figura 1) se han dividido adicionalmente en subunidades o partes de componente más pequeñas (Figura 2), cuya secuencia puede personalizarse respecto a la temperatura de fusión, la composición y complementariedad de la secuencia, o ausencia de ésta, con otros oligonucleótidos componentes. Respecto a la Figura 2 un experto en técnica apreciará que el brazo de partzima, que está truncado, podría ser cualquiera de los siguientes: el brazo sensor de la partzima A, el brazo sensor de la partzima B, el brazo de sustrato de la partzima A, el brazo de sustrato de la partzima B, o cualquier combinación de éstos.

Respecto a la Figura 6, se muestran diseños ejemplares adicionales para complejos MNAzima activos. Los complejos MNAzima con las estructuras como se ejemplifica en la Figura 6 también podrían usarse para modificar sustratos de maneras distintas de la escisión, por ejemplo, las estructuras de MNAzima también podrían ligar sustratos.

La sensibilidad de una MNAzima a la temperatura puede explotarse para construir termo-sensores y reostatos. Si la temperatura fuera bien demasiado alta, o demasiado baja, para el ensamblaje (hibridación) de los oligonucleótidos componentes, y/o para la actividad catalítica, entonces el sustrato de la MNAzima no se modificaría (por ejemplo, escindiría o ligaría). Si la temperatura fuera permisiva para la actividad de la MNAzima entonces el sustrato se modificaría y se generaría una señal. Un aumento o caída en la temperatura desde una que es incompatible con la actividad de la MNAzima, a otra que es compatible con la actividad de la MNAzima, se detectaría por una señal generada después de la modificación del sustrato por la MNAzima. Las MNAzimas pueden proporcionar así un dispositivo capaz de detectar cambios de temperatura. Un experto en la técnica apreciará que los dispositivos simples que usan MNAzimas para detectar la temperatura podrían aplicarse en muchas industrias incluyendo, por ejemplo, las industrias farmacéuticas, de alimentación y agrícolas

En otras realizaciones, una fuerza magnética puede regular la concentración de cationes y por lo tanto proporcionar un interruptor para modular la actividad de la MNAzima activa e inactiva. Los cationes cargados positivamente se requieren para la actividad catalítica de algunas MNAzimas. Una fuerza magnética podría alternativamente inactivar la actividad de la MNAzima separando físicamente los oligonucleótidos de MNA cargados negativamente, por ejemplo las partzimas, facilitadores del ensamblaje y sustratos o componentes de éstos, de los cationes cargados positivamente, por ejemplo Mg^{2+} . La MNAzima podría entonces ser activada de nuevo permitiendo que los oligonucleótidos de MNA y los cationes entren otra vez en contacto.

En algunas realizaciones, los estados activos "activados" (MNAzima) pueden inducirse usando un pH en el intervalo que es compatible con la actividad. A la inversa, un estado "inactivo" puede inducirse usando un pH fuera del intervalo que es compatible con la actividad. El pH puede usarse además para controlar la actividad de los complejos MNA induciendo la hidrólisis de secuencias lábiles, y así creando o destruyendo un nuevo componente para una MNAzima y/o complejo MNA inactivo.

La presencia o ausencia de cualquier componente de los complejos MNA puede proporcionar bien un interruptor "activo" o "inactivo". El cambio, por ejemplo, de la secuencia oligonucleotídica, la temperatura de fusión y/o concentración puede conseguir una regulación más fina. El amplio alcance para diseños de componentes que pueden ensamblarse en complejos MNA, por ejemplo facilitadores del ensamblaje con dos partes y/o componentes partzima con dos partes (por ejemplo, con dominios sensores y brazos estabilizadores truncados), introduce flexibilidad en los sistemas que puede permitir la personalización (ajuste fino) de las condiciones compatibles con la hibridación y por lo tanto el ensamblaje del complejo MNA. Además, la fuerza y astringencia de la hibridación de la unión de oligonucleótidos específicos en un complejo MNA se ve afectada por muchos factores, incluyendo pero no limitado a, concentración de sal, concentración de cationes, temperatura y presencia o ausencia de aditivos (por ejemplo, DMSO). Como tales, las entidades que afectan la hibridación pueden proporcionar una herramienta para controlar el ensamblaje y desensamblaje de la MNAzima y/o complejos MNA inactivos.

La manipulación física de componentes puede conseguirse, por ejemplo, explotando bien las propiedades físicas de los restos unidos como "ganchos" moleculares, y/o explotando las propiedades inherentes de los oligonucleótidos, por ejemplo, carga negativa, o complementariedad de secuencia. En otra realización, el resto unido permite a los oligonucleótidos ser capturados selectivamente, por ejemplo usando un grupo biotina. En otra realización, el resto contiene una radio de campo magnético de radio-frecuencia para facilitar el control electrónico remoto de la hibridación. Esta estrategia podría diseñarse para permitir la eliminación selectiva de moléculas componentes por la desnaturalización térmica dirigida de oligonucleótidos específicos en un complejo MNA, permitiendo así la activación, o inhibición, de la actividad enzimática dependiendo de si la molécula componente es en sí misma una secuencia activadora o inhibidora. Por ejemplo, el inhibidor de la actividad puede desnaturalizarse selectivamente de un complejo MNAi, permitiendo la transición al estado de MNAzima activa.

Otras estrategias podrían usarse para eliminar la influencia de una molécula activadora o inhibidora y estimular así el ensamblaje o desensamblaje de MNAzimas activas y complejos MNA inactivos tal como complejos MNAi. Por ejemplo, la hibridación entre dos oligonucleótidos en un extremo monocatenario puede causar la migración de cadenas de ADN y la apertura de regiones de ácido nucleico bicatenario. El proceso de apertura de una región

bicatenaria de ácido nucleico por migración de cadena también puede iniciarse en una región monocatenaria que no está en el extremo de un dúplex de ácido nucleico. Por ejemplo, la migración de cadena puede iniciarse en una región monocatenaria que se encuentra entre dos regiones bicatenarias. En una realización, un inhibidor de la actividad podría eliminarse de un complejo MNAi por un oligonucleótido modulador tal como un oligonucleótido desplazador que funciona por migración de cadena. En otra realización, un sustrato de ligasa podría eliminarse de un complejo MNAzima con actividad ligasa por un oligonucleótido modulador tal como un oligonucleótido desplazador que funciona por migración de cadena.

En otras realizaciones, pueden usarse oligonucleótidos complementarios para aventajar y por lo tanto "inactivar" o desactivar componentes oligonucleotídicos, que en sí mismos pueden comprender bien MNAzimas activas o complejos MNAzima o complejos MNA inactivos. Los componentes que se inhiben por esta estrategia pueden comprender componentes activadores o inhibidores bien de MNAzimas o complejos MNA inactivos.

Una estrategia ejemplar alternativa se diseña para facilitar el cambio de un complejo MNA entre el "estado activo" de una MNAzima activa al "estado inactivo" de un complejo MNAi usando una segunda MNAzima con actividad ligasa (o una ADNzima con actividad ligasa). Respecto a la Figura 13, una MNAzima A activa, que podría ser capaz de modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato(s) A podría formarse en presencia del componente facilitador del ensamblaje 1 (AFC 1) y componente facilitador del ensamblaje 2 (AFC 2). Una segunda MNAzima B, que tiene actividad ligasa, podría formarse en presencia del facilitador del ensamblaje 3 (AF3) y podría ligar AFC 2 con un componente inhibidor de la actividad (AIC) causando la formación de un inhibidor de la actividad (AI). Este AI podría unirse a los componentes partzima para la MNAzima A y resultar en la formación de un complejo MNAi A que es inactivo. Como tal la MNAzima ligasa en este ejemplo podría operar como un interruptor inactivador para inactivar la MNAzima A.. Alternativamente, una ADNzima ligasa podría reemplazar la MNAzima B (MNAzima ligasa) y podría operar como un interruptor inactivador para inactivar la MNAzima A. El complejo MNAi inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representarían dos estados alternativos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivo" y el estado "activo" respectivamente. El experto en la técnica reconocerá que los distintos métodos proporcionados en la presente memoria pueden usarse generalmente para modular el ensamblaje o actividad de complejos MNA únicos o de complejos MNA múltiples en una única reacción o ensayo.

3. Uso de las composiciones como interruptores moleculares

Los expertos en la técnica reconocerán y entenderán que la presente invención puede equipararse a un "interruptor" biológico, cuyas aplicaciones se contemplan en la presente memoria. Los ejemplos ejemplares de mecanismos para activar e inactivar la actividad de la MNAzima se listan en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Estados de MNA activo e inactivo y mecanismos para cambiar entre los dos estados.

Tipo	Estado activo "activado"	Estado inactivo "inactivado"	Ejemplo de un mecanismo, que puede inducir la transición entre los estados activo e inactivo.
Ensamblaje de MNAzima o complejo MNAzima	MNAzima o	Componentes completamente o parcialmente desensamblados	La temperatura puede ser compatible o incompatible con el ensamblaje de MNAzimas o complejos MNAzima
y desensamblaje	complejo MNAzima completamente ensamblado	para un complejo MNAzima	Puede proporcionarse o eliminarse un componente esencial MNAzima o complejo MNAzima.
Activación o inactivación de complejos MNA que contienen componentes para una apta-MNAzima y un inhibidor del ensamblaje	Ligando activador presente	Ligando activador ausente	El ligando activador proporciona un interruptor por eliminación de un inhibidor del ensamblaje
	Inhibidor del ensamblaje eliminado	Inhibidor del ensamblaje proporcionado	Eliminación, desplazamiento o modificación del inhibidor del ensamblaje, por ejemplo, por migración de cadena

Tipo	Estado activo "activado"	Estado inactivo "inactivado"	Ejemplo de un mecanismo, que puede inducir la transición entre los estados activo e inactivo.
Estructuras del complejo MNA alternativas	MNAzima	Complejo MNAi	Eliminación, desplazamiento o modificación del inhibidor de la actividad, por ejemplo, por migración de cadena o usando una segunda MNAzima con actividad ligasa para crear un inhibidor de la actividad
Inhibición de la Catálisis	MNAzima más catión, por ejemplo, Mg ²⁺	MNAzima menos cationes, por ejemplo, Mg ²⁺	Separación de los cationes positivos del ADN cargado negativamente (por ejemplo, los componentes MNA) usando, por ejemplo, fuerza magnética

A este respecto, la presencia o ausencia de cualquier componente de los complejos de ácidos nucleicos multi-componente puede proporcionar bien un "activador" o interruptor "activador" o puede proporcionar un inhibidor o interruptor "inactivador".

5 En algunas realizaciones, la presencia o adición de un brazo estabilizador puede proporcionar un interruptor "activador". En una realización, pueden generarse nuevos brazos estabilizadores en el sistema durante una reacción, por ejemplo por escisión de un sustrato, que pueden comprender, por ejemplo, otro componente del complejo MNA. En otras realizaciones, la ausencia, modificación o eliminación de un brazo estabilizador puede proporcionar un interruptor "inactivador".

10 En algunas realizaciones, la presencia de un facilitador del ensamblaje, o un componente de éste, puede proporcionar un interruptor "activador". En algunas realizaciones, pueden generarse nuevos facilitadores del ensamblaje por la escisión por MNAzima de componentes del complejo MNA, por ejemplo, por escisión de un sustrato incluyendo, pero no limitado a, aquellos sustratos que pueden servir como otro componente del complejo MNA tal como un inhibidor de la actividad antes de la modificación por escisión. En algunas realizaciones, los facilitadores del ensamblaje pueden proporcionar sistemas de señales de "entrada" específicas, codificadas en la secuencia. En algunas realizaciones, el facilitador del ensamblaje puede ser reconocido o "leído". En algunas realizaciones, el brazo sensor de partzima puede "leer" las secuencias del facilitador del ensamblaje incluyendo aquellas que se diferencian por una o más bases únicas. En otras realizaciones, la ausencia o eliminación de un facilitador del ensamblaje, o un componente de éste, puede proporcionar un interruptor "inactivador".

20 En algunas realizaciones, pueden generarse componentes de los complejos MNA por ligación de componentes presentes en el medio de reacción. En algunas realizaciones, se crea una partzima por ligación de oligonucleótidos generando de esta manera un nuevo componente partzima que puede asociarse para formar, por ejemplo, una MNAzima activa. En algunas realizaciones, se crea un facilitador del ensamblaje por ligación de oligonucleótidos generando de esta manera un nuevo componente facilitador del ensamblaje que puede facilitar el ensamblaje de un complejo MNA. En algunas realizaciones, puede generarse un sustrato u otra enzima de ácidos nucleicos o
25 componente de éste por ligación de componentes.

La transición entre estados de activación e inactivación puede proporcionar un mecanismo para crear un interruptor molecular, que puede regularse alternando entre las conformaciones activa e inactiva. Dichos interruptores moleculares, pueden aplicarse, por ejemplo, al control de las cascadas de replicación de ácidos nucleicos, o a la regulación de dispositivos autónomos a escala molecular terapéuticos, de diagnóstico y computacionales.

30 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden los componentes para auto-ensamblar complejos MNAi que se auto-ensamblan en presencia de una o más moléculas facilitadoras del ensamblaje de MNAzima y una o más moléculas inhibidoras del ensamblaje para formar complejos MNAi catalíticamente inactivos.

35 Los aspectos de la invención pueden entenderse mejor por referencia a las figuras. La Figura 1 representa un ejemplo de un método básico para ensamblar una MNAzima usando un facilitador del ensamblaje. Más específicamente, se muestran la partzima A y partzima B en la Figura 1, comprendiendo cada una, una (i) parte de brazo sensor, (ii) una parte de brazo de sustrato, y (iii) una parte de núcleo catalítico. En presencia de un facilitador del ensamblaje, las partes de brazo sensor de la partzima A y partzima B pueden hibridar con, y formar pares de

bases con partes complementarias del facilitador del ensamblaje, por ejemplo una secuencia diana de ADN o ARN. Después de ponerse en contacto con el facilitador del ensamblaje de esta manera, la MNAzima se auto-ensambla formando un núcleo catalítico que puede modificar un sustrato que se une por los brazos de sustrato. Preferiblemente, la presencia de la MNAzima se detecta mediante la detección o medida de su actividad catalítica.

5 Los brazos de sustrato de la MNAzima ensamblada pueden reclutar un sustrato, por ejemplo el sustrato informador mostrado en la Figura 1, mediante la interacción de las secuencias complementarias en los brazos de sustrato y el sustrato. Una vez el sustrato se recluta de esta manera con los brazos de sustrato, el núcleo catalítico puede estimular la modificación (por ejemplo, escisión) del sustrato, que a su vez puede medirse o detectarse, directamente o indirectamente. La MNAzima puede ensamblarse alternativamente (activarse) y desensamblarse (inactivarse) usando varios métodos.

10 Uno o más de los brazos sensores de la partzima, los brazos de sustrato de la partzima, el facilitador del ensamblaje y el sustrato puede comprender al menos dos moléculas. En una realización, uno o más componentes para un complejo MNA incluyendo por ejemplo los brazos sensores de la partzima, los brazos de sustrato de la partzima, el facilitador del ensamblaje, el inhibidor de la actividad y el sustrato pueden comprender además al menos un aptámero.

15 El facilitador del ensamblaje puede comprender oligonucleótidos sintéticos que se añaden a la mezcla para dirigir el ensamblaje de los complejos MNA.

20 Respecto a la Figura 2, se muestran diseños ejemplares adicionales para complejos MNAzima activos. La estructura ejemplar para un complejo MNAzima se representa en el panel (i) en el que se requieren múltiples componentes de facilitador del ensamblaje para la formación de una MNAzima. En este diseño, un componente (F1) del facilitador del ensamblaje es complementario a regiones de los brazos sensores tanto de la partzima A como B, mientras que un segundo componente facilitador del ensamblaje (F2) tiene complementariedad bien sólo con la partzima B (según la Figura 2(i)), o sólo la partzima A. Los dos componentes facilitadores del ensamblaje conjuntamente dirigen el ensamblaje de una MNAzima activa que puede modificar (por ejemplo escindir) un sustrato. El panel (ii) representa un diseño ejemplar de un complejo MNAzima en el que el ensamblaje de la partzima A con un componente bi-partito de partzima B en presencia de facilitador del ensamblaje produce una MNAzima activa capaz de modificar (por ejemplo, escindir) un sustrato. En este diseño, la partzima B tiene un brazo sensor truncado (T), que es insuficiente para permitir el ensamblaje de MNAzima estable en ausencia de un segundo componente, referido en la presente memoria como un componente brazo estabilizador (S). Sin embargo, cuando un componente de brazo estabilizador híbrida con el facilitador del ensamblaje en una localización adyacente a la que se une el brazo sensor truncado de la partzima, esto permite el ensamblaje en una MNAzima activa.

25 La MNAzima activa formada por el ensamblaje de una partzima A, un componente de partzima B con un brazo sensor truncado y un componente de brazo estabilizador en presencia de un facilitador del ensamblaje representa un estado "activado". La omisión, eliminación o modificación de cualquiera de las partzimas, el componente de brazo estabilizador de la partzima, o un componente de facilitador del ensamblaje, puede resultar en un estado catalíticamente activo "inactivado". Como tal, la actividad catalítica de la MNAzima puede regularse por la presencia o ausencia de varios oligonucleótidos y/o por la capacidad de dichos componentes oligonucleotídicos de ser funcionalmente activos, por ejemplo ser capaces de hibridar con otros componentes oligonucleotídicos para formar complejos MNA estables. El brazo truncado se diseña para ser insuficiente para permitir el ensamblaje de MNAzima estable en las condiciones de la reacción, a no ser que esté acompañado de un componente de brazo estabilizador. Las partzimas, componente del brazo estabilizador, y el facilitador del ensamblaje, pueden funcionar así como interruptores "activadores" para la actividad de MNAzima.

35 Las reacciones ilustradas en la Figura 3 representan dos estados alternativos para los complejos MNA. La MNAzima activa (reacción (i)) representa el estado "activado". Las reacciones en las que se omite bien un componente de brazo estabilizador de la partzima (reacción (ii)), o un componente facilitador del ensamblaje (reacción (iii)), son complejos de MNA inactivos representativos de los estados "inactivados". Como tal, la actividad catalítica de la MNAzima puede regularse por la presencia o ausencia de varios oligonucleótidos y/o por la capacidad de dichos componentes oligonucleotídicos de ser funcionalmente activos, por ejemplo ser capaces de hibridar con otros componentes oligonucleotídicos para formar MNAzimas estables. El brazo truncado se diseña para ser insuficiente para permitir el ensamblaje de MNAzima estable en las condiciones de la reacción, a no ser que esté acompañado de un componente de brazo estabilizador. El brazo estabilizador y el facilitador del ensamblaje pueden funcionar como interruptores "activadores" para la actividad de MNAzima.

45 Un experto en técnica apreciará que el brazo de partzima, que está truncado, podría ser cualquiera de los siguientes: el brazo sensor de la partzima A, el brazo sensor de la partzima B (como se ilustra en la Figura 2 (ii) y la Figura 3 (i)), el brazo de sustrato de la partzima A, o el brazo de sustrato de la partzima B, o cualquier combinación de éstos.

50 Un experto en la técnica reconocerá que las MNAzimas pueden usarse en estrategias para crear sensores moleculares, interruptores moleculares, y/o moduladores o propagadores de cascadas de auto-replicación autocatalíticas y otros procesos iterativos. Las áreas de uso incluyen, pero no están limitadas a, aplicaciones médicas, veterinarias, agrícolas, en tecnología de alimentos, formación de imágenes y anti-bioterrorismo.

Respecto a la Figura 4, un complejo MNAi se forma cuando las partzimas A y B forman un complejo con un facilitador del ensamblaje y un inhibidor de la actividad (lado izquierdo). El complejo MNAi inactivo es capaz de interactuar con, pero no de modificar catalíticamente, el sustrato. En algunas realizaciones, el inhibidor de la actividad puede incluir además un conector lábil o escindible, que puede separar dos o más dominios en el inhibidor de la actividad. Dichos dominios pueden incluir, por ejemplo, (i) una parte inhibidora que es sustancialmente no complementaria a los componentes partzima y que ejerce un efecto inhibidor mediante la alteración de la estructura secundaria requerida para la formación de una MNAzima catalíticamente activa y (ii) una parte activadora, que si se separa de la parte de inhibidora, puede funcionar como un componente facilitador del ensamblaje adicional y dirigir el ensamblaje de una MNAzima activa.

Respecto a la Figura 4, un complejo de MNAzima activa (lado derecho) puede obtenerse a partir de los componentes del complejo MNAi, después de la modificación del inhibidor de la actividad de manera que se escinde o bisecciona la molécula y separa la (i) parte inhibidora de la actividad y la (ii) parte facilitadora del ensamblaje activadora. La parte facilitadora del ensamblaje activadora liberada es capaz entonces de funcionar como un segundo componente facilitador del ensamblaje, que junto con un primer componente facilitador del ensamblaje, puede dirigir el ensamblaje de los componentes de partzima A y B en una MNAzima activa capaz de modificar catalíticamente un sustrato.

A la inversa, un complejo de MNAzima activa (lado derecho de la Figura 4) puede convertirse en un complejo MNAi inactivo (lado izquierdo de la Figura 4), por ligación o unión de una parte inhibidora de la actividad (i) a la parte facilitadora del ensamblaje activadora (ii) creando así un inhibidor de la actividad.

El complejo MNAi inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representan dos estados alternativos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivo" y el estado "activo" respectivamente.

Respecto a la Figura 13, se describe una estrategia ejemplar para cambiar un complejo MNA del "estado activo" de una MNAzima activa al "estado inactivo" de un complejo MNAi usando una segunda MNAzima con actividad ligasa. Una MNAzima A activa, que podría ser capaz de modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato(s) A podría formarse en presencia del componente facilitador del ensamblaje 1 (AFC 1) y componente facilitador del ensamblaje 2 (AFC 2). Una segunda MNAzima B, que tiene actividad ligasa, podría formarse en presencia del facilitador del ensamblaje 3 (AFC 3) y podría ligar AFC 2 con un componente inhibidor de la actividad (AIC) resultando en la formación de un inhibidor de la actividad (AI). Este AI puede unirse a los componentes partzima para la MNAzima A resultando en la formación de un complejo MNAi A que es inactivo. Como tal, la MNAzima ligasa en este ejemplo puede operar como un interruptor inactivador para inactivar una MNAzima A. El complejo MNAi inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representan dos estados alternativos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivo" y el estado "activo" respectivamente.

4. Métodos usando soportes insolubles y sólidos

También debe entenderse que generalmente los métodos, ya sean multiplexados o no, son aplicables en disolución, o combinados con un soporte insoluble o soporte sólido al que pueden estar unidos uno o más de cualquiera de los componentes del complejo MNA, incluyendo el sustrato o parte de éste. Además, enzimas adicionales o componentes de éstas presentes en una cascada de MNAzima, incluyendo ADNzimas por ejemplo con actividad de escisión y/o ligasa pueden estar unidos a un soporte insoluble o soporte sólido. De acuerdo con esto, al menos una de una ADNzima, un componente partzima, un sustrato, un inhibidor del ensamblaje, un facilitador del ensamblaje o componente facilitador del ensamblaje, un brazo estabilizador y/o un inhibidor tal como un inhibidor de la actividad o inhibidor del ensamblaje pueden estar unidos, conectados o ligados. Además, una parte de al menos uno de un componente partzima, un sustrato o sustratos, un inhibidor del ensamblaje, un facilitador del ensamblaje o componente facilitador del ensamblaje, un brazo estabilizador y/o un inhibidor tal como un inhibidor de la actividad o un inhibidor del ensamblaje pueden estar unidos, conectados o ligados.

Las realizaciones de la presente descripción engloban un soporte insoluble. Como ejemplo, el soporte insoluble podría estar en la forma de un "chip", conocido de otra manera como una matriz o micromatriz, que comprende típicamente una pluralidad de oligonucleótidos acoplados, ligados o unidos de otra manera al chip. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos comprenden ácido nucleico.

En realizaciones particulares, la pluralidad de oligonucleótidos podría comprender una pluralidad de componentes, o partes de éstos, para complejos MNA que incluyen pero no están limitados a, sustratos, y/o partzimas, y/o facilitadores del ensamblaje, y/o inhibidores del ensamblaje, y/o inhibidores de la actividad y/o cualquier combinación de éstos. En realizaciones particulares, la pluralidad de oligonucleótidos podría comprender una pluralidad de oligonucleótidos que son complementarios a un dominio contenido en, y/o unido a, cualquiera de los componentes que comprenden la pluralidad de componentes, o partes de éstos, para complejos MNA. En realizaciones particulares, la pluralidad de componentes, o partes de éstos, para complejos MNA podría comprender oligonucleótidos con más de un dominio funcional que puede comprender un sustrato, y/o una partzima, y/o un facilitador del ensamblaje, y/o un inhibidor del ensamblaje y/o un inhibidor de la actividad y/o cualquier combinación de éstos.

Una pluralidad de oligonucleótidos puede posicionarse en un soporte sólido, por ejemplo un chip, lecho, placa o matriz por cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, por pipeta, impresión con chorro de tinta, impresión de contacto o fotolitografía. El soporte sólido puede estar comprendido por al menos un elemento, comprendiendo cada elemento al menos un oligonucleótido de ácido nucleico. El al menos un elemento puede estar comprendido por una pluralidad de oligonucleótidos de la misma secuencia. El número de elementos que comprenden el soporte sólido puede ser cualquier número, y cuando una pluralidad de elementos está posicionada en un soporte sólido, los elementos pueden estar distanciados a una distancia uniforme o variable, o una combinación de éstas. En algunas realizaciones, los elementos pueden estar posicionados aleatoriamente, determinándose entonces la localización respectiva de cada elemento. El tamaño y forma de los elementos dependerá de la aplicación particular de la presente descripción y pueden combinarse elementos con tamaño y forma diferentes en un único soporte sólido. La superficie del soporte sólido puede ser sustancialmente plana o puede tener características tales como depresiones o protuberancias, y los elementos pueden estar posicionados bien en las depresiones o en las protuberancias. Dichas depresiones pueden proporcionar un reservorio para disoluciones en los que los elementos están sumergidos, o dichas protuberancias pueden facilitar el secado de los elementos. Por ejemplo, los elementos pueden ponerse en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. En algunas realizaciones, el soporte sólido puede incluir identificadores únicos tales como marcas, etiquetas de radio frecuencia, dispositivos integrados tales como microprocesadores, códigos de barras u otros marcadores con el fin de identificar cada uno de los elementos. Los identificadores únicos pueden comprender adicionalmente o alternativamente las depresiones o protuberancias en la superficie de la matriz. Además, los identificadores únicos pueden proporcionar la orientación o identificación correcta del chip. Los identificadores únicos pueden leerse directamente mediante un dispositivo de captura de datos o mediante un escáner o detector óptico.

5. Sistemas de sustrato

También se proporcionan según la presente descripción sistemas de sustrato informadores genéricos, que permiten el desarrollo rápido del sistema permitiendo cambios fáciles en el diseño para crear nuevas MNAzimas y complejos MNA inactivos que reconocen diferentes facilitadores del ensamblaje. Como se discute en la presente memoria, la parte de brazo del sustrato y la parte de núcleo catalítico de las partzimas pueden permanecer inalterados, con cambios sólo en la parte del brazo sensor de una o más partzimas requeridas para nuevos facilitadores del ensamblaje. Se proporciona una secuencia o secuencias de sustrato genérico y el mismo sustrato o sustratos pueden incorporarse por lo tanto en sistemas para varias aplicaciones diversas. Además, el mismo sustrato o sustratos puede incorporarse en los métodos en varias realizaciones en la presente memoria, incluyendo ensayos en los que el sustrato o los sustratos están libres en disolución o están ligados o unidos a un soporte. Puede usarse una serie de sustratos genéricos en una reacción múltiple permitiendo la detección simultánea de múltiples facilitadores del ensamblaje.

En algunos casos, los sustratos que se han escindido por una MNAzima o ADNzima con actividad endonucleasa o de escisión pueden reconstituirse y por lo tanto reciclarse usando una ADNzima ligasa o una MNAzima ligasa. Los sustratos que se han ligado por una ADNzima o MNAzima con actividad ligasa pueden reciclarse como sustratos para una ADNzima o MNAzima con actividad de escisión siempre que la ADNzima o MNAzima escisora pueda escindir el enlace creado por la ligación por la ADNzima o MNAzima ligasa. Alternativamente, una MNAzima con actividad de escisión puede escindir en un sitio en un producto de ligación que no está en la unión de los dos sustratos ligables siempre que se cumplan los requerimientos del sitio de escisión en este sitio.

Como se describe con más detalle más adelante, los complejos MNA tienen una propiedad ventajosa en determinadas realizaciones de ser capaces de utilizar un sustrato o sustratos universal o genérico. Dicho sustrato se muestra en la Figura 1 en una configuración presentemente preferida en la que el sustrato para una MNAzima con actividad de escisión comprende tanto una parte detectable como una parte apantalladora. La parte apantalladora está adaptada para disminuir o eliminar una señal detectable de la parte detectable del sustrato hasta que el sustrato se escinda por una MNAzima. Por ejemplo, la parte apantalladora puede comprender "Black Hole Quencher 1" (BHQ1) o "Black Hole Quencher 2" (BHQ2).

Así, la MNAzima escinde el sustrato entre la parte detectable y la parte apantalladora permitiendo que las dos partes se separen en disolución, permitiendo de esta manera que aparezca o se incremente la señal detectable al distanciarse la parte apantalladora, o eliminarse efectivamente del entorno local de la parte detectable.

Además, pueden diseñarse sustrato(s) para una MNAzima con actividad ligasa, como se muestra en la Figura 10, de manera que un sustrato comprende una parte detectable y un sustrato comprende una parte apantalladora. La parte apantalladora está adaptada para disminuir o eliminar una señal detectable de la parte detectable cuando los sustratos se ligan en un producto de ligación llevando así las partes detectable y apantalladora muy cerca entre sí. Por ejemplo, la parte apantalladora puede comprender "Black Hole Quencher 1" (BHQ1) o "Black Hole Quencher 2" (BHQ2). Además, bien una MNAzima con actividad ligasa o una ADNzima con actividad ligasa podría ligar sustratos llevando la parte detectable de un sustrato muy cerca de la parte apantalladora del segundo sustrato, permitiendo de esta manera que disminuya la señal detectable.

En otro ejemplo, si el sustrato de ligación 5' y el sustrato de ligación 3' estuvieran cada uno marcados con un marcador fluoróforo o apantallador respectivamente (o viceversa) entonces la ligación resultaría en una disminución de la fluorescencia, lo que podría servir como un indicador de la presencia del analito diana.

5 En un formato alternativo, si el sustrato de ligación 5', por ejemplo, estuviera marcado con un resto detectable, por ejemplo un fluoróforo, y el sustrato de ligación 3' estuviera unido en una localización discreta, por ejemplo en un soporte sólido tal como un chip o un lecho, entonces la ligación resultaría en la aparición de una señal en una localización discreta en presencia del analito diana.

10 El uso del sustrato o sustratos genéricos o universales se posibilita a través del diseño de las partzimas componentes de la MNAzima. Mediante la alteración sólo de los brazos sensores de las partzimas, pero dejando los brazos de sustrato inalterados, puede diseñarse una amplia variedad de MNAzimas o complejos MNA inactivos específicos para cada uno de una pluralidad de facilitadores del ensamblaje todos los cuales utiliza un sustrato o sustratos genéricos universales para producir una señal de salida. El experto en la técnica apreciará las ventajas que esto ofrece en términos de eliminar la necesidad de sustratos personalizados o únicos para responder a cada evento o entidad de entrada. La detección de cada nuevo facilitador del ensamblaje requiere sólo uno o más cambios en una o más de las partes del brazo sensor; mientras la parte del brazo del sustrato y la parte del núcleo catalítico pueden permanecer constantes. Así, un único sustrato (por ejemplo, sustrato informador) para una MNAzima escisora, o una única pareja de sustratos ligables para una MNAzima ligasa, puede usarse para la detección de un único facilitador del ensamblaje u otro evento de entrada usando una MNAzima, y/o la detección de múltiples facilitadores del ensamblaje en una serie de sistemas usando MNAzimas alteradas. Una pluralidad de sustratos informadores genéricos escindibles, o parejas de sustratos genéricos ligables, permite la monitorización multiplexada de múltiples MNAzimas en un sistema.

25 En algunos casos, puede ser útil tener diferentes MNAzimas en una mezcla que tiene diferentes brazos sensores y al menos un brazo de sustrato en común. Por ejemplo, respecto a la cascada con retroalimentación ilustrada en la Figura 16, la MNAzima escisora 3 podría tener diferentes brazos sensores que la MNAzima escisora 1 pero puede tener un brazo de sustrato (en una de las partzimas) que es el mismo que la secuencia de un brazo de sustrato de la partzima de la MNAzima escisora 1 que interacciona con esa parte de la secuencia en el sustrato 1 (aquí, la parte 5' del sustrato) que posteriormente se liga por la ligasa. Por lo tanto, en lugar de escindir el sustrato 1, la MNAzima escisora 3 escindiría otro sustrato (referido como sustrato 3) que tiene la misma secuencia en la parte 5' pero que tiene una parte diferente en el extremo 3' (o viceversa) respecto al sustrato escindible 1. El sitio de escisión del sustrato 3 estaría en la unión de aquellas secuencias que comparten los sustratos escindibles 1 y 3 y aquellas que se diferencian. En este caso, cuando la MNAzima escisora 3 se ensamblara en presencia de un componente facilitador del ensamblaje generado por la escisión por la MNAzima escisora 2, y si la MNAzima escisora 3 escindiera el sustrato 3 el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 3 también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación.

35 Además, los sustratos pueden incorporar entidades adicionales tales como ácidos nucleicos marcados, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácido nucleico, grupo biotina, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras péptido-ácido nucleico, resto para campo magnético de radio-frecuencia, o cualquier combinación de éstos.

40 Los sustratos pueden modificarse por una MNAzima proporcionando de esta manera un "efecto detectable" o señal "de salida". En el proceso de detección, la modificación del sustrato por una MNAzima puede implicar, por ejemplo, escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina o escisión de fosforamidato.

50 Como consecuencia de la modificación de sustrato por una MNAzima, puede generarse un efecto detectable y la magnitud del efecto puede por lo tanto ser indicativa de la cantidad de la señal de entrada. El efecto detectable puede detectarse por una variedad de métodos, incluyendo espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de giro electrónico, espectroscopía por polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación espectroscopía de UV, luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación de éstos.

El método puede comprender además cuantificar la magnitud de la señal de salida o efecto detectable. En una realización, el método puede comprender además determinar la magnitud del evento de entrada a partir de la señal de salida cuantificada.

La determinación de la actividad catalítica, por ejemplo por determinación de la presencia del efecto detectable o señal de salida, puede realizarse de una manera que permita cuantificar la actividad catalítica. En una realización, la magnitud del evento detectable puede determinarse a partir de la actividad catalítica cuantificada.

5 Varios grupos han indicado la detección de dianas de ácido nucleico, y otros analitos con lecturas colorimétricas (Elghanian *et al.*, 1997, Mirkin *et al.*, 1996, y Liu y Lu, 2004). La estrategia implica la preparación de lotes de nanopartículas de oro, cada uno de los cuales tiene una secuencia de oligonucleótido de ADN distinta unida a su superficie. Las partículas de oro pueden agregarse entonces por la adición de un "oligonucleótido puente", que tiene complementariedad con las secuencias que están unidas a las partículas de oro. La agregación de las partículas resulta en un cambio concomitante en el color de rojo a azul (Mirkin *et al.*, 1996). La inclusión de una secuencia sustrato de ADNzima en el oligonucleótido puente puede proporcionar un mecanismo para revertir la agregación de las partículas de oro (Liu y Lu, 2004). La activación de ADNzima dependiente de plomo por la adición de plomo, causó la escisión del oligonucleótido puente, la disociación de las partículas de oro y el cambio en color de azul a rojo.

10 Podrían desarrollarse detectores simples para monitorizar los cambios usando este principio y una MNAzima con actividad endonucleasa o ligasa. Los cambios en la temperatura u otras entidades o eventos podrían activar las MNAzimas que podrían modificar los oligonucleótidos puente causando la disociación (en el caso de una escisora) o asociación (en el caso de una ligasa) de las nanopartículas y un cambio en el color.

6. Optimización de los métodos

20 El experto en la técnica entenderá fácilmente que los métodos descritos en la presente memoria pueden optimizarse usando una variedad de parámetros experimentales. Los parámetros experimentales particulares que se optimizan, y el nivel de dicha optimización, dependerán del método particular que se está empleando y/o del evento particular que se va a detectar. Dichos parámetros incluyen, pero no están limitados a, tiempo, temperatura, concentración de sales, detergentes, cationes y otros reactivos incluyendo pero no limitado a dimetilsulfóxido (DMSO), y longitud, complementariedad, contenido GC y punto de fusión (T_m) de los ácidos nucleicos. La temperatura a la que dichos métodos pueden realizarse puede estar en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 96°C, aproximadamente 20°C a aproximadamente 75°C, aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55°C. La temperatura puede ser constante o puede ciclarse entre una temperatura que es compatible con el ensamblaje de un complejo MNA y/o actividad catalítica de una MNAzima y una temperatura que es incompatible con el ensamblaje de un complejo MNA y/o actividad catalítica de una MNAzima.

25 Adicionalmente o alternativamente, una variación en un parámetro, y/o el microentorno, puede usarse para desencadenar la activación del complejo MNA de un estado inactivo a uno activo. Así, un parámetro en el microentorno puede comprender un "activador" como se define en la presente memoria, incluyendo pero no limitado a eventos tales como cambio en la temperatura, longitud de onda, concentración de sales, detergentes, cationes, y concentración de componentes estructurales y moduladores que incluyen pero no están limitados a facilitadores del ensamblaje o componentes del facilitador del ensamblaje, partzimas o componentes de partzima, sustratos, inhibidores del ensamblaje, inhibidores de la actividad y componentes oligonucleotídicos activadores. De acuerdo con esto, dicha optimización de parámetros y/o microentorno puede realizarse con el fin de conseguir el uso de los complejos MNA como elementos de reacciones en cascada o interruptores moleculares.

35 En una realización preferida, en la presente memoria se proporcionan reacciones optimizadas para practicar los métodos de usar complejos MNA. En dichas reacciones optimizadas, la activación de la actividad catalítica, que en algunos casos puede ser por una o más enzimas de ácidos nucleicos en una cascada, se incrementa hasta 10, 20, ó 30 % por encima de las reacciones no optimizadas. Las condiciones de reacción más preferidas mejoran la actividad catalítica al menos un 35%, ó 40%, y preferiblemente hasta un 50% o más. En realizaciones aún más preferidas, las reacciones optimizadas tienen un incremento en la activación de la actividad catalítica de más del 50%, y hasta 66%, 75% o incluso 100%. En realizaciones todavía más preferidas, un método de reacción totalmente optimizado ofrecerá 100, 200 o incluso 300% o más de incremento en la activación de la actividad catalítica. Otras condiciones de reacción preferidas pueden mejorar la activación de la actividad catalítica hasta un 1.000% o más sobre los métodos practicados con condiciones de reacción no optimizadas. Una condición de reacción altamente preferida para optimizar los métodos proporcionados en la presente memoria es la inclusión de determinados cationes divalentes. La actividad catalítica de la mayor parte de las enzimas de ácidos nucleicos puede verse influida de una manera dependiente de la concentración por la concentración de cationes divalentes. Las reacciones optimizadas preferidas se optimizan para uno o más de Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , C^{2+} , No^{2+} , Co^{2+} , M^{2+} , Zn^{2+} , y Pb^{2+} .

7. Métodos usando aptámeros

55 Respecto a la Figura 7, se ilustra un método mediante el cual puede usarse un ligando activador para "activar" o "inactivar" la actividad de la apta-MNAzima. El método usa un inhibidor del ensamblaje para bloquear la actividad de apta-MNAzimas en ausencia de un activador como se ilustra. Estos métodos usan aptámeros que pueden comprender un ácido nucleico, proteína, polipéptido, filómero, péptido o combinación de éstos que tiene la capacidad de reconocer uno o más ligandos. Los aptámeros pueden unirse, por ejemplo, a proteínas, polipéptidos,

péptidos o ácidos nucleicos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, archaea, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualesquiera derivados, partes o combinaciones de éstos, o cualquier otra entidad (Lee *et al.*, 2004).

5 Los aptámeros preferidos de la presente memoria pueden comprender oligómeros de ADN o ARN monocatenarios cortos que pueden aislarse a partir de bibliotecas complejas de ácidos nucleicos sintéticos por un proceso iterativo de adsorción, recuperación y reamplificación. Otros aptámeros preferidos pueden comprender proteína, polipéptido, péptido o filómeros o una combinación de éstos que tiene la capacidad de reconocer uno o más ligandos. Pueden generarse aptámeros que pueden reconocer y unirse a casi cualquier diana, variando de moléculas pequeñas tales como aminoácidos, o antibióticos a estructuras proteicas y de ácido nucleico. En realizaciones preferidas, los aptámeros incluyen, por ejemplo, moléculas de unión a ácidos nucleicos que se generan preferiblemente por técnicas de evolución y selección. Preferiblemente, los aptámeros pueden comprender moléculas de ADN o ARN, o una combinación de ambas, incluyendo pero no limitado a los análogos de nucleótidos según, por ejemplo, la Tabla 1 anterior.

15 Al menos un componente del complejo MNA puede contener al menos un aptámero o parte de éste en el que dicho aptámero o parte de éste se une a un ligando seleccionado del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptido, péptido, organismos enteros, proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, archaea, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualesquiera derivados, partes o combinaciones de éstos, o cualquier otra entidad.

Una apta-MNAzima, por ejemplo, con actividad de escisión o ligasa puede incorporar uno o más aptámeros. El ensamblaje de la apta-MNAzima puede estar dirigido por lo tanto por la presencia o ausencia de uno o más analitos que se unen al aptámero y causan la disociación de un inhibidor del ensamblaje.

25 Un experto en la técnica apreciará que uno o más aptámeros pueden incorporarse en cualquiera de los extremos de la molécula o moléculas facilitadoras del ensamblaje y/o el inhibidor de la actividad. Además, se apreciará que podrían incorporarse múltiples aptámeros en uno o más de los componentes oligonucleotídicos de la partzima. Incluso además, se apreciará que también podrían incorporarse aptámeros en al menos uno de los componentes oligonucleotídicos de la partzima. El facilitador del ensamblaje en las estrategias ilustradas en la Figura 7 puede comprender ADN, ARN, LNA, PNA o una secuencia que contiene uno o más análogos de base de nucleótido. Un experto en la técnica apreciará que podría ser posible reconocer dos moléculas, por ejemplo, un ácido nucleico diana que actúa como el facilitador del ensamblaje, y un ligando que se une al aptámero.

En la estrategia mostrada en la Figura 7, una secuencia de aptámero se incorpora en el extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual sólo se forma una apta-MNAzima activa en presencia del activador.

35 Un experto en la técnica también apreciará que uno o más aptámeros podrían incorporarse en cualquiera de los componentes oligonucleotídicos, incluyendo las partzimas, el facilitador del ensamblaje, inhibidor de la actividad o el sustrato. Además, el aptámero podría incorporarse en cualquier extremo de uno cualquiera de estos oligonucleotídicos.

40 La estrategia ilustrada en la Figura 7 puede usarse bien (i) para proporcionar un método para controlar la actividad de la apta-MNAzima usando ligandos como moléculas activadoras, y/o (ii) para proporcionar un método para la detección de dianas que no son ácidos nucleicos y que son ácidos nucleicos usando apta-MNAzimas. Además, la apta-MNAzima podría ser una primera enzima de ácidos nucleicos en una reacción en cascada diseñada para detectar un rango de dianas ligando. Los oligonucleotídicos de ácido nucleico requeridos para un esquema para la estrategia de detección de apta-MNAzima incluyen;

- 45 a) una partzima;
- b) una apta-partzima que es una partzima con un aptámero incorporado en uno de sus extremos;
- c) un facilitador del ensamblaje que es un oligonucleótido que se une tanto a la apta-partzima como a la partzima permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa;
- d) un sustrato por ejemplo un sustrato informador; y
- 50 e) un oligonucleótido inhibidor del ensamblaje que hibrida con la apta-partzima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte del brazo de unión al sustrato de la secuencia de la apta-partzima.

En ausencia de un ligando activador (Figura 7; panel de la izquierda), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima compitiendo así con y bloqueando la unión del sustrato informador. Cuando un ligando activador está presente (Figura 7; panel de la derecha), se une a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y permitiendo así el ensamblaje de un complejo

55

apta-MNAzima activo y la modificación posterior, por ejemplo escisión, del sustrato (como se ilustra en la Figura 7) o la ligación de sustratos. Como tal, un complejo apta-MNAzima activo sólo puede formarse y causar la generación de una señal fluorescente en presencia de activadores o ligandos que puedan unirse a una parte de aptámero de una apta-partzima.

5 En una realización adicional del esquema de apta-MNAzima ilustrado en la Figura 7, el sistema podría usarse para detectar simultáneamente una combinación de moléculas de ácido nucleico y distintas de ácido nucleico. Como ejemplo, la apta-MNAzima puede usarse para detectar la presencia de (i) una diana de ácido nucleico, que funciona como un facilitador del ensamblaje y dirige la formación del complejo apta-MNA, y (ii) un ligando activador diana (por ejemplo, una proteína o molécula pequeña) que podría desplazar el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y
10 permitir el ensamblaje de un complejo apta-MNAzima activo y la posterior modificación del sustrato.

En otra estrategia usando una apta-MNAzima con actividad ligasa, al menos dos sustratos ligables podrían estar presentes en la reacción, uno de los cuales podría estar marcado con un fluoróforo y el otro de los cuales podría estar marcado con un apantallador. Cuando está presente un ligando activador, se unirá a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y permitiendo así la unión y
15 ligación de los sustratos. Como tales, los complejos apta-MNAzima sólo podrían formarse y causar una disminución en la señal fluorescente en presencia de activadores que pueden unirse a los aptámeros.

En algunas realizaciones, la modulación de la actividad MNAzima puede conseguirse usando un ligando activador diana ácido nucleico o no ácido nucleico como un mecanismo de interruptor. En otras realizaciones, la molécula inhibidora del ensamblaje se manipula por otros medios de manera que se modula la actividad. Por ejemplo, el
20 inhibidor del ensamblaje podría eliminarse por varias estrategias incluyendo desnaturalización térmica selectiva o métodos que usan oligonucleótidos para competir para la unión y/o oligonucleótidos que desplazan que usan la migración de cadena para desplazar los componentes oligonucleotídicos de los complejos MNA.

Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de aptámero para una apta-MNAzima con actividad modificadora, por ejemplo actividad de escisión o ligación, podrían estar unidas a la partzima A o partzima B o
25 ambas. En el esquema anterior, el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a partes del aptámero y el brazo del sustrato de al menos una de las partzimas.

Un experto en la técnica también apreciará que las secuencias de aptámero para una apta-MNAzima podrían estar unidas a los brazos sensores de al menos una de la partzima A o partzima B o ambas. En esta realización, el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se unirá a partes del aptámero y el brazo sensor. En ausencia de un ligando
30 activador, el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima compitiendo así con y bloqueando la unión de un facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje. Cuando un ligando activador estaba presente, se unirá a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y permitiendo así la unión del facilitador del ensamblaje o el componente del facilitador del ensamblaje y dirigiendo el ensamblaje de una apta-MNAzima activa capaz de modificar, por ejemplo escindir o ligar,
35 el sustrato o sustratos. Como tales, las apta-MNAzimas sólo podrían formarse y causar un cambio en la señal fluorescente, por ejemplo un incremento o disminución en la fluorescencia, en presencia de activadores que puedan unirse a aptámeros.

40 Cuando la apta-MNAzima tiene actividad de escisión como se ilustra en la Figura 7, la modificación puede causar por ejemplo un incremento en la fluorescencia por la escisión de un sustrato informador doblemente marcado que resulta en la separación de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador.

Se apreciará que la modificación realizada por una apta-MNAzima podría ser una modificación distinta de escisión, por ejemplo, ligación de dos sustratos. En este caso, el cambio de la señal podría ser, por ejemplo, una disminución en la fluorescencia después de la ligación de dos sustratos ligables cada uno marcado bien con el fluoróforo o el apantallador de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador.

45 Esta estrategia con apta-MNAzima también podría usarse para desarrollar métodos de detección de dianas o interruptores moleculares que pueden activar o inactivar la actividad catalítica del complejo MNA. Además, la estrategia con apta-MNAzima puede comprender la primera etapa en una cascada de enzima de ácidos nucleicos lineal o una cascada de amplificación de enzima de ácidos nucleicos con retroalimentación. La apta-MNAzima también podría aplicarse a la detección simultánea de ambas dianas de ácido nucleico tales como un facilitador del
50 ensamblaje y ligandos diana distintos de ácidos nucleicos tales como los que pueden unirse a aptámeros.

8. Cascadas

Las cascadas son cualquier sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior. En una cascada lineal, las etapas (o etapas de reacción) ocurren en una dirección y la ocurrencia de cada etapa (o paso) es dependiente de
55 la ocurrencia de una etapa o paso anterior. En cascadas con retroalimentación o cascadas de amplificación con retroalimentación puede haber una sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior y mediante la cual la ocurrencia de una etapa anterior depende además de procesos u operaciones que ocurren en etapas posteriores.

En las cascadas con retroalimentación, el producto de cualquier etapa anterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa posterior y el producto de cualquier etapa posterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa anterior.

5 Una cascada puede incluir por lo tanto, pero no está limitada a, una cascada enzimática o cualquier otra cascada de transducción de la señal. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima con actividad de escisión. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima con actividad ligasa. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de ADNzimas o MNAzimas con actividad ligasa y ADNzimas o MNAzimas con actividad de escisión. En realizaciones preferidas, dicha cascada de amplificación puede implicar la amplificación repetida y por lo tanto cíclica de una señal, en la que la actividad catalítica de una primera enzima de ácidos nucleicos crea una molécula requerida para la modificación de un o unos sustratos por una segunda enzima de ácidos nucleicos, que puede a su vez crear una molécula requerida para la modificación de un o unos sustratos por una o más enzimas de ácidos nucleicos adicionales. En algunas realizaciones, la molécula requerida puede incluir pero no está limitada a una partzima, una enzima de ácidos nucleicos, por ejemplo una ADNzima, un facilitador del ensamblaje, un componente facilitador del ensamblaje, un sustrato, un brazo estabilizador, una parte o componente de éste o una combinación de éstos. En algunas realizaciones, una cascada puede implicar por lo tanto la producción de un efecto acumulativo, y detectar así una diana poco abundante mediante la generación de una señal a un nivel al que puede detectarse. Las cascadas pueden emplearse para amplificar una señal, por ejemplo, en aplicaciones en las que un evento de entrada tiene baja intensidad, por ejemplo cuando una diana es poco abundante, y de otra manera no puede proporcionar una señal de salida que sea detectable. En otras realizaciones, pueden emplearse más de dos etapas catalíticas. La cascada puede ser lineal. En una realización preferida, la cascada puede ser exponencial.

25 En las cascadas lineales (por ejemplo, como se ilustra en la Figura 9, 12, 15), cada etapa en la cascada emplea una enzima de ácidos nucleicos, parte o todas de las cuales puede experimentar un recambio múltiple mediante lo cual una única enzima de ácidos nucleicos (por ejemplo, una ADNzima o MNAzima) puede realizar múltiples escisiones o ligaciones u otras modificaciones en una o más etapas en la cascada. El recambio múltiple puede facilitar la amplificación en una o más etapas en la cascada resultando en la amplificación de la señal detectada durante la o las etapas de detección.

Además, una extensión de la cascada lineal podría resultar en una cascada de amplificación con retroalimentación. Si, por ejemplo, la secuencia de un producto de una tercera enzima de ácidos nucleicos fuera la misma que un producto de una primera enzima de ácidos nucleicos entonces dicho producto de la tercera enzima de ácidos nucleicos podría servir también como una molécula que permita funcionar a un segundo complejo de ácidos nucleicos como una segunda enzima de ácidos nucleicos y podría iniciarse una cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la tercera enzima de ácidos nucleicos generaría de manera constante un producto que podría a su vez servir como una molécula que permita funcionar a un segundo complejo de ácidos nucleicos como una segunda enzima de ácidos nucleicos permitiendo así la creación de más producto por la segunda enzima de ácidos nucleicos que podría permitir funcionar al tercer complejo de ácidos nucleicos como una tercera enzima de ácidos nucleicos. Se prevé que esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, analito diana) que podría permitir el ensamblaje de una primera enzima de ácidos nucleicos. La estrategia podría permitir la detección de facilitadores del ensamblaje (por ejemplo analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando por ejemplo una ADNzima (o MNAzima) que podría ligar sustratos y MNAzimas que podrían escindir un sustrato. Una posible cascada con retroalimentación se ilustra en la Figura 16. Otras variaciones de este esquema se describen a lo largo de la especificación.

Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para realizar una cascada como se define en la presente memoria. Un experto en la técnica también apreciará que otras estrategias basadas en las Figuras 9, 12, 15 y 16 podrían implicar la modificación de al menos un sustrato por al menos una MNAzima por una variedad de medios incluyendo, por ejemplo, escisión o ligación. A diferencia de las técnicas de amplificación de diana tales como la reacción en cadena de la polimerasa, o la reacción en cadena de la ligasa, las cascadas lineales y con retroalimentación de enzima de ácidos nucleicos (ADNzima y MNAzima) permiten la amplificación en formatos que no requieren enzimas proteicas para facilitar el proceso. Esto proporciona una ventaja principal sobre estos protocolos de amplificación de diana usados comúnmente. Además, la capacidad de controlar y regular la actividad catalítica de MNAzimas usando varios componentes oligonucleotídicos, tales como componentes del brazo estabilizador o componentes del facilitador del ensamblaje permite que el ensamblaje de MNAzimas esté regulado firmemente por condiciones y componentes en el microentorno. Los expertos en la técnica apreciarán que las cascadas descritas en la presente memoria pueden iniciarse por la formación de una MNAzima o apta-MNAzima activa como se define en la presente memoria.

60 Una herramienta adicional útil en las reacciones en cascada de MNAzima es el uso de oligonucleótidos desplazadores. Los oligonucleótidos desplazadores pueden unirse a regiones monocatenarias en un complejo de ADN que tiene regiones tanto monocatenarias como bicatenarias. Cuando el desplazador se une a la región

monocatenaria de un oligonucleótido (por ejemplo, Oligo 1) puede desplazar la cadena o cadenas complementarias al Oligo 1 (por ejemplo, cOligo1) en las regiones bicatenarias siempre que el desplazador tenga la misma secuencia que el cOligo 1 en las regiones bicatenarias. Esto puede resultar en una nueva estructura bicatenaria que se forma entre el oligonucleótido desplazador y el Oligo 1 y puede causar la liberación del cOligo 1 como un oligonucleótido monocatenario.

Esta estrategia podría ser útil en las reacciones en cascada de MNAzima. Por ejemplo, un producto ligado unido a una MNAzima ligasa tiene varias bases no emparejadas (una región monocatenaria) entre las regiones bicatenarias formadas por complementariedad entre los brazos del sustrato de las partzimas y los sustratos. Si un oligonucleótido desplazador con complementariedad con el sustrato (Oligo 1) se une a la región monocatenaria del sustrato podría desplazar los brazos sensores de la partzima complementarios (por ejemplo, cOligo 1a y cOligo 1b) por migración de cadena y separar las partzimas del producto ligado. Como tal, esto podría incrementar el recambio de la enzima ligasa. El proceso resultaría en una molécula bicatenaria que comprende el desplazador y el producto ligado. Sin embargo, si el producto ligado se requiriera para una etapa posterior en la reacción, por ejemplo, si fuera a actuar como un facilitador del ensamblaje para una MNAzima posterior, entonces sería necesario separar el producto ligado del desplazador. Si el oligonucleótido desplazador fuera más corto que el producto ligado entonces esto resultaría en regiones monocatenarias en los extremos del dúplex formado por el oligonucleótido desplazador y el producto de ligación. En la etapa siguiente, el brazo sensor de la partzima podría unirse a estas regiones monocatenarias y eliminar el oligonucleótido desplazador por migración de cadena resultando así en una nueva MNAzima ensamblada con partzimas (que en sí mismas habrían funcionado como oligonucleótidos desplazadores en este caso) y el producto ligado (ahora funcionando como facilitador del ensamblaje).

En las cascadas son útiles muchas variaciones en la estrategia. Por ejemplo, respecto a la Figura 4 (panel izquierdo) podría ser útil un desplazador para eliminar el inhibidor de la actividad por unión al dominio del inhibidor de la actividad del inhibidor de la actividad y desplazarlo por migración de cadena de manera que el brazo sensor de la partzima se volvería monocatenario y así disponible para unión de un componente de facilitador del ensamblaje.

Las reacciones en cascada de MNAzima podrían aplicarse a un rango de aplicaciones biotecnológicas, especialmente en diagnóstico, pero también en otras áreas tales como aplicaciones médicas, veterinarias, agrícolas, tecnología de los alimentos, formación de imágenes y anti-bioterrorismo. Podrían permitir la detección de proteínas y ácidos nucleicos para diagnóstico de enfermedades, especialmente si facilitan la amplificación de la señal. Los ácidos nucleicos catalíticos y/o las reacciones en cascada pueden usarse para aplicaciones distintas del diagnóstico, por ejemplo, en el campo del análisis computacional e ingeniería biomolecular de dispositivos en nano-escala e interruptores moleculares que pueden usarse en terapéutica.

Las MNAzimas ofrecen ventajas sobre las ADNzimas para uso en varias cascadas. Las ADNzimas sólo pueden reconocer una molécula que es tanto su diana como el sustrato. Aunque la diana/sustrato(s) de la ADNzima puede considerarse para proporcionar la "entrada" y el producto enzimático (la diana/sustrato(s) modificado) puede considerarse la "salida" la ADNzima está limitada en su capacidad de transducir procesos más complejos en cascadas ya que tanto la entrada como la salida son formas meramente alternativas (modificado y no modificado) de la misma molécula(s) de sustrato(s) diana. Además, la modificación catalítica, por ejemplo escisión, puede destruir la diana/sustrato de la ADNzima y como tal la diana no está disponible para otro ciclo de reconocimiento. Por el contrario, una única MNAzima, por ejemplo una MNAzima con actividad de escisión, puede reconocer al menos dos moléculas, concretamente al menos un facilitador del ensamblaje y al menos un sustrato. Un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana presente en una muestra, no se modificaría catalíticamente en la reacción y permanecería disponible para ciclos adicionales de modificación de sustrato por la MNAzima. Además, una única MNAzima que puede actuar en dos sustratos (por ejemplo una MNAzima con actividad ligasa) puede reconocer al menos tres moléculas, concretamente al menos un facilitador del ensamblaje y al menos dos sustratos. Estas propiedades de los complejos MNAzima les hacen útiles en procesos tales como reacciones en cascada que pueden implicar entrada (por ejemplo, una molécula que permite a un complejo de ácidos nucleicos funcionar como una enzima de ácidos nucleicos) y salida (por ejemplo, una molécula que se produce y permite a un complejo de ácidos nucleicos posterior funcionar como una enzima de ácidos nucleicos). Además, estas propiedades de los complejos MNAzima les hacen altamente adecuados para uso en procesos que requieren que los múltiples componentes sean capaces de "leer" (reconocer) una señal de "entrada" (por ejemplo, una molécula puede ser un facilitador del ensamblaje diana o un componente del complejo MNA) y "escribir" una señal de "salida" (por ejemplo, reconocer una entrada y actuar en una molécula para proporcionar una salida; por ejemplo, reconocer una entrada y modificar un sustrato para crear un nuevo producto de reacción útil en una etapa posterior). Las propiedades de MNAzimas y complejos MNAzima son útiles en procesos de una etapa (por ejemplo, detección de una diana) y también, por ejemplo, en sistemas que emplean cascadas, puertas lógicas y otros procesos. Los complejos MNAzimas proporcionan un mecanismo para la transducción de información compleja, por ejemplo, para recibir una señal de entrada y responder con una respuesta de salida apropiada. Como se resalta a lo largo de esta especificación, las ADNzimas pueden ser todavía útiles en cascadas. Algunos ejemplos incluyen la producción de una ADNzima o un sustrato para un complejo ADNzima por una enzima de ácidos nucleicos anterior tal como una MNAzima. Las MNAzimas ligasas son particularmente útiles para preparar, por ejemplo, nuevas ADNzimas. Como tal la información de "salida" de una enzima de ácidos nucleicos generada, por ejemplo, por ligación o escisión por una MNAzima puede proporcionar una "entrada" para el siguiente complejo de enzima de ácidos nucleicos por ejemplo

creando una nueva ADNzima o sustrato, que puede participar en la formación de un complejo ADNzima útil en una etapa de reacción siguiente y/o anterior.

5 Un mecanismo ejemplar para generar una cascada lineal usando una MNAzima y una enzima de ácidos nucleicos con actividad ligasa en un formato diseñado para la detección de dianas se representa en la Figura 9. Esta figura también describe un método general para la detección de dianas. Este método se basa en una ADNzima con actividad ligasa (ADNzima ligasa) para controlar el ensamblaje de una partzima para una MNAzima a partir de al menos uno de los productos de la actividad catalítica de otra MNAzima.

10 La estrategia de la Figura 9 usa una combinación de MNAzimas con actividad de escisión y una ADNzima con actividad ligasa. En la etapa (i) un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un ácido nucleico diana, puede dirigir la formación de una primera MNAzima A. La MNAzima A puede escindir un sustrato A generando así un producto de escisión A 5' que a su vez puede usarse como un sustrato para una ADNzima ligasa B. En la etapa (ii) una ADNzima ligasa B puede ligar el producto de escisión A 5' (también referido como sustrato B 5') generado en la etapa (i) a otro oligonucleótido, sustrato de ligación B 3', creando así una nueva partzima para una MNAzima C. En la etapa (iii) la nueva partzima/producto de ligación generado en la etapa (ii), junto con otra partzima, puede formar una nueva MNAzima C en presencia del facilitador del ensamblaje C que puede escindir un sustrato C en dos productos, producto C 5' y producto C 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato C si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador. Esta cascada proporciona un mecanismo para la amplificación de la señal después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un analito diana) que permite el ensamblaje de MNAzima A. En este formato de cascada lineal, cada etapa emplea una enzima de ácidos nucleicos, parte o toda de la cual puede experimentar recambio múltiple mediante lo cual una única enzima de ácidos nucleicos (por ejemplo, una ADNzima o MNAzima) puede realizar múltiples escisiones, ligaciones u otras modificaciones en una o más etapas de la cascada. El recambio múltiple puede facilitar la amplificación en una o más etapas en la cascada resultando en la amplificación de la señal detectada durante una o más etapas.

25 Otro mecanismo para generar una cascada de MNAzima en un formato diseñado para la detección de dianas se representa en la Figura 12. Esta figura también describe un método general para la detección de dianas. Este método se basa en una combinación de MNAzimas con actividad ligasa y de escisión. La MNAzima ligasa controla el ensamblaje de una partzima para una MNAzima escisora a partir de al menos uno de los productos de la actividad catalítica de otra MNAzima escisora.

30 En la etapa (i) un facilitador del ensamblaje A, por ejemplo un ácido nucleico diana, puede dirigir la formación de una primera MNAzima A. La MNAzima A puede escindir un sustrato A generando así un producto de escisión A 5' que a su vez puede usarse como un sustrato para una MNAzima B que tiene actividad ligasa. En la etapa (ii) una MNAzima ligasa B (formada por los componentes de la partzima de MNAzima B en presencia del facilitador del ensamblaje B) puede ligar el producto de escisión A 5' (también referido como sustrato B 5') generado en la etapa (i) a otro oligonucleótido, sustrato B 3', creando así una nueva partzima para una MNAzima C. En la etapa (iii) la nueva partzima/producto de ligación generado en la etapa (ii), junto con otra partzima, puede formar una nueva MNAzima C en presencia del facilitador del ensamblaje C que puede escindir un sustrato C en dos productos, producto C 5' y producto C 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato C si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador.

40 Además, en el contexto de las Figuras 9 y 12 si la secuencia del producto C 5' fuera la misma que el producto A 5' entonces este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima C generaría de manera constante un sustrato B 5' que podría a su vez ligarse por la enzima de ácidos nucleicos (ADNzima B en la Figura 9 o MNAzima B en la Figura 12) para crear más partzimas para la formación de más MNAzima C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un analito diana) que permite el ensamblaje de MNAzima A. Estas estrategias de cascada con retroalimentación podrían permitir la detección de facilitadores del ensamblaje seguido de la amplificación de la señal usando múltiples tipos de enzimas de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADNzima ligasas o MNAzima ligasas en combinación con MNAzimas que pueden escindir un sustrato (MNAzima escisoras). Se reconocerá que esta clase de cascada con retroalimentación podría usarse en combinación con otras estrategias descritas a lo largo de la especificación. Se apreciará que existen muchas variaciones que podrían aplicarse a cascadas que siguen una estrategia similar a las demostradas en las figuras 9 y 12. Por ejemplo, la ligasa podría usarse para crear productos de ligación que sirven, por ejemplo, como facilitadores del ensamblaje para otra MNAzima con actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática.

55 Un ejemplo de una posible cascada siguiendo una estrategia similar a las Figuras 9 y 12 sería cuando dos o más MNAzimas responden a diferentes facilitadores del ensamblaje (por ejemplo, dianas) y podría usarse en una reacción, proporcionando cada reacción de modificación catalizada por cada MNAzima un diferente producto de modificación (por ejemplo, un producto de escisión o ligación) que podría usarse para participar en una reacción siguiente. Como ejemplo, con referencia a las cascadas de las Figuras 9 y 12, dos o más MNAzimas iniciales que responden a diferentes facilitadores del ensamblaje (por ejemplo, dianas) podrían usarse para proporcionar diferentes productos modificados que podrían participar en la formación de un número correspondiente de complejos

de MNA ligasa que pueden funcionar como enzimas de ácidos nucleicos con actividad ligasa en la siguiente etapa de la reacción. Las ligasas de ácido nucleico podrían hacer varios elementos para la reacción de la MNAzima C, tal como un facilitador del ensamblaje C, una partzima A, B, o componentes de éstos. Así, por ejemplo, una reacción ligasa dirigida por el producto de una MNAzima inicial podría hacer un facilitador del ensamblaje C para la MNAzima C y otra reacción ligasa dirigida por el producto de otra MNAzima inicial podría hacer una partzima para la MNAzima C. En dicho ejemplo, el ensayo podría disponerse de manera que sólo cuando las dos dianas están presentes para dirigir ambas reacciones ligasa y por lo tanto hacer tanto el facilitador del ensamblaje como la partzima, la MNAzima C se ensambla y es catalíticamente activa. Éste sería un mecanismo para la detección de múltiples dianas. Sólo en presencia del número requerido de dianas estaría disponible el número total requerido de elementos de MNAzima C para modificar el sustrato C. En este ejemplo, los elementos añadidos de la mezcla de reacción se personalizarían según cuántos elementos de MNAzima C se producen gracias al reconocimiento de las dianas originales. Así, por ejemplo, si dos dianas se monitorizaran y esto a su vez dirigiera reacciones que resultaran en la creación de un facilitador del ensamblaje C y partzima A para MNAzima C, entonces sólo se necesitaría que estuvieran presentes el componente partzima B para MNAzima C y el sustrato C para permitir la formación de los complejos de MNAzima C y para que continuara la tercera etapa de la reacción.

De manera similar, uno o más facilitadores del ensamblaje (por ejemplo, dianas) podría detectarse y alimentar un número de diferentes elementos en una etapa posterior (por ejemplo, ligación). Por ejemplo, con referencia a la figura 9, una reacción inicial podría proporcionar el sustrato de ligasa 5' y otra reacción inicial podría producir el sustrato de ligasa 3'. Alternativamente, en otro ejemplo similar a la Figura 12, una MNAzima escisora inicial podría producir el sustrato de ligasa 5' para MNAzima B y una MNAzima ligasa inicial podría crear una partzima para la MNAzima ligasa B. Sólo cuando ambos productos están disponibles para participar en la formación de un complejo de MNAzima se modificarán los sustratos de la ligasa y continuará la reacción en cascada. Se entenderá que los diferentes facilitadores del ensamblaje (por ejemplo, dianas) usados en dichas estrategias pueden comprender diferentes moléculas o diferentes secuencias en una molécula, o una combinación. Por ejemplo, tres SNP diferentes en una molécula podrían detectarse por tres MNAzimas diferentes.

Se reconocerá que existen muchas otras variaciones de esta estrategia. El concepto general de usar múltiples dianas para proporcionar un número de diferentes elementos para una reacción en la que todos se requieren para que la reacción continúe es aplicable a muchas reacciones y cascadas. El número de dianas que se detectan puede variar, por ejemplo, pueden detectarse dos o más dianas. Podría aplicarse a una o muchas etapas de una cascada. También podría aplicarse "directamente" proporcionando un componente o componentes para la etapa siguiente en la cascada, o "indirectamente" permitiendo que se produzca una reacción más tarde en la cascada, o varias combinaciones de éstos. Así, por ejemplo, una MNAzima dirigida por una diana podría proporcionar una molécula requerida para la reacción siguiente y otra MNAzima dirigida por otra diana podría proporcionar un producto requerido para la reacción siguiente u otra reacción posterior. Será obvio que también pueden aplicarse otras variaciones. Será obvio que esta estrategia también puede aplicarse a enzimas que producen diferentes modificaciones (por ejemplo, escisión o ligación) como se ha descrito anteriormente. Además, son posibles varias combinaciones de productos preparadas por un número variable de enzimas de ácidos nucleicos que responden a varios números de dianas, que incluyen pero no están limitadas a, partzimas, facilitadores del ensamblaje y otros componentes del complejo MNA. Un número de enzimas de ácidos nucleicos que responden a un número de dianas pueden producir uno o más componentes de una enzimas de ácidos nucleicos adicional o complejo de enzima de ácidos nucleicos o pueden producir todos los componentes de una enzima de ácidos nucleicos adicional o complejo de enzima de ácidos nucleicos.

Otro ejemplo de una reacción en cascada que usa enzimas de ácidos nucleicos que pueden escindir sustratos, junto con enzimas de ácidos nucleicos que pueden ligar sustratos se ilustra en la Figura 15. En este ejemplo, el proceso de ligación resulta en la generación de un nuevo facilitador del ensamblaje. En la etapa (1) la MNAzima escisora 1 se ensambla sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana) y escinde el sustrato 1 de la MNAzima liberando un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la etapa (2) una ADNzima ligasa (o una MNAzima ligasa) liga el producto de escisión 5' de la etapa (1) a un sustrato de ligación 3' creando así un producto de ligación que puede servir como un facilitador del ensamblaje para otra MNAzima escisora 2. En la etapa (3) el facilitador del ensamblaje formado por ligación en la etapa (2) dirige el ensamblaje de las partzimas que forman MNAzima escisora 2 que puede escindir el sustrato 2 en dos productos, un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de escisión 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato 2 si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador. De manera similar a las versiones lineales de las cascadas ilustradas en la Figura 9 y 12, cada etapa en la cascada en la Figura 15 emplea una enzima de ácidos nucleicos, parte o todas de las cuales puede experimentar recambio múltiple mediante lo cual una única enzima de ácidos nucleicos (por ejemplo, una ADNzima o MNAzima) puede realizar múltiples escisiones o ligaciones u otras modificaciones en una o más etapas en la cascada. El recambio múltiple puede facilitar la amplificación en una o más etapas en la cascada resultando en la amplificación de la señal detectada durante una o más etapa(s).

Además, una extensión de la cascada lineal ilustrada en la Figura 15 podría resultar en una cascada de amplificación con retroalimentación. Si la secuencia del producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 2 fuera la misma que el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 1 entonces el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 2 también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima ligasa (o MNAzima ligasa) y podría iniciarse

una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora 2 generaría de manera constante los productos de escisión 5' que a su vez podrían servir como un sustrato para la ligación por la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa) permitiendo así la creación de más facilitadores del ensamblaje que podrían dirigir el ensamblaje de más MNAzima escisora 2. Se prevé que esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, analito diana) que podría permitir el ensamblaje de una MNAzima escisora 1. La estrategia podría permitir la detección de facilitadores del ensamblaje (por ejemplo analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando una ADNzima (o MNAzima) que puede ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir un sustrato. Otras variaciones de este esquema se describen a lo largo de la especificación.

Otro método ejemplar para generar una reacción en cascada con retroalimentación usando dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos concretamente enzimas de ácidos nucleicos que pueden escindir sustratos y enzimas de ácidos nucleicos que pueden ligar sustratos se propone en la Figura 16. La Figura 16 es sólo una de varias variaciones de esta estrategia general. En la etapa (1) la MNAzima escisora 1 se ensambla sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana) y escinde el sustrato 1 de la MNAzima liberando un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de desecho 3'. En la etapa (2) la ADNzima ligasa (o MNAzima ligasa) liga el producto de escisión 5' de la etapa (1) a un sustrato de ligación 3' creando así un producto de ligación que puede servir como un facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 2. En la etapa (3) el facilitador del ensamblaje formado por ligación en la etapa (2) dirige el ensamblaje de las partzimas para formar MNAzima escisora 2 que puede escindir el sustrato 2 en dos productos, un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto de escisión 3'. Una señal detectable puede generarse después de la escisión del sustrato 2 si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador. Además, si la secuencia de uno de los productos de escisión de MNAzima escisora 2 fuera útil como un componente facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 3 esto podría facilitar una cascada con retroalimentación. En este caso, la MNAzima escisora 3 puede tener diferentes brazos sensores respecto a la MNAzima escisora 1 pero requeriría al menos un brazo de sustrato en común con la MNAzima escisora 1 con el fin de proporcionar al menos el mismo sustrato de ligación 5' para participar en la reacción de ligasa de la etapa (ii). (En la Figura 16, suponiendo que es el mismo sustrato que el MNAzima escisora 1 (sustrato 1), los brazos del sustrato serán los mismos para MNAzima escisoras 1 y 3.) En la etapa 4 una MNAzima escisora 3 podría ensamblarse en presencia de un componente de facilitador del ensamblaje generado por la escisión por la MNAzima escisora 2. Además, la MNAzima escisora 3 podría escindir un sustrato y generar un producto de escisión 5' que podría ser el mismo que el producto de escisión 5' producido por la escisión del sustrato 1 por MNAzima escisora 1. A su vez, este producto también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima (o MNAzima) ligasa y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora 3 generaría de manera constante el producto de escisión 5' que a su vez podría servir como un sustrato para la ligación por la ADNzima (o MNAzima) ligasa para crear más facilitadores del ensamblaje que podrían dirigir el ensamblaje de más MNAzima escisora 2. La MNAzima escisora 2 podría producir entonces más componentes del facilitador del ensamblaje para más MNAzima escisora 3 y se crearía una cascada con retroalimentación. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un analito diana) que dirige el ensamblaje de MNAzima escisora 1. La estrategia permitiría la detección de facilitadores del ensamblaje (por ejemplo analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando una ADNzima (o MNAzima) que podría ligar sustratos y MNAzimas que podrían escindir sustratos.

Se entenderá que aunque varios de los ejemplos anteriores se refieren al uso de un producto de escisión 5' como un sustrato de ligación en una reacción posterior, también sería posible usar un producto de escisión 3' como un sustrato de ligación en una reacción posterior, o ambos. Adicionalmente, bien un producto de escisión 5' ó 3', o ambos, podría usarse como un componente de un complejo de enzima de ácidos nucleicos posterior o precedente. También se entenderá que los sustratos ligables pueden tener diferentes extremos dependiendo de la ligasa usada. Por ejemplo, además de los extremos fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5', pueden tener, por ejemplo, extremos diol 2'3' y extremos trifosfato 5' (véase la Tabla 4). Las MNAzimas con actividad de escisión pueden seleccionarse tomando como base la unión que se va a escindir.

En variaciones adicionales de éste y otros ejemplos en la especificación, la ADNzima (o MNAzima) con actividad ligasa podría ligar fragmentos y formar una ADNzima capaz de escindir el sustrato 2 para crear un facilitador del ensamblaje u otro componente para otra MNAzima (marcada como MNAzima escisora 3 en la Figura 16). Como tal, en esta variación la MNAzima escisora 2 podría reemplazarse por una ADNzima escisora. En otra estrategia ejemplar, la ADNzima (o MNAzima) ligasa podría ligar fragmentos y crear una nueva partzima capaz de asociarse con otra partzima y un facilitador del ensamblaje presente en la reacción formando así una MNAzima escisora 2 que podría escindir el sustrato 2 para crear un componente del facilitador del ensamblaje para una MNAzima 3. Son posibles otras variaciones de este esquema y se describen en otro lugar en la especificación.

El experto en la técnica apreciará que son posibles varios complejos MNAzima alternativos y pueden usarse en las cascadas. Varios de estos diseños se ilustran en la Figura 6 en la que algunos ejemplos de complejos MNAzima activos se muestran en los Paneles A a D. Estas estructuras son todas capaces de formar enzimas catalíticamente activas, que pueden modificar (por ejemplo escindir) un sustrato (S). La ilustración contiene esquemas para MNAzimas, que incluyen un facilitador del ensamblaje F1 (panel A), dos componentes de facilitador del ensamblaje

F1 y F2 (paneles B y D) o tres componentes de facilitador del ensamblaje F1, F2 y F3 (panel C). El ejemplo mostrado en el panel A incluye brazos sensores con regiones auto complementarias en los brazos sensores de la partzima. Las MNAzimas también pueden incluir uno o más brazos estabilizadores (sA) como se muestra en el panel D. Las variaciones en un panel podrían usarse en combinación con una variación en otro panel.

- 5 El experto en la técnica apreciará que a lo largo de la especificación se demuestran varias cascadas. También se apreciará que las cascadas tienen naturaleza modular y así son posibles numerosas variaciones en las cascadas. La Tabla 3, siguiente proporciona una lista no exhaustiva de posibles variaciones.

Tabla 3. Algunas cascadas posibles usando combinaciones de MNAzimas o MNAzimas y ADNzimas.

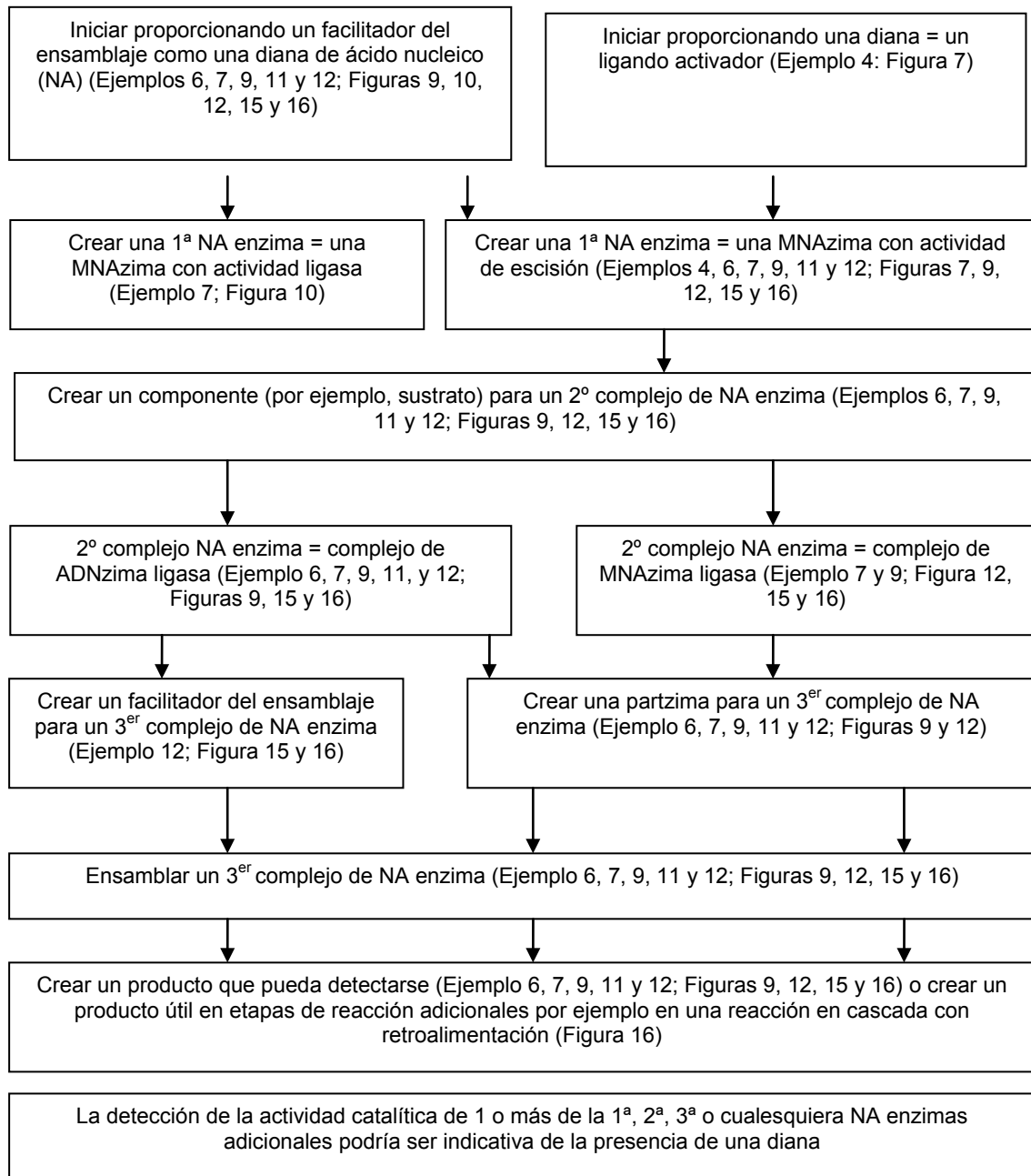
	*Etapa	Enzima	Función
Variación 1 en la puesta a punto del ensayo (por ejemplo, Ejemplo 6, Figura 9; Ejemplo 7 y 9, Figura 12)	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear una nueva partzima para una MNAzima escisora 2 requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima escisora 2	Usa la partzima/producto de ligación de la etapa 2 como un componente para una MNAzima escisora 2 que puede escindir un sustrato.
Variación 2 en la puesta a punto del ensayo (por ejemplo, Ejemplo 12, Figura 15)	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 2 requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima escisora 2	Usa el facilitador del ensamblaje/producto de ligación de la etapa 2 para facilitar el ensamblaje de una MNAzima escisora 2 que puede escindir un sustrato.
Variación 3 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear una nueva ADNzima requerida para la etapa 3.
	3	ADNzima	Usa la ADNzima/producto de ligación de la etapa 2 para modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 4 de la puesta a punto del ensayo (por ejemplo, Ejemplo 13, Figura 16)	1	MNAzima escisora	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear una nueva partzima para una MNAzima requerida para la etapa 3.

	*Etapa	Enzima	Función
	3	MNAzima (por ejemplo, una escisora o ligasa)	Usa la partzima/producto de ligación de la etapa 2 como un componente para otra MNAzima que puede modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato para crear un producto útil como un facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje en la etapa 4.
	4	MNAzima	Usa el facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje generado en la etapa 3 para formar una MNAzima, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 5 en la puesta a punto del ensayo (por ejemplo, Ejemplo 13, Figura 16)	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 2 requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima escisora 2	Usa el facilitador del ensamblaje/producto de ligación de la etapa 2 para facilitar el ensamblaje de una MNAzima escisora 2, que puede escindir un sustrato para crear un producto útil como un componente del facilitador del ensamblaje en la etapa 4.
	4	MNAzima	Usa el componente del facilitador del ensamblaje generado en la etapa 3 para formar una MNAzima 3, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 6 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear una nueva ADNzima requerida para la etapa 3.
	3	ADNzima	Usa la ADNzima/producto de ligación de la etapa 2 para modificar un sustrato para crear un producto útil como un facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje en la etapa 4
	4	MNAzima	Usa el facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje generado en la etapa 3 para formar una MNAzima, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 7 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora I	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.

	*Etapa	Enzima	Función
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo sustrato requerido para la etapa 3.
	3	MNAzima o ADNzima escisora	Usa el sustrato/producto de ligación de la etapa 2 como un sustrato para una MNAzima o ADNzima escisora, que puede escindir el sustrato para crear un producto útil como un componente del facilitador del ensamblaje en la etapa 4.
	4	MNAzima	Usa el componente del facilitador del ensamblaje generado en la etapa 3 para dirigir el ensamblaje de una MNAzima adicional, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 8 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa 1	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo componente (por ejemplo, una partzima o facilitador del ensamblaje) para una MNAzima escisora 2 requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima escisora 2	Usa el componente/producto de ligación de la etapa 2 como un componente para una MNAzima escisora 2, que puede escindir un sustrato para crear un producto útil como un sustrato de ligación en la etapa 4.
	4	MNAzima o ADNzima ligasa 2	Usa el producto de la etapa 3 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear una nueva ADNzima escisora requerida para la etapa 5.
	5	ADNzima escisora	Usa la ADNzima/producto de ligación de la etapa 4 para escindir el sustrato usado en la etapa 1.
Variación 9 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa 1	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo componente (por ejemplo, una partzima o facilitador del ensamblaje) para una MNAzima escisora 2 requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima escisora 2	Usa el componente/producto de ligación de la etapa 2 como un componente para una MNAzima escisora 2, que puede escindir un sustrato para crear un producto para usar como un sustrato de ligación en la etapa 4.
	4	MNAzima o ADNzima ligasa 2	Usa el producto de la etapa 3 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo componente (por ejemplo, facilitador del ensamblaje o partzima) para una MNAzima escisora adicional requerida para la etapa 5.

	*Etapa	Enzima	Función
	5	MNAzima escisora	Usa el producto de ligación de la etapa 4 como un componente para ensamblar una MNAzima adicional que puede escindir el sustrato usado en la etapa 1.
Variación 10 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
(por ejemplo, Ejemplo 6, Figura 9; Ejemplos 7 y 9, Figura 12; Ejemplo 12, Figura 15)	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo componente (por ejemplo, una partzima o facilitador del ensamblaje) para una MNAzima requerida para la etapa 3.
	3	MNAzima	Usa el componente/producto de ligación de la etapa 2 como un componente para una MNAzima, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
Variación 11 en la puesta a punto del ensayo	1	MNAzima escisora 1	Detecta el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, diana) y escinde un sustrato para crear un producto útil como un sustrato en la etapa 2.
	2	MNAzima o ADNzima ligasa	Usa el producto de la etapa 1 como un sustrato, que puede ligarse a un segundo sustrato de ligación para crear un nuevo sustrato requerido para la etapa 3.
	3	MNAzima o ADNzima	Usa el sustrato/producto de ligación de la etapa 2 como un sustrato para una MNAzima, que puede modificar un sustrato, por ejemplo por escisión, ligación u otra actividad enzimática.
*Las etapas pueden realizarse secuencialmente en recipientes de reacción individuales, varias etapas pueden combinarse o todas las etapas podrían realizarse en un único recipiente de reacción con una o más cámaras. Cada variación podría comprender etapas adicionales, incluyendo etapas que se retroalimentan en otras partes de la cascada.			

En el Esquema 1 se muestra un diagrama de flujo de una selección de elementos, pasos o etapas componentes de reacciones en cascada como se usa en reacciones en los ejemplos descritos en la presente memoria e ilustrado en las figuras. El diagrama de flujo no limitante demuestra la modularidad de varios elementos componentes útiles en reacciones en cascada.



Todas las reacciones pueden usar una combinación de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente múltiples MNAzimas o una mezcla de MNAzimas y ADNzima(s). Las modificaciones por estas enzimas implican una combinación de varios números de etapas de escisión y/o ligación. En cada caso, el producto de una etapa sirve como un sustrato, una enzima o un componente de enzima para la etapa posterior. Las enzimas de ácidos nucleicos que escinden pueden usarse para crear, por ejemplo, un nuevo sustrato para ligación o un nuevo componente del facilitador del ensamblaje para una nueva MNAzima. Las enzimas de ácidos nucleicos que ligan pueden usarse para crear, por ejemplo, un nuevo sustrato para escisión en una etapa siguiente por una enzima ADNzima o MNAzima. Además, las enzimas de ácidos nucleicos que ligan pueden usarse para crear, por ejemplo, una nueva ADNzima o un nuevo componente para una MNAzima, tal como un facilitador del ensamblaje, una nueva partzima o un nuevo brazo estabilizador. Un experto en la técnica se dará cuenta de que existe un gran número de variaciones de los ensayos que usan combinaciones de enzimas de ácidos nucleicos y los productos resultantes que pueden usarse en cascadas de enzimas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en algunas de las variaciones listadas en la Tabla 3 en las que una enzima de ácidos nucleicos se indica como una escisora podría ser posible reemplazar ésta con una ligasa (o viceversa). En los ejemplos se han demostrado numerosas etapas individuales útiles en varias de dichas reacciones en cascada y se resumen en el Esquema 1.

Será obvio para un experto en la técnica que múltiples productos producidos por una única enzima de ácidos nucleicos podrían usarse para permitir que uno o más complejos de ácidos nucleicos funcionen como una o más enzimas de ácidos nucleicos en una o más etapas posteriores.

En algunas de las etapas de la Tabla 3 en las que el producto de una reacción se indica como útil como un componente particular de un complejo de enzimas de ácidos nucleicos en una reacción posterior, podría ser posible reemplazar el componente con otro tipo de componente. Por ejemplo, en la etapa I de la Tabla 3 una MNAzima podría crear un producto que es útil como un facilitador del ensamblaje, en lugar de como un sustrato, para el ensamblaje de un complejo de enzima de ácidos nucleicos.

Será obvio para un experto en la técnica que una señal, por ejemplo una señal fluorescente puede generarse en una etapa en la que ocurre una modificación catalítica. Por ejemplo, una señal fluorescente podría generarse en cualquier etapa en la que hay escisión por una ADNzima o MNAzima se podría separar una pareja de marcadores fluoróforo apantallador y causar un incremento en la fluorescencia. Además, una señal fluorescente podría generarse en cualquier etapa en la que, por ejemplo, hay ligación por una ADNzima o MNAzima se podría llevar una pareja de marcadores fluoróforo apantallador muy cerca y causar una disminución en la fluorescencia. Además, una señal fluorescente podría generarse en múltiples etapas en una reacción en cascada.

En todos estos ejemplos de reacciones en cascada hay una sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior. Además, en los ejemplos en los que se describen cascadas con retroalimentación habrá una sucesión de procesos u operaciones que ocurren en etapas sucesivas, en la que la ocurrencia de cada etapa es típicamente dependiente de la ocurrencia de una etapa anterior y mediante la cual la ocurrencia de al menos una etapa anterior depende típicamente de procesos u operaciones que ocurren en etapas posteriores. En las cascadas con retroalimentación, el producto de cualquier etapa anterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa posterior y el producto de cualquier etapa posterior podría servir como un componente o sustrato para cualquier etapa anterior.

Una cascada podría iniciarse por dianas de ácido nucleico (ADN/ARN) en presencia de componentes para una o más MNAzima(s), o podría iniciarse una cascada por otros analitos diana (proteínas, moléculas pequeñas etc) en presencia de componentes para una o más apta-MNAzima(s). Como la reacción sólo se iniciaría en presencia de analitos diana, podría proporcionar una técnica para la detección y/o identificación de analitos diana. El método se basa en la transición entre estados de inactivación y activación de complejos de ácidos nucleicos. A diferencia de las técnicas de amplificación de diana tales como la PCR, o la reacción en cadena de la ligasa, las cascadas que implican la amplificación usando MNAzima(s) no requieren enzimas proteicas para facilitar el proceso. Además, la capacidad de controlar y regular la actividad catalítica de MNAzima(s) usando varios componentes oligonucleotídicos, tales como componentes del brazo estabilizador o componentes del facilitador del ensamblaje permite que el ensamblaje de MNAzimas esté regulado firmemente por condiciones y componentes en el microentorno.

En relación con las cascadas iniciadas por analitos diana distintos de ácidos nucleicos, los aptámeros son útiles. Los aptámeros son secuencias de ADN, ARN o peptídicas que tienen la capacidad de reconocer uno o más ligandos con gran afinidad y especificidad debido a su estructura de alto nivel, por ejemplo, un dominio o bolsillo de unión 3-D. Muchos aptámeros se han desarrollado *in vitro* por su capacidad de unirse a ligandos, incluyendo por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, priones, compuestos orgánicos pequeños y/o organismos enteros. Las "aptazimas" son secuencias que se han descrito previamente que tienen secuencias comprendidas por secuencias tanto de aptámero como de enzima de ácidos nucleicos, por ejemplo un aptámero añadido a una ADNzima o ribozima. Las apta-MNAzimas son MNAzimas que tienen un aptámero añadido a uno de los componentes en un complejo apta-MNA. Por ejemplo, un aptámero puede estar añadido a una partzima, un facilitador del ensamblaje, un sustrato de MNAzima o cualquier otro componente de un complejo MNA. La asociación de un analito diana distinto de ácido nucleico con el aptámero puede facilitar la actividad de la enzima de ácidos nucleicos. Así, una cascada puede

iniciarse por un analito diana distinto de ácido nucleico que se asocia con una apta-MNAzima, por ejemplo, como la primera etapa de una cascada. Además, en una cascada, el producto de una reacción catalizada por una enzima de ácidos nucleicos en esa cascada puede asociarse con un aptámero presente en un componente de una enzima de ácidos nucleicos distinta de la MNAzima o apta-MNAzima inicial, facilitando de esta manera la actividad de esa enzima de ácidos nucleicos.

Las cascadas de amplificación mediadas por MNAzima y/o apta-MNAzima podrían aplicarse a un rango de aplicaciones biotecnológicas, especialmente en diagnóstico, pero también en otras aplicaciones médicas, veterinarias, agrícolas, tecnología de los alimentos, formación de imágenes y anti-bioterrorismo. Podrían permitir la detección de proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas para el diagnóstico de enfermedades facilitando la amplificación de la señal. Los ácidos nucleicos catalíticos y/o las reacciones en cascada pueden usarse para aplicaciones distintas del diagnóstico, por ejemplo, en el campo del análisis computacional e ingeniería biomolecular de dispositivos en nanoescala e interruptores que pueden usarse en terapéutica.

9. Método que permite el cambio entre los estados activos e inactivos de complejos MNA por la eliminación o creación de componentes tales como el inhibidor de la actividad o el facilitador del ensamblaje.

Una transición entre MNAzimas activas y complejos MNA inactivos, o viceversa, puede conseguirse mediante el suministro o eliminación de componentes del complejo MNA, incluyendo pero no limitado a, uno o más inhibidores de la actividad, facilitadores del ensamblaje, inhibidores del ensamblaje, partzimas o brazos estabilizadores, o partes de éstos. En algunas realizaciones, el inhibidor de la actividad puede incluir además un conector o sustrato lábil o escindible, que puede estar localizado entre dos o más dominios en el inhibidor de la actividad, por ejemplo un dominio inhibidor de la actividad y un dominio facilitador del ensamblaje activador. La escisión en el sitio del conector puede permitir la separación de un dominio inhibidor de la actividad de un dominio inhibidor del ensamblaje activador, que puede funcionar como un componente facilitador del ensamblaje y dirigir el ensamblaje de una MNAzima activa. La escisión del conector podría conseguirse por varios métodos, incluyendo pero no limitado a, escisión por MNAzima, escisión por enzima proteica, o hidrólisis inducida por cambios en el pH y/o temperatura.

Alternativamente, el inhibidor del ensamblaje y/o facilitador del ensamblaje podría eliminarse selectivamente usando un proceso que implica migración de cadena y/o complementariedad con oligonucleótidos componentes. Los oligonucleótidos moduladores que funcionan a través de complementariedad pueden hacerlo alterando la estructura secundaria de los oligonucleótidos a los que se unen. En algunas realizaciones, esto puede resultar en una conformación alternativa en la que una secuencia activadora es ahora capaz de ensamblarse con otros componentes para formar MNAzimas activas. Como ejemplo, dicho oligonucleótido modulador puede causar la alteración de estructuras intramoleculares tales como horquillas que restringen a las moléculas activadoras en conformaciones no funcionales.

Una estrategia ejemplar alternativa se diseña para facilitar el cambio de un complejo MNA entre el "estado activado" de una MNAzima activa al "estado inactivado" de un complejo MNAi usando una segunda MNAzima con actividad ligasa (o una ADNzima con actividad ligasa). Respecto a la Figura 13, una MNAzima A activa, que podría ser capaz de modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato(s) A podría formarse en presencia del componente facilitador del ensamblaje 1 (AFC 1) y componente facilitador del ensamblaje 2 (AFC 2). Una segunda MNAzima B, que tiene actividad ligasa, podría formarse en presencia del facilitador del ensamblaje 3 (AF3) y podría ligar AFC 2 con un componente inhibidor de la actividad (AIC) causando la formación de un inhibidor de la actividad (AI). Este AI podría unirse a los componentes partzima para la MNAzima A y resultar en la formación de un complejo MNAi A que es inactivo. Como tal la MNAzima ligasa en este ejemplo podría operar como un interruptor de inactivación para inactivar una MNAzima A.. Alternativamente, una ADNzima ligasa podría reemplazar la MNAzima ligasa y usarse para operar como un interruptor de inactivación para inactivar una MNAzima A. El complejo MNAi inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representan dos estados alternativos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivado" y el estado "activado" respectivamente.

10. Kits,

La presente descripción también proporciona kits para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria. Típicamente, los kits para llevar a cabo los métodos de la presente descripción contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el método. Típicamente, los kits pueden comprender al menos un primer contenedor que contiene un primer complejo de ácidos nucleicos (por ejemplo, un complejo MNA), en el que la formación de una primera enzima de ácidos nucleicos requiere la adición de una muestra que contiene potencialmente una diana que se quiere detectar, identificar y/o cuantificar. La formación de la enzima puede dar lugar a la producción de un componente, por ejemplo un sustrato, adecuado para participar en una reacción posterior. En la reacción posterior, el componente permite al complejo de ácidos nucleicos adicional funcionar como una enzima de ácidos nucleicos. También pueden proporcionarse los reactivos para permitir la formación de complejos de ácidos nucleicos adicionales que forman complejos de enzimas de ácidos nucleicos cuando se ponen en contacto por un componente producido por una enzima de ácidos nucleicos de una reacción previa.

En determinadas realizaciones, los componentes para cada uno de los complejos de ácidos nucleicos que pueden permitir la formación de complejos de enzima de ácidos nucleicos activa pueden estar presentes en el mismo

contenedor o en contenedores separados. En otras realizaciones, los componentes para cada uno de los complejos de ácidos nucleicos que pueden permitir la formación de complejos de enzima de ácidos nucleicos activa pueden estar presentes en contenedores separados. Por ejemplo, en una realización un kit puede comprender uno o más componentes requeridos para cada uno de los complejos de ácidos nucleicos en contenedores separados.

5 Se entenderá que no se requiere que todos los componentes para todos los complejos de ácidos nucleicos estén en el kit ya que pueden generarse como parte de una reacción en cascada. También se prevén los componentes que permiten reacciones múltiples.

10 En otras realizaciones, los componentes para complejos de enzima de ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, con actividad de escisión o ligasa también pueden formar parte de los kits de la presente descripción. En otras realizaciones más, los kits de la presente descripción pueden incluir ADNzimas o partes de éstas.

Típicamente, los kits de la presente descripción también comprenderán uno o más contenedores adicionales, que contienen por ejemplo, reactivos de lavado y/o otros reactivos según se requiera para la realización de los métodos de la descripción.

15 En el contexto de la presente descripción, un kit compartimentalizado incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en contenedores separados, y pueden incluir contenedores de vidrio pequeños, contenedores de plástico o tiras de plástico o papel. Dichos contenedores pueden permitir la transferencia eficiente de reactivos de un compartimento a otro compartimento mientras evitan la contaminación cruzada de las muestras y reactivos, y la adición de agentes o disoluciones de cada contenedor de un compartimento a otro de una manera cuantitativa. Dichos kits también pueden incluir un contenedor que aceptará la muestra de ensayo, un contenedor que contiene los reactivos usados en el ensayo, contenedores que contienen reactivos de lavado y contenedores que contienen un reactivo de detección. Típicamente, un kit de la presente descripción también incluirá instrucciones para usar los componentes del kit para realizar los métodos apropiados. Los kits y los métodos de la descripción pueden usarse conjuntamente con equipos y sistemas de análisis automatizados, por ejemplo, incluyendo pero no limitado a, máquinas de PCR en tiempo real.

25 Para la aplicación para la detección, identificación o cuantificación de diferentes dianas o eventos, puede ser aplicable un único kit de la descripción o alternativamente pueden requerirse diferentes kits, por ejemplo que contienen reactivos específicos para cada diana. Los métodos y kits de la presente descripción encuentran aplicación en cualquier circunstancia en la que es deseable detectar, identificar o cuantificar cualquier entidad o evento.

30 11. Métodos para preparar MNAzimas

La presente descripción también proporciona métodos para preparar por ingeniería MNAzimas a partir de ADNzimas uni-moleculares.

35 Se sabe que las ADNzimas y/o ribozimas son capaces de la modificación catalítica de al menos un sustrato en el que la modificación puede seleccionarse del grupo que comprende escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde, conjugación ARN-proteína, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehídos, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforoato, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglucosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

45 Los métodos para preparar MNAzimas descritos en la presente memoria son aplicables a una pluralidad de enzimas de ácidos nucleicos tales como las anteriores e incluyendo pero no limitado a aquellas descritas en Hobartner y Silverman (2007) y aquellas listadas en la tabla siguiente.

Tabla 4: Algunas enzimas de ácidos nucleicos uni-moleculares que pueden usarse para formar una MNAzima.

Reacción catalizada	Enzima de ácidos nucleicos específica (y composición primaria)	Requerimientos de sustrato	Producto
Escisión	ribozima de cabeza de martillo (ARN)	NU*X unión ARN 3'-5'	fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'

Reacción catalizada	Enzima de ácidos nucleicos específica (y composición primaria)	Requerimientos de sustrato	Producto
	ADNzima 10:23 (ADN)	R*Y unión ARN 3'-5'	fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'
	ADNzima 8:17 (ADN)	A*G unión ARN 3'-5'	fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'
	ADNzima 7Q10 (ADN)	UA*GR unión ARN 2'-5'	fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'
	ADNzima 7Z81 (ADN)	UA*GR unión ARN 2'-5'	fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'
Ligación	ADNzima 7Q10 (ADN)	UA*GR fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'	Unión ARN 2'-5'
	ADNzima 7Z81 (ADN)	UA*GR fosfato cíclico 2'3' e hidroxilo 5'	Unión ARN 2'-5'
	ADNzima 9DB1 (ADN)	D*RA diol 2'3' y trifosfato 5'	Unión ARN 3'-5'

El experto en la técnica reconocerá que muchas ADNzimas tienen estructuras básicas similares con múltiples dominios. Estas ADNzimas tienen un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios de unión a sustrato no conservados ("brazos de sustrato"), que reconocen e hibridan específicamente con el sustrato. El dominio de unión al sustrato puede personalizarse para cualquier sustrato siempre que el sustrato contenga un sitio que pueda modificarse por la ADNzima. Muchos ácidos nucleicos catalíticos, incluyendo la ribozima de cabeza de martillo, las ADNzimas 10:23 y 8:17, las ADNzimas ligasas "7Z81", "7Z48" y "7Q10", la ADNzima "UV1C" de fotoreversión de dímeros de timina y la ADNzima "DAB22" formadora de enlaces carbono-carbono, tienen estructuras básicas similares con múltiples dominios.

Respecto a la Figura 14, se ilustra un método para preparar por ingeniería una MNAzima a partir de una ADNzima uni-molecular (estructura del lado superior izquierdo) mediante el cual en la primera etapa, se identifican las posiciones en el núcleo catalítico de la ADNzima en las que puede ser dividida, de manera que cada parte parcial del núcleo catalítico puede distribuirse entre dos secuencias parciales de manera que los dos núcleos parciales conjuntamente constituyen un núcleo catalítico entero (estructura del lado superior derecho). Pueden sintetizarse dos oligonucleótidos A y B (partzimas candidatas) (estructura de la parte inferior izquierda). Puede sintetizarse un oligonucleótido A para contener (i) una parte de brazo de unión a sustrato capaz de unirse a un sustrato, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial, y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitador del ensamblaje. Puede sintetizarse un segundo oligonucleótido B de manera que contiene (i) un brazo de unión al sustrato capaz de unirse al mismo sustrato que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al sustrato en una posición adyacente a la del oligonucleótido A, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial que contiene aquellas bases del núcleo catalítico entero de la ADNzima que no están incorporadas en el oligonucleótido A y (iii) una secuencia de brazo sensor capaz de unirse al mismo facilitador del ensamblaje que el oligonucleótido A mediante lo cual el oligonucleótido B se une al facilitador del ensamblaje en una posición adyacente a la del oligonucleótido A. Este proceso puede repetirse preparando así una serie de parejas de oligonucleótidos A y B que incorporan la estructura y los dominios de partzimas, pero pueden o no tener actividad catalítica en presencia de un sustrato y un facilitador del ensamblaje.

Algunas o todas de las parejas de partzima candidatas (parejas de oligonucleótidos A y B de la serie) pueden incubarse en presencia del facilitador del ensamblaje complementario a las partes de brazo sensor de las partzimas y un sustrato que es complementario a las partes de brazo de sustrato de las partzimas. La incubación se realiza en condiciones que son compatibles con la modificación de un sustrato por la ADNzima a partir de la cual se obtuvieron las secuencias de núcleo catalítico parcial. Las parejas de oligonucleótidos A y B, que pueden realizar el mismo tipo

de modificación (por ejemplo, escisión) en el sustrato tal como la ADNzima de la que se obtuvieron las secuencias parciales, son útiles como partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas y complejos de MNAzima (estructura de la parte inferior derecha). Las secuencias de los núcleos catalíticos parciales son adecuadas para la incorporación en otras partzimas de nuevas MNAzimas. Pueden sintetizarse nuevas partzimas que están personalizadas para nuevos sustratos (cambiando los dominios de unión a sustrato de cada partzima) y/o nuevos facilitadores del ensamblaje (cambiando los dominios de unión sensores de cada partzima).

El método para preparar por ingeniería una MNAzima que actúa en un primer y segundo sustrato, por ejemplo una MNAzima ligasa partiendo de una enzima de ácidos nucleicos uni-molecular (por ejemplo, ADNzima ligasa) requiere las etapas similares mediante las cuales en la primera etapa, se identifican las posiciones en el núcleo catalítico de la ADNzima en las cuales puede dividirse, de manera que cada parte parcial del núcleo catalítico puede distribuirse entre dos secuencias parciales de manera que los dos núcleos parciales conjuntamente constituyen un núcleo catalítico entero. Entonces pueden sintetizarse dos oligonucleótidos A y B (partzimas candidatas). Puede sintetizarse un oligonucleótido A para contener (i) una parte de brazo de unión a sustrato capaz de unirse a un primer sustrato, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial, y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitadora del ensamblaje. Puede sintetizarse un segundo oligonucleótido B de manera que contiene (i) un brazo de unión al sustrato capaz de unirse a un segundo sustrato, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial que contiene aquellas bases del núcleo catalítico entero de la ADNzima que no están incorporadas en el oligonucleótido A y (iii) una secuencia de brazo sensor capaz de unirse al mismo facilitador del ensamblaje que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al facilitador del ensamblaje en una posición adyacente a la del oligonucleótido A. Este proceso puede repetirse preparando así una serie de parejas de oligonucleótidos A y B que incorporan la estructura y los dominios de partzimas, pero pueden o no tener actividad catalítica en presencia de los sustratos y un facilitador del ensamblaje.

Algunas o todas de las parejas de partzima candidatas (parejas de oligonucleótidos A y B de la serie) pueden incubarse en presencia del facilitador del ensamblaje complementario a las partes de brazo sensor de las partzimas y los dos sustratos que son complementarios a las partes de brazo de sustrato de las partzimas. La incubación se realiza en condiciones que son compatibles con la modificación (por ejemplo, ligación) de los sustratos por la ADNzima a partir de la cual se obtuvieron las secuencias de núcleo catalítico parcial. Las parejas de oligonucleótidos A y B, que pueden realizar el mismo tipo de modificación (por ejemplo, ligación) en los sustratos tal como la ADNzima de la que se obtuvieron las secuencias parciales, son útiles como partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas y complejos de MNAzima. Las secuencias de los núcleos catalíticos parciales son adecuadas para la incorporación en otras partzimas para otras MNAzimas. Pueden sintetizarse nuevas partzimas que están personalizadas para nuevos sustratos (cambiando los dominios de unión a sustrato de cada partzima) y/o nuevos facilitadores del ensamblaje (cambiando los dominios de unión sensores de cada partzima).

Además, puede usarse un método similar para examinar la tolerancia a cambios en la secuencia parcial obtenida de la división del núcleo catalítico de la ADNzima que pueden incorporarse en partzimas componentes. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones en los núcleos catalíticos parciales incorporados en las partzimas que incluyen, como ejemplo, inserciones, deleciones, sustitución con bases de ADN alternativas, o sustitución con análogos de ADN tales como ribonucleótidos, inosina u otras bases análogas. Las parejas de partzima candidatas que contienen una o más modificaciones pueden ensayarse como anteriormente para determinar si contienen o no una pareja de secuencias de núcleo catalítico parcial que son adecuadas para incorporación en partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas catalíticamente activas.

La presente descripción se describirá ahora adicionalmente con mayor detalle por referencia a los ejemplos específicos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ejemplo de una MNAzima en la que la partzima B comprende dos moléculas.

En la presente descripción se contemplan muchas variaciones en el diseño básico de una MNAzima. En este ejemplo, las MNAzimas se ensamblaron en presencia de un facilitador del ensamblaje de la partzima A, y la partzima B que contenía dos componentes, concretamente un componente partzima con un brazo sensor truncado y un componente que funciona como un brazo estabilizador. El ensamblaje de la MNAzima se produce a través de reconocimiento de bases de Watson-Crick de los brazos sensores de la partzima y la secuencia facilitadora del ensamblaje. En el ejemplo siguiente, se demostró el uso de un brazo truncado y brazo estabilizador.

La estrategia de detección de la MNAzima usada en este ejemplo se ilustra en la Figura 2 (panel (II)) y en la Figura 3 (I).

Un ejemplo del oligonucleótido requerido para esta estrategia se describe a continuación:

a) una partzima A;

b) una partzima B que comprende un primer componente que contiene un brazo de sustrato, un núcleo catalítico parcial y un brazo sensor truncado; y un segundo componente de brazo estabilizador, que hibrida con el facilitador

del ensamblaje, adyacente al brazo sensor truncado de la partzima. Este brazo estabilizador está diseñado para facilitar el ensamblaje de la MNAzima cuando el brazo sensor truncado de la partzima hibrida con el facilitador del ensamblaje; y

c) un sustrato, por ejemplo un sustrato informador.

- 5 Alternativamente, los oligonucleótidos útiles en esta estrategia son una partzima B; una partzima A que comprende un primer componente que contiene un brazo de sustrato, un núcleo catalítico parcial y un brazo sensor truncado; y un segundo componente de brazo estabilizador, que puede hibridar con el facilitador del ensamblaje, adyacente al brazo sensor truncado de la partzima.

El ensamblaje de la MNAzima activa también requiere la presencia de un facilitador del ensamblaje.

10 1.1. Oligonucleótidos de partzima y brazo estabilizador

En este ejemplo, el brazo sensor truncado de la partzima B tenía una longitud de sólo 5 nucleótidos. Las secuencias de las partzimas A y los dos componentes de la partzima B se muestran a continuación (5' a 3'). En las secuencias siguientes, las bases en **negrita** hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *itálica* hibridan con el sustrato. La "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonucleótido.

SEQ ID NO: 1 Partzima A4 XdA4/2-P: **ACTGGATGTC**ATCTGTCTGACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 2 Partzima B5 componente 1 XdB5/2-P: TGCCCAGGGAGGCTAGCTTATAC-P

SEQ ID NO: 3 Partzima B componente de brazo estabilizador XdS-P: **CTTCGTGAGGGTGAG**-P

1.2. Sustrato informador

- 20 El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-2 marcado en los extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5', un resto BHQ1 en el extremo 3' y designado SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se monitorizó 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 lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

25 SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

1.3. Molécula facilitadora del ensamblaje

La secuencia del oligonucleótido sintético usado como el facilitador del ensamblaje está a continuación (5' a 3'). Este facilitador del ensamblaje estaba emparejado completamente con el brazo sensor de la partzima B. Se usó agua sin nucleasas en lugar de diana como un control "sin diana".

30 SEQ ID NO: 5 Facilitador del ensamblaje Xd-T:
TGCCCCCTCACCTCACGAAGGTATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

1.4 Condiciones de la Reacción

- 35 La detección del facilitador del ensamblaje se midió por un incremento en la señal fluorescente causado por la escisión del sustrato informador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron por la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue 50 mL. Las reacciones se llevaron a cabo a 55°C en un FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia de cada reacción se leyó cada 2 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones contenían 200 nM SubB1-2-FB, 200 nM XdA4/2-P, 200 nM XdBS/2-P, 1 x PCR Tampón II (Applied Biosystem) y 25 mM MgCl₂. Además, las reacciones contenían los oligonucleótidos como se listan en la Tabla 5.

40 Tabla 5. Reactivos adicionales en las reacciones de MNAzima.

Reacción	Facilitador del Ensamblaje	Brazo estabilizador
(i)	200 nM de Xd-T	200 nM de XdS-P
(ii)	200 nM de Xd-T	Sin brazo estabilizador
(iii)	Sin facilitador del ensamblaje (control de agua)	200 nM de XdS-P

1.5 Resultados: Ensamblaje de MNAzimas activas en presencia de las partzimas y un facilitador del ensamblaje.

5 Cuando tanto el facilitador del ensamblaje como un componente de brazo estabilizador de la partzima se incluyeron en la reacción (Reacción (i): Figura 3), las MNAzimas activas se ensamblaron y escindieron el sustrato, resultando en un incremento en la fluorescencia con el tiempo. Por el contrario, no hubo un incremento en la fluorescencia en ausencia del facilitador del ensamblaje (Reacción (iii): Figura 3). Además, se mostró que la presencia del brazo estabilizador era esencial para la formación de MNAzimas activas o complejos de MNAzima. Una reacción que contenía todos los componentes de la reacción incluyendo el facilitador del ensamblaje, pero que careció del componente de brazo estabilizador, no proporcionó un incremento en la fluorescencia con el tiempo (Reacción (ii): Figura 3). Como tales, las 5 bases del brazo sensor de la partzima B fueron insuficientes para formar una MNAzima estable o complejo de MNAzima pero la presencia de un componente de brazo estabilizador se mostró capaz de compensar la corta longitud (truncamiento) del brazo sensor de la partzima y permitió la formación de una MNAzima estable en condiciones astringentes de temperatura (55°C en este ejemplo). El componente de brazo estabilizador es así un oligonucleótido esencial para el ensamblaje de MNAzimas activas en este sistema, que usa una partzima con un brazo sensor truncado.

15 Además, cuando un facilitador del ensamblaje alternativo, que tenía un único emparejamiento erróneo de nucleótidos respecto al brazo sensor de la partzima A se incluyó en una reacción que contenía la partzima A y los dos componentes de la partzima B, la señal fluorescente no incrementó con el tiempo (datos no mostrados).

20 Este ejemplo demuestra que las MNAzimas sólo podrían formarse en presencia de un facilitador del ensamblaje completamente emparejado en las condiciones del experimento. Un experto en la técnica apreciará que la transición entre una MNAzima activa y un complejo de ácidos nucleicos multi-componente inactivo puede regularse proporcionando facilitadores del ensamblaje completamente emparejados o con emparejamiento erróneo. Además, el ejemplo demuestra el uso de partzimas con dos componentes, que comprenden una primera molécula que contiene brazos sensores truncados y una segunda molécula de brazo estabilizador. El requerimiento para la presencia de una molécula de brazo estabilizador en dichos sistemas, proporciona otra herramienta con la que se puede regular el ensamblaje de MNAzimas.

25 Se proporciona una gran flexibilidad por los complejos de MNA que contienen múltiples componentes oligonucleotídicos, cuyas secuencias pueden personalizarse respecto a la temperatura de fusión, la composición y la complementariedad de la secuencia o ausencia de ésta con otros oligonucleótidos componentes. Las secuencias más cortas, incluyendo pero no limitado a, componentes de partzima con brazos truncados, brazos estabilizadores y componentes facilitadores del ensamblaje son particularmente útiles en este aspecto de la descripción. Aunque este ejemplo usa una MNAzima con actividad de escisión, se apreciará que podrían usarse diseños estructurales similares para MNAzimas o complejos de MNAzima en MNAzimas que causan modificaciones distintas de la escisión, por ejemplo, MNAzima que podrían ligar.

Ejemplo 2: Detección de analitos diana usando MNAzimas con actividad ligasa.

35 Un ejemplo de una MNAzima que puede modificar al menos dos sustratos, tal como una MNAzima con actividad ligasa, podría usarse para la detección de una diana de ácido nucleico. Una MNAzima con actividad ligasa podría ensamblarse a partir de dos partzimas que comprenden parejas de núcleo catalítico parcial activo obtenidas, por ejemplo, a partir de la ADNzima 7Q10 o la ADNzima 7Z81 como se ejemplifica en el ejemplo 7 y 9 respectivamente. Las partzimas podrían tener brazos sensores complementarios al ácido nucleico diana que podría actuar como un facilitador del ensamblaje para una MNAzima ligasa activa. Los brazos de sustrato podrían ser complementarios a dos moléculas sustrato que contienen secuencias ligables con extremos apropiados (por ejemplo, Tabla 4).

40 Si el sustrato de ligación 5' y el sustrato de ligación 3' estuvieran cada uno marcados con un marcador fluoróforo y apantallador respectivamente (o viceversa) entonces la ligación podría resultar en una disminución de la fluorescencia, lo que podría servir como un indicador de la presencia del ácido nucleico diana. En un formato alternativo, si el sustrato de ligación 5' estuviera marcado con un resto detectable, por ejemplo un fluoróforo, y el sustrato de ligación 3' estuviera unido en una localización discreta, por ejemplo en un chip, entonces la ligación podría resultar en la aparición de una señal en una localización discreta en presencia del ácido nucleico diana.

45 La estrategia también podría usarse para la detección de otros ligandos si la MNAzima fuera una apta-MNAzima con actividad ligasa que contuviera una secuencia aptámero capaz de unirse específicamente al ligando diana.

50 Además, la ligación de dos sustratos por una MNAzima en presencia de un analito diana podría constituir la primera etapa en una reacción en cascada.

Ejemplo 3: Mecanismos para facilitar e inhibir el ensamblaje de MNAzimas activas o complejos MNAi.

55 Una MNAzima está compuesta por partzimas, que se ensamblan en presencia de uno o más facilitadores del ensamblaje, para formar una enzima activa (por ejemplo, Figuras 1, 2, 4 (panel de la derecha) y Figura 5 (I y II)). El o los facilitadores del ensamblaje, que se unen a los brazos sensores de la partzima, pueden ser un analito diana, o pueden ser una(s) molécula(s) de ácido nucleico sintética añadida a la mezcla de reacción para dirigir el ensamblaje de la MNAzima. Además de su capacidad para contribuir al ensamblaje de la MNAzima activa, las partzimas pueden ensamblarse en un complejo MNAi inactivo, no catalítico cuando hibridan con una molécula de "inhibidor de la

actividad" (Figura 4 (panel de la izquierda) y Figura 5 (iii)). Se ensayaron varias secuencias oligonucleotídicas alternativas para su capacidad de regular el ensamblaje bien de la MNAzima activa o de complejos MNAi inactivos.

En este ejemplo (representado en las Figuras 4 y 5), el ensamblaje de la MNAzima se examinó en presencia de (I) una única molécula (facilitador del ensamblaje F1/2), o (II) dos moléculas (componente facilitador del ensamblaje F1 y componente facilitador del ensamblaje F2), cuyas secuencias conjuntamente comprenden la presente en el facilitador F1/2. El facilitador F2 se une al brazo sensor completo de una partzima y se superpone para unirse a 4 pares de bases del brazo sensor de la segunda partzima. En otra reacción, una molécula de "inhibidor de la actividad", que tiene una secuencia que incluye la del facilitador F2 más un dominio inhibidor de la actividad adicional, se ensayó para su capacidad para dirigir la reacción hacia el ensamblaje de complejos MNAi inactivos.

10 3.1 Oligonucleótidos de Partzima

Las secuencias de las partzimas A y partzima B se muestran a continuación (5' a 3'). En las secuencias siguientes, las bases en **negrita** hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *itálica* hibridan con el sustrato. La "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonucleótido.

15 SEQ ID NO 6: Partzima A RO5A4/2-P: **CAAACGAGTCTGGCCTTGTCT**ACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO 7: Partzima B RO5B5/2-P: *TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTCCCACTTGC*-P

3.2 Sustrato Informador

20 El sustrato informador para este ejemplo fue SubBi-2-FB con la secuencia, 5' a 3', como a continuación. SubBi-2-FB se marcó en sus extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' y un resto BHQ1 en el extremo 3'. La escisión de SubBi-2-FB se monitorizó 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 minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB: AAGGTTTCCTCgCCCTGGGCA

3.3 Oligonucleótidos Reguladores.

25 En este ejemplo se ensayaron varias moléculas para su capacidad para regular el ensamblaje de MNAzimas y/o complejo MNAi. La secuencia, que constituye el facilitador del ensamblaje F2, también estaba contenida en las secuencias del facilitador F1/2 y el inhibidor de la actividad y está en **negrita** y subrayada.

SEQ ID NO: 8: Facilitador del Ensamblaje F1/2: GCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTCT**CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG**

SEQ ID NO: 9 Facilitador del Ensamblaje F1: GCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTCT

30 SEQ ID NO: 10 Facilitador del Ensamblaje F2: **CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG**

SEQ ID NO: 11 Molécula inhibidora de la actividad: AAGGTTTCCTCGTCCCTGGGCA**CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG**

3.4 Componentes de la Reacción y monitorización de la actividad de la MNAzima.

35 La monitorización en tiempo real de la actividad de la MNAzima se realizó en un fluorómetro BMG LabTech FluoStar en un volumen total de reacción de 50 mL. Las reacciones se monitorizaron isotérmicamente a 55°C durante 4 minutos. La reacción se inició por inyección del sustrato fluorescente SubBi-2-FB (10ml de disolución 1 mM) en la mezcla de reacción que contenía 1x PCR Tampón II (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 nM de Partzima A RO5A4/2-P, 200 nM de Partzima B RO5B5/2-P y bien (i) 400 nM de Facilitador del Ensamblaje F1/2, o (ii) 400 nM de componente de Facilitador del Ensamblaje F1 y 400 nM de componente de Facilitador del Ensamblaje F2, o (iii) 400 nM de Inhibidor de la actividad y 400 nM de componente de Facilitador del Ensamblaje F1, o (iv) sin Facilitador del ensamblaje.

3.5 Resultados:

45 Los resultados usando las combinaciones de varios oligonucleótidos componentes reguladores o estructurales se muestran en la Figura 5. Se observó un incremento rápido en la señal fluorescente, indicativa de alto nivel de actividad de escisión de MNAzima, en reacciones que contenían bien el facilitador del ensamblaje F1/2 (Figura 5 (i)), o los componentes de facilitador del ensamblaje F1 y F2 (Figura 5 (ii)). No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo en ausencia de un facilitador (Figura 5 (iv)). Esto demuestra que no se necesita que un facilitador del ensamblaje sea siempre un oligonucleótido intacto, sino que puede dividirse en múltiples componentes facilitadores más cortos, que se alinean de manera adyacente entre sí en uno de los brazos sensores de una partzima.

No se observó incremento en la señal fluorescente con el tiempo en reacciones que contenían el inhibidor de la actividad y el facilitador F1 (Figura 5 (iii)). Como la molécula inhibidora de la actividad incluye la secuencia del facilitador F2, entonces la secuencia inhibidora no complementaria adicional unida al facilitador F2 es el elemento que dirige el ensamblaje de los complejos MNAi inactivos. El complejo MNAi puede unirse a un sustrato pero no puede modificarlo catalíticamente. Como resultado, el sustrato no se escindió y la fluorescencia no incrementó con el tiempo en presencia de los complejos MNAi (Figura 5 (iii)). La comparación entre reacciones que contienen los componentes del facilitador del ensamblaje F1 y F2 (Figura 5 (ii)), con aquellas que contienen el facilitador del ensamblaje F1 y el inhibidor de la actividad (que incorpora la secuencia F2) (Figura 5 (iii)), demuestra que la presencia de un dominio inhibidor en un inhibidor de la actividad puede proporcionar una herramienta con la que regular la actividad enzimática dirigiendo el ensamblaje de complejos MNAi inactivos y evitando la formación de MNAzimas activas.

Así, una MNAzima, diseñada para formarse en presencia de un facilitador del ensamblaje F1/2, generó fluorescencia. El ejemplo demostró que el facilitador del ensamblaje F1/2 podía dividirse en dos partes (componentes del facilitador del ensamblaje F1 y F2) y retener la capacidad de dirigir el ensamblaje de MNAzimas catalíticamente activas. Conjuntamente, los dos componentes facilitadores del ensamblaje pueden estabilizar la formación de MNAzima activa y causar fluorescencia, siempre que se unan de forma adyacente entre sí en el brazo sensor de la partzima. Los experimentos posteriores, realizados bajo condiciones de reacción idénticas, demostraron que no se observó ningún incremento en la fluorescencia con el tiempo en presencia sólo del componente del facilitador del ensamblaje F2 (datos no mostrados). Como tal, este ejemplo demuestra que el ensamblaje de partzimas en MNAzimas activas puede requerir la presencia de múltiples facilitadores del ensamblaje componentes. Cuando se requieren los facilitadores del ensamblaje multi-componente, la presencia o ausencia de uno o más de estos componentes puede usarse para controlar el ensamblaje de las MNAzimas activas y como tal activarlas e inactivarlas.

Además, se descubrió que una molécula inhibidora de la actividad podría prevenir el ensamblaje de MNAzima hibridando con una partzima y alterando la estructura secundaria en la unión de los dos componentes del facilitador del ensamblaje en un brazo sensor de partzima que se requiere para la actividad enzimática (véanse las Figuras 4 y 5 como ejemplos). Un experto en la técnica apreciará que podría diseñarse una molécula inhibidora para hibridar bien con la partzima A o B, y bien con el brazo sensor o de sustrato de la partzima.

Las moléculas que incluyen inhibidores de la actividad, componentes del brazo estabilizador de la partzima y facilitadores del ensamblaje o componentes de éstos, pueden usarse para regular el ensamblaje de MNAzimas activas y complejo MNAi inactivo. La transición entre estados de activación (MNAzima) e inactivación (complejo MNAi) puede proporcionar un mecanismo para crear un interruptor molecular, que puede regularse alternando entre las conformaciones activa e inactiva. Dichos interruptores moleculares podrían aplicarse al control de las cascadas de replicación de ácidos nucleicos, o a la regulación de dispositivos a escala molecular autónomos terapéuticos, de diagnóstico y computacionales. Varios protocolos que pueden emplearse para inducir la disociación de un componente oligonucleotídico específico se discuten a lo largo de este documento.

Ejemplo 4: Aplicación de MNAzimas para detectar analitos distintos de ácido nucleico incluyendo moléculas pequeñas tales como adenosina 5'-trifosfato.

Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN monocatenarias que se desarrollaron *in vitro* a partir de grandes conjuntos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria por su capacidad de unir analitos diana con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se han seleccionado por su capacidad de unirse típicamente a muchos tipos de analitos incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, células completas y virus. En este ejemplo, una secuencia de aptámero se incorporó en el extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual sólo se formó una apta-MNAzima activa en presencia del ligando activador. Existen varias formas de conseguir este objetivo, incluyendo la estrategia usada en el ejemplo siguiente, que se ilustra en la Figura 7.

Los oligonucleótidos de ácido nucleico incluidos en esta estrategia de detección de apta-MNAzima ejemplar se ilustran en la Figura 7 e incluyen;

a) una partzima;

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

c) un facilitador del ensamblaje que se une tanto a la apta-partzima como a la partzima permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa;

d) un sustrato por ejemplo un sustrato informador; y

e) un oligonucleótido inhibidor del ensamblaje que hibrida con la apta-partzima en una región que abarca al menos parte de la secuencia del aptámero y parte del brazo de unión al sustrato de la secuencia de la partzima.

En ausencia de un ligando activador (Figura 7 panel (i)), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima previniendo así que se una al sustrato. En presencia de un ligando activador (Figura 7, panel (ii)), el ligando

activador puede interactuar con la secuencia de aptámero de la apta-partzima, previniendo así la unión del inhibidor del ensamblaje y permitiendo que una apta-MNAzima activa se ensamble, uniéndose entonces a y escindiendo el sustrato. Como tales, las apta-MNAzimas sólo pueden formarse y causar la generación de una señal fluorescente en presencia de un ligando activador.

- 5 La estrategia se demostró usando la detección de una molécula pequeña, ATP. Se ha reportado previamente que la secuencia de aptámero con una longitud de 27 nucleótidos usada en este ejemplo es altamente específica para unión de ATP y dATP (Achenbach, *et al* 2005, Huizenga y Szostak, 1995).

4.1 Oligonucleótidos de partzima, facilitador del ensamblaje y oligonucleótidos inhibidores

10 En este ejemplo, la secuencia de aptámero de ATP se unió al brazo de sustrato de una partzima, para producir una molécula de apta-partzima (Figura 7). Los brazos sensores de la apta-partzima y otra partzima se diseñaron para unirse a un facilitador del ensamblaje sintético, incluido en la reacción para dirigir el ensamblaje de MNAzimas cuando están presentes dianas o analitos reguladores. Las secuencias de apta-partzima AtpA2/1 y partzima AtpB3/1 se muestran a continuación (5' a 3'). En las secuencias siguientes, las bases en **negrita** hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *italica* hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto normal en partzima AtpA2/1 indican una secuencia de aptámero de ADN que puede unirse a ATP o dATP.

SEQ ID NO: 12 Apta-Partzima A2
AtpA2/1: **AACGTACACTGCACG**CGGTCCGAAATAGTGAGTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT

SEQ ID NO: 13 Partzima B3 AtpB3/1: *CATCTCTTCTCCGAGCGTCTGTACCGTGTAC*

- 20 La secuencia del facilitador del ensamblaje se muestra a continuación (5' a 3')

SEQ ID NO: 14 Facilitador del ensamblaje AtpC/1: GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

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

SEQ ID NO: 15 Inhibidor del Ensamblaje AtpR/1: CCAGGTACTCACTATTT

4.2 Sustrato informador

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

30 SEQ ID NO: 16 SubBi-1-FB: ACTCACIATaGGAAGAGATG

4.3 Analitos diana o reguladores y moléculas control

- 35 Los ligandos activadores usados para este ejemplo fueron adenosina 5'-trifosfato (ATP) y desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP). La guanosina 5'-trifosfato (GTP) y citosina 5'-trifosfato (CTP) se usaron como moléculas control negativo. Todas las moléculas se adquirieron en Bioline. Se usó agua sin nucleasas como un control sin analito.

4.4 Condiciones de la Reacción

- 40 La presencia del ligando activador se midió por un incremento en la señal fluorescente causado por la escisión del sustrato informador por la apta-MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron por la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue 50 mL. 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 llevaron a cabo a 47°C en un FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia de cada reacción se leyó cada 3 segundos durante un total de 10 minutos. Cada reacción contenía una concentración final de 200 nM AtpA2/1, 200 nM AtpB3/1, 200 nM AtpC/1, 200 nM AtpR/1, 200 nM SubBi-1-FB, 25 mM MgCl₂, 50 mM Tris HCl pH 7,5 y 2 mM bien de ATP, o dATP, o GTP, o CTP o sin analito (control de agua).

- 45 4.5 Resultados: Detección y escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

- 50 En ausencia de ATP o dATP se observó un nivel bajo de fluorescencia que no incrementó con el tiempo, demostrando que en ausencia de ATP, el inhibidor del ensamblaje previno el ensamblaje de complejos de apta-MNAzima activa. En presencia de ATP o dATP, la señal fluorescente fue mayor y se incrementó con el tiempo. Esto indica que el oligonucleótido inhibidor fue desplazado por dATP y ATP y que se formó una apta-MNAzima activa. El ensamblaje de la apta-MNAzima fue dependiente de ligando. En presencia de GTP o CTP se observó un nivel bajo de fluorescencia que no incrementó con el tiempo. La fluorescencia observada en presencia de GTP o CTP fue

similar a la observada en ausencia de ATP o dATP es decir en el control de agua sin ligando. Este ejemplo demuestra que las MNAzimas pueden acoplarse a aptámeros para la detección de analitos en una estrategia que es altamente específica para el analito diana. Este ejemplo demuestra además que puede usarse una molécula inhibidora del ensamblaje para controlar el ensamblaje de apta-MNAzimas, y que una molécula por ejemplo ATP puede servir como un ligando activador o regulador molecular en este sistema.

Un experto en la técnica reconocerá que el diseño de esta estrategia puede ser flexible. El aptámero puede incorporarse, por ejemplo, a cualquiera de los extremos (5' ó 3') de cualquiera de las dos partzimas que contienen secuencias del núcleo catalítico parciales. Como tal, el inhibidor del ensamblaje puede unirse a la región de aptámero y bien al brazo del sustrato (que se une al sustrato) o al brazo sensor (que se une al facilitador del ensamblaje). En el primer diseño (Figura 7 y este ejemplo), el inhibidor bloquea la unión del sustrato. En el último diseño, el inhibidor prevendrá la unión del facilitador del ensamblaje con la apta-partzima y por lo tanto prevendrá el ensamblaje de MNAzimas activas.

La bibliografía contiene secuencias para un gran número de aptámeros capaces de detectar muchos tipos de analitos. Éstos incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos, priones, nucleótidos, células completas y virus. Los aptámeros de todos estos tipos de analitos podrían unirse a partzimas para detectar un rango muy diverso de moléculas. Las condiciones de la reacción (tampón, temperatura, concentración de cationes divalentes etc), que son compatibles tanto con la unión de analitos a aptámeros (o apta-partzimas) como con la escisión de un sustrato informador por una MNAzima, pueden determinarse por ensayo empírico.

La actividad de la MNAzima puede modularse por la eliminación o adición del inhibidor del ensamblaje. El cambio de la secuencia oligonucleotídica, la temperatura de fusión y/o concentración puede conseguir una regulación más fina. La hibridación del inhibidor del ensamblaje en una MNA se ve afectada por muchos factores, incluyendo pero no limitado a, concentración de sal, concentración de cationes, temperatura y presencia o ausencia de aditivos (por ejemplo, DMSO). Como tales, las entidades que afectan la hibridación pueden proporcionar una herramienta para controlar el ensamblaje y desensamblaje de MNAzimas,

El facilitador del ensamblaje puede eliminarse por la manipulación física de componentes y puede conseguirse, por ejemplo, explotando bien las propiedades físicas de los restos unidos como "ganchos" moleculares, y/o explotando las propiedades inherentes de los oligonucleótidos, por ejemplo, carga negativa, o complementariedad de secuencia.

Las MNAzimas y apta-MNAzimas pueden usarse para la detección de analitos diana incluyendo dianas de ácido nucleico y/o ligandos distintos de ácido nucleico. Además, pueden usarse para detectar analitos en un formato de detección directa (como se demuestra en este ejemplo) o pueden usarse en reacciones en cascada de enzimas de ácidos nucleicos. En una realización, una MNAzima y/o una apta-MNAzima podría facilitar la primera etapa en la cascada. En una realización, la cascada de ácido nucleico podría usar una combinación de MNAzimas, o una combinación de MNAzima(s) y ADNzima(s) que podrían modificar uno o más sustrato(s), por ejemplo, por escisión y/o ligación.

Ejemplo 5: Una reacción en cascada que usa una enzima de ácidos nucleicos con actividad ligasa y una enzima de ácidos nucleicos con actividad de escisión.

Una reacción útil para inclusión en reacciones en cascada y/o interruptores moleculares que explota las actividades catalíticas de dos enzimas de ácidos nucleicos se resume en la Figura 8. Una reacción podría estar mediada por una ADNzima ligasa, que puede ligar un sustrato 5' con un fosfato cíclico 2', 3' y un sustrato 3' con un hidroxilo 5' para formar un producto de ligación con una unión 2'-5' no nativa en la unión de los dos sustratos. Los ejemplos de dichas ADNzima ligasas se conocen en la técnica (véase el resumen en la Tabla 4). La otra reacción podría estar mediada por una MNAzima escisora que podría usar el producto de ligación como un sustrato y podría escindirlo en la unión 2'-5' no nativa creada por ligación. La escisión podría producir dos productos de escisión, un producto 5' que tendría un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto 3' que tendría un extremo hidroxilo 5'. A su vez, uno o ambos de los productos de escisión podría servir como un sustrato o sustratos para la ADNzima ligasa.

Alternativamente, una reacción podría estar mediada por una ADNzima ligasa, que puede ligar un sustrato 5' con un diol 2',3' y un sustrato 3' con un extremo trifosfato 5' para formar un producto de ligación con una unión 3'-5' nativa en la unión de los dos sustratos. Los ejemplos de dichas ADNzima ligasas se conocen en la técnica (véase el resumen en la Tabla 4). La otra reacción podría estar mediada por una MNAzima escisora que podría usar el producto de ligación como un sustrato y podría escindirlo en la unión 3'-5' nativa creada por ligación. La escisión podría producir dos productos de escisión, un producto 5' que tendría un extremo fosfato cíclico 2', 3' y un producto 3' que tendría un extremo hidroxilo 5'. A su vez, uno o ambos de los productos de ligación podría servir como un sustrato o sustratos para una ADNzima ligasa que puede ligar dichos extremos.

Alternativamente, una MNAzima con actividad de escisión puede escindir en un sitio en un producto de ligación que no está en la unión de los dos sustratos ligables siempre que se cumpla el requerimiento del sitio de escisión en este sitio.

En un formato preferido (Figura 8), una ADNzima ligasa podría ligar un primer oligonucleótido (oligo 1) a un segundo oligonucleótido (oligo 2) para crear un oligonucleótido como tercer producto de ligación (LP) (oligo 3), siempre que

los oligo 1 y oligo 2 tengan extremos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5'. A su vez, el LP-oligo 3 podría escindirse por una MNAzima en los productos de escisión (CP), CP-oligo 1 y CP-oligo 2, regenerando así los oligonucleótidos con extremos fosfato cíclico 2', 3' e hidroxilo 5', que podrían participar en ciclos adicionales de ligación.

5 En un formato múltiple, varios oligonucleótidos, por ejemplo cuatro oligonucleótidos, cada uno con extremos fosfato cíclico 2',3' e hidroxilo 5', podrían ligarse por una serie de ADNzima ligasas en 16 nuevas secuencias LP únicas (es decir, cada combinación de oligonucleótidos 1, 2, 3 y 4). Una serie de MNAzimas podrían escindir entonces el LP-oligo 1 hasta LP-oligo 16 de nuevo en los oligonucleótidos componentes, ahora denominados CP-oligo 1, CP-oligo 2, CP-oligo 3 y CP-oligo 4. Alternativamente, una MNAzima con actividad de escisión puede escindir en un sitio en un LP que no está en la unión de los dos sustratos ligables siempre que se cumplan los requerimientos del sitio de escisión en este sitio. En este escenario, podrían crearse, mezclarse y/o redisponearse mezclas complejas de secuencias oligonucleotídicas.

15 Un conjunto de MNAzimas podría usar un facilitador del ensamblaje constante (como se ilustra) en la Figura 8, y/o la MNAzima podría usar las secuencias LP de ciclos de ligación previos como su facilitador del ensamblaje. Como tales, los nuevos datos de información (entrada) producidos por la ligación de oligonucleótidos, podría reconocerse "leerse" por la MNAzima. La MNAzima podría escindir "escribir" para producir nuevos productos de salida, y/o información. Los sistemas en los que las MNAzimas podrían leer el LP de entrada, y escindirlos en CP-oligos, distintos de los que estaban originalmente en el conjunto de moléculas de partida, podrían usarse para reescribir o recodificar nuevas secuencias de salida.

20 En algunas realizaciones, la ligación por una ADNzima podría "escribir" datos de entrada, por ejemplo, haciendo nuevos facilitadores del ensamblaje, o componentes de éstos. Una MNAzima podría "leer" los datos, interrogando la información codificada en el facilitador del ensamblaje usando los brazos sensores de la partzima. Una MNAzima podría entonces "escribir" los datos, por ejemplo, una nueva secuencia (por ejemplo, un producto de escisión) creando así nuevos datos de salida que podrían entonces "leerse" por una ADNzima ligasa (por ejemplo, averiguando la idoneidad de los productos de escisión de una MNAzima para servir como sustratos de ligación para la ADNzima ligasa).

25 En otras realizaciones, la escisión por una MNAzima podría "escribir" datos de entrada, por ejemplo, creando nuevos sustratos ligables. Una ADNzima ligasa podría "leer" los datos, interrogando la información codificada en los sustratos usando los brazos de unión a sustrato. Una ADNzima ligasa puede entonces "escribir" los datos, por ejemplo, haciendo un nueva secuencia de producto de ligación. El nuevo producto de ligación podría servir como un componente necesario para la formación de una MNAzima escisora activa, por ejemplo podría servir como un nuevo facilitador del ensamblaje o componente de éste. El producto de ligación podría proporcionar así nuevos datos de salida que podrían ser "leídos" por una MNAzima escisora (averiguando la idoneidad del producto de ligación de la ADNzima para servir como un facilitador del ensamblaje o componente del facilitador del ensamblaje para la MNAzima escisora).

35 Como tal, esta cascada MNAzima/ADNzima ligasa podría formar un autómatas. Dichos dispositivos son capaces de convertir información de una forma en otra, según un procedimiento definido. En este caso, los procedimientos estarían codificados y dirigidos por los brazos del sustrato y/o los brazos sensores de las MNAzimas y ADNzima ligasas.

40 Un autómatas, que era capaz de resolver problemas computacionales fue desarrollado por Benenson *et al*, 2001, usando ADN y enzimas proteicas (una endonucleasa de restricción y una ligasa). La endonucleasa de restricción escindió el ADN bicatenario y la proteína ligasa ligó los productos de escisión en una reacción en cascada. Las enzimas proteicas sirvieron como el "hardware" y el ADN codificó el "software". La entrada y el autómatas se programaron por la selección de las secuencias de software de ADN apropiadas. El autómatas procedió mediante una cascada de escisión con endonucleasa de restricción, ciclos de hibridación y ligación, produciendo una molécula de salida detectable que codificó el estado final del autómatas y así el resultado computacional (Benenson *et al*, 2001).

45 La cascada ADNzima ligasa/MNAzima podría usarse de una manera similar a la cascada usada por Benenson *et al* (2001) y proporcionar así un dispositivo capaz de resolver problemas computacionales. A diferencia del dispositivo de Benenson, una cascada ADNzima ligasa/MNAzima, no requiere enzimas proteicas para conseguir los mismos resultados. Aunque el dispositivo de Benenson se programó por ADN bicatenario, una cascada ADNzima ligasa/MNAzima, estaría codificada por las diferentes secuencias, incluyendo por ejemplo, el o los oligonucleótidos iniciales de entrada, los brazos de sustrato y/o los brazos sensores de las MNAzimas y los brazos de sustrato de las ADNzima ligasas.

55 En otra realización, la cascada ADNzima ligasa/MNAzima también podría usarse para "transponer" secuencias oligonucleotídicas como un método para construir, y/o incrementar la diversidad de bibliotecas moleculares.

En algunas realizaciones, podría usarse una ADNzima para crear o destruir componentes de MNAzima y/o MNA inactiva. Como ejemplo una ADN ligasa podría unir un "inhibidor de la actividad" a un "componente del facilitador del ensamblaje" lo que resulta en el ensamblaje del complejo MNAI (estado "inactivado"). Alternativamente, una

ADNzima podría unir un brazo sensor o de sustrato a un componente de partzima para crear un interruptor de "activación" para MNAzimas estimulando el ensamblaje. En otra realización, la ADNzima ligasa podría unirse a una secuencia marcada con un resto que permita capturar selectivamente a los oligonucleótidos, por ejemplo usando un grupo biotina o el resto podría contener una radio de campo magnético de radio-frecuencia para facilitar el control electrónico remoto de la hibridación. Esta estrategia podría permitir la eliminación selectiva de moléculas componentes permitiendo la activación o inhibición de la actividad enzimática. Por ejemplo, el inhibidor de la actividad podría desnaturalizarse selectivamente de un complejo MNAi, resultando en la transición al estado de MNAzima activa.

Se apreciará que la ADNzima ligasa usada en este ejemplo (como se ilustra en la Figura 8) podría reemplazarse por una MNAzima ligasa (como se ilustra en la Figura 11).

Ejemplo 6: Demostración de una reacción que explota la actividad de múltiples enzimas de ácidos nucleicos, en este ejemplo específicamente MNAzimas que escinden sustratos de ácido nucleico y ADNzimas que ligan sustratos de ácido nucleico, mediante la cual los productos de la escisión o ligación creados por un tipo de enzima de ácidos nucleicos forman un nuevo sustrato o componente de enzima que participa en la siguiente reacción de enzima de ácidos nucleicos.

La estrategia usada en este ejemplo se ilustra en la Figura 9. Este ejemplo demuestra (i) usando ácido nucleico diana para dirigir la formación de una MNAzima (MNAzima A) que puede escindir un sustrato (sustrato de MNAzima A) generando así un producto de escisión A 5' que a su vez puede usarse como un sustrato para una ADNzima B con actividad ligasa. (ii) usando una ADNzima ligasa B para ligar el producto de escisión A 5' generado en la etapa (i) a otro sustrato de ligación oligonucleótido creando así una nueva partzima; y (iii) usando la nueva partzima/producto de ligación generado en la etapa (ii) para formar una nueva MNAzima (MNAzima C) que puede escindir un sustrato (sustrato de MNAzima C). En este ejemplo, el marcaje del sustrato de MNAzima C con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador permitió la monitorización de la fluorescencia de la reacción.

Se había reportado previamente que la ADNzima ligasa B usada en este ejemplo liga ARN mediante la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' a partir de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo hidroxilo 5' (Prior *et al*, 2004). Aparte del requerimiento de un sustrato 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3', la ADNzima ligasa usada en este ejemplo también requiere un resto de secuencia específico en la unión de la ligación, siendo ua*g(A o G) (en el que la minúscula indica bases de ARN y la mayúscula indica una base de ARN o ADN y * indica el sitio de ligación).

En la primera etapa, la MNAzima A se forma en presencia de ácido nucleico diana y se usa para escindir el sustrato A de la MNAzima (preSub5) generando así un fragmento de escisión que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la segunda etapa, la ADNzima ligasa se usó entonces para ligar el producto A 5' (fragmento de escisión preSub5) con otro sustrato de ligación oligonucleotídico (preSub3). En la tercera etapa, el producto ligado funciona como una nueva partzima, que junto con una segunda partzima y un facilitador del ensamblaje puede formar MNAzima C y escindir un sustrato C marcado con fluorescencia (SubBi-2-FB).

6.1 ADNzima Ligasa B

La secuencia de oligonucleótido de ADN que actúa como una ADNzima ligasa se lista a continuación.

SEQ	ID	NO:	17	ADNzima	ligasa	7Z81-10/10:
CCTCTCGTTGACGGCGGAGTGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC						

6.2 Oligonucleótidos de partzima

En las secuencias siguientes, las bases en negrita hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *itálica* hibridan con el sustrato.

Lo siguiente son secuencias de las partzimas que forman componentes de MNAzima A:

SEQ ID NO: 18 Partzima A2/MNAzima A miR20A2/1: *TACCTGCACTACGGTCGAAA TA GTGA GT*

SEQ ID NO: 19 Partzima B3/MNAzima A miR20B3/1: *CATCTCTTCTCCGAGC***TAAGCACTTTA**

La secuencia siguiente corresponde a la partzima que se asocia con el producto de ligación/partzima para formar un componente de MNAzima C.

SEQ	ID	NO:	20	Partzima	B5/MNAzima	C
STB5/2(21): TGCCCAGGGAGGCTAGCT CTGTCTCGGAGTGGTCTCG						

6.3 Sustrato de MNAzima A (sustrato para la MNAzima A)

En la secuencia siguiente, las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 21 preSub5: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATG

6.4 Sustrato de ADNzima Ligasa

En la secuencia siguiente, la base en minúscula representa ARN y las bases en mayúscula representan ADN. El sustrato 3' de ADNzima ligasa se sintetizó para tener la secuencia siguiente y un grupo hidroxilo 5':

5 SEQ ID NO: 22 preSub3: gGAACAACGAGAGGAAACCTT

6.5 Sustrato de MNAzima C (Sustrato informador fluorescente para MNAzima C)

10 El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-2. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5', un resto BHQ1 en el extremo 3' y designado SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se monitorizó 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 lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

6.6 Secuencia diana para MNAzima A

15 La secuencia diana reconocida por MNAzima A fue un oligonucleótido de ADN sintético homólogo a la secuencia de ARN microRNA miR-20 humana. Tenía la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 23 D-20 diana (diana de MNAzima A): TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

6.7 Facilitador del ensamblaje para MNAzima C

El facilitador del ensamblaje requerido para la formación de la MNAzima C fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

20 SEQ ID NO: 24 Facilitador del Ensamblaje para MNAzima C:
CGACGACCACTCCGACGACAGTCCTATAGTGAGTGCTACAG

6.8 Condiciones de la Reacción

La reacción se realizó en tres etapas secuenciales (i), (ii) y (iii) en tres tubos separados como se describe a continuación.

25 (i) La escisión de preSub5 por MNAzima A para generar el producto de escisión 5'/sustrato de ligasa con el extremo fosfato cíclico 2', 3' requerido se realizó a 40°C durante 1 hora en un volumen total de reacción de 100 ml. Las reacciones contenían 500 nM preSub5, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 25 mM MgCl₂ y:

- a) Partzimas para MNAzima A (100 nM miR20A2/1 y 100 nM miR20B3/1) y 100 nM de diana D-20; o
- b) sin oligonucleótidos adicionales (control sin escisión)

30 (ii) La ligación se realizó a 40°C durante 2 horas en un volumen total de reacción de 25ml. Las reacciones contenían 10 ml de la mezcla de reacción de escisión previa (i-a) o (i-b), 200 nM preSub3, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 40 mM MgCl₂ y:

- a) 200 nM de ADNzima ligasa 7Z81-10/10, o
- b) sin oligonucleótido adicional (control sin ligación)

35 (iii) La detección fluorescente de punto final debida a la escisión de MNAzima mediada por una partzima formada por la ligación se realizó isotérmicamente a 55°C durante 45 minutos en el Cepheid Smartcycler. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato marcado con fluorescencia SubBI-2-FB. Las reacciones contenían 10ml de la mezcla de reacción de ligación previa, 200 nM de partzima STB5/2(21), 200 nM del facilitador del ensamblaje para MNAzima C, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 25 mM MgCl₂ y 200 nM del sustrato SubBi-2-FB en un
40 volumen total de reacción de 25 ml.

El incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de la MNAzima C (SubBi-2-FB) se monitorizó con el tiempo para reacciones que habían contenido los reactivos oligonucleotídicos siguientes (Tabla 6).

Tabla 6. Incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de la AmAzima C (SubBi-2-FB) monitorizado con el tiempo.

	Etapa (i)	Etapa (ii)	Etapa (iii)	Resultado
Reacción 1 (Ensayo i-a, ii-a)	* Sustrato A * MNAzima A partzimas * Diana	* 10ml de la etapa (i) * Sustrato ligasa * ADNzima ligasa	* 10ml de la etapa (ii) * MNAzima C partzima B * Sustrato C * Facilitador del ensamblaje C	Se observó un incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 2 (Control (i-b, ii-a - sin MNAzima A)	* Sustrato A	* 10ml de la etapa (i) * Sustrato ligasa * ADNzima ligasa	* 10ml de la etapa (ii) * MNAzima C partzima B * Sustrato C * Facilitador del ensamblaje C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 3 (Control (i-a, ii-b) - sin ADNzima ligasa)	* Sustrato A * MNAzima A partzimas * Diana	* 10ml de la etapa (i) * Sustrato ligasa	* 10ml de la etapa (ii) * MNAzima C partzima B * Sustrato C * Facilitador del ensamblaje C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo

El incremento en la fluorescencia con el tiempo se midió para la etapa (iii) de las reacciones 1, 2 y 3 (Tabla 6). La Reacción 1, que había contenido todos los componentes de reacción de oligonucleótido para las etapas (i), (ii) y (iii), mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. Por el contrario, la Reacción 2, que carecía tanto de los componentes de partzima oligonucleótidos de la MNAzima A como de la secuencia diana para MNAzima A para la etapa (i) no mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. De manera similar, la Reacción 3, que carecía del oligonucleótido de ADNzima ligasa requerido para la etapa (ii), no mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. Conjuntamente estas reacciones indican que los eventos siguientes han ocurrido en la Reacción 1.

- 5
- 10 En primer lugar, la MNAzima A escindió el sustrato de la MNAzima A en presencia de la diana específica (D-20) produciendo dos fragmentos, uno de los cuales es el fragmento 5' con la secuencia CTGTAGCACTCACTAua (SEQ ID NO: 40) que tenía un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En segundo lugar, este fragmento 5' se ligó a un segundo sustrato oligonucleotídico de ligasa presente en la mezcla de reacción de la etapa (ii) y esto resultó en la formación de un nuevo oligonucleótido (producto de ligación) con la secuencia de
- 15 CTGTAGCACTCACTAuaGGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO: 51) (en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN). Este producto de ligación a su vez funcionó como un componente de partzima para MNAzima C. Esta partzima creada de nuevas se asoció con una segunda partzima en presencia de un facilitador del ensamblaje y creó MNAzima C. La MNAzima C escindió el sustrato de la MNAzima C (SubBi-2-FB) resultando en la separación de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador causando así un incremento
- 20 en la fluorescencia.

El control "sin escisión de MNAzima A" (Reacción 2) demostró que la escisión y generación del fragmento 5' con el extremo fosfato cíclico 2', 3' era esencial para la ligación y formación posterior de una de las partzimas requeridas para MNAzima C. El control "sin ligación" (Reacción 3) demostró que la ligación del producto de escisión A 5' con el extremo fosfato cíclico 2', 3' a un segundo sustrato de ligasa 3' era esencial para la formación de uno de los componentes de MNAzima C.

25

La estrategia demostrada en este ejemplo permite la detección de analitos diana en una reacción en cascada que usa dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente ADNzimas que pueden ligar sustratos (ADNzima ligasas) y MNAzimas que pueden escindir sustratos (MNAzima escisoras). El recambio múltiple en cada etapa enzimática en la cascada podría permitir la amplificación de la señal.

- 30 La estrategia de la cascada demostrada en este ejemplo e ilustrada en la Figura 9 podría extenderse y usarse para crear una cascada de amplificación con retroalimentación. Si la secuencia del producto de escisión C 5' fuera la misma que el producto de escisión A 5', este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora C estaría generando de

manera constante el sustrato B 5' que a su vez se ligaría por la ADNzima ligasa B para crear más partzimas para la formación de más MNAzima escisora C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje, por ejemplo, un analito diana, que podría dirigir el ensamblaje de MNAzima escisora A. La estrategia permitiría la detección de analitos diana seguido de la amplificación de la señal por cascada con retroalimentación usando dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente ADNzimas que pueden ligar sustratos (ADNzima ligasas) y MNAzimas que pueden escindir un sustrato (MNAzimas escisoras).

Un experto en la técnica apreciará que existen muchas variantes en esta estrategia en cascada básica. Como ejemplo, la ADNzima B podría usarse para crear productos de ligación que sirven como facilitadores del ensamblaje para otra MNAzima que podría tener, por ejemplo, actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática. Las variaciones adicionales están incluidas a lo largo de la especificación.

Ejemplo 7. Secuencias y condiciones que permiten la formación de MNAzimas con actividad ligasa y ensayo de estas MNAzimas con actividad ligasa en un formato útil en reacciones en cascada.

La ADNzima ligasa 7Q10 se usó como una base para generar secuencias de partzima de MNAzima ligasa candidatas en este ejemplo. Como se ilustra en la Figura 10 cada partzima ligasa estaba comprendida por tres dominios de secuencia, incluyendo (i) un brazo sensor que hibrida con el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un ácido nucleico diana), (ii) un dominio que constituye parte de un núcleo catalítico y (iii) un brazo de unión a sustrato. Las secuencias de núcleo parcial se diseñaron para incorporar partes de la región catalítica de la ADNzima ligasa 7Q10 que se había reportado previamente que liga ARN mediante la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' a partir de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo hidroxilo 5' (Flynn-Charlebois *et al*, 2003).

Se usó un ensayo con múltiples etapas para evaluar la actividad enzimática de combinaciones de secuencias partzima candidatas. La estrategia general se resume en la Figura 12 y también puede formar la base de una técnica de amplificación de la señal. En la primera etapa, la MNAzima A se forma en presencia del facilitador del ensamblaje A y se usa para escindir el sustrato de la MNAzima A generando así un producto de escisión A 5' que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la segunda etapa, la MNAzima B activa con actividad ligasa, se ensambla en presencia del facilitador del ensamblaje B y liga el producto A 5' (sustrato B 5') a un sustrato B 3'. En la tercera etapa, el producto ligado B funciona como una nueva partzima, que junto con otra partzima y un facilitador del ensamblaje C puede formar MNAzima C y escindir un sustrato C que puede estar, por ejemplo, marcado con fluorescencia. Se ensayó la actividad catalítica de varias parejas de partzima ligasa.

7.1 Oligonucleótidos de partzima que incorporan dominios que corresponden a secuencias de núcleo catalítico incompletas de una ADNzima con actividad ligasa (7Q10).

En este experimento, todas las series de parejas de partzima, para la segunda etapa, se sintetizaron con brazos sensores diseñados para hibridar con un facilitador del ensamblaje (AFMzLB), y con brazos de sustrato diseñados para hibridar con dos secuencias de sustrato, 5LSubB y 3LSubB. Las secuencias de las parejas de partzima usadas en este experimento se listan a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de las MNAzimas candidatas ensambladas, las bases en negrita (dominio sensor) hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en *italica* (dominio de sustrato) hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 25 División 1 Partzima A - RO5LS1A: **AACGAGTCCTGGCCTTGTCT**GGCTCTAGTGAGTGC

SEQ ID NO: 26 División 1 Partzima B - RO5LS1B: *TCTCGTTGTT*ACGTGGAGGT**GTGGAGACGGATTACACCTT**

SEQ ID NO: 27 División 2 Partzima A - RO5LS2A: **AACGAGTCCTGGCCTTGTCT**GGGCTCTAGTGAGTGC

SEQ ID NO: 28 División 2 Partzima B - RO5LS2B: *TCTCGTTGTT*ACGTGGAGGT**GTGGAGACGGATTACACCTT**

SEQ ID NO: 29 División 3 Partzima A - RO5LS3A: **AACGAGTCCTGGCCTTGTCTT**GGGCTCTAGTGAGTGC

SEQ ID NO: 30 División 3 Partzima B - RO5LS3B: *TCTCGTTGTT*ACGTGGAGGT**GTGGAGACGGATTACACCTT**

SEQ ID NO: 31 División 4 Partzima A - RO5LS4A: **AACGAGTCCTGGCCTTGTCTT**GGAGGTGGGCTCTAGTGAGTGC

SEQ ID NO: 32 División 4 Partzima B - RO5LS4B: *TCTCGTTGTT*ACGGTGGAGACGGATTACACCTT

SEQ ID NO: 33 División 5 Partzima A - RO5LS5A: **AACGAGTCCTGGCCTTGTCT**GGAGGTGGGCTCTAGTGAGTGC

SEQ ID NO: 34 División 5 Partzima B - RO5LS5B: *TCTCGTTGTT*ACGTGTGGAGACGGATTACACCTT

SEQ ID NO: 35 División 6 Partzima A -
 RO5LS6A: **AACGAGTCTGGCCTTGTCTGTGGAGGTGGGCTCTAGTGAGTGC**

SEQ ID NO: 36 División 6 Partzima B - RO5LS6B: **TCTCGTTGTTACGTGGAGACGGATTACACCTT**

5 SEQ ID NO: 37 División 7 Partzima A -
 RO5LS7A: **AACGAGTCTGGCCTTGTCTGAGGTGGGCTCTAGTGAGTGC**

SEQ ID NO: 38 División 7 Partzima B - RO5LS7B: **TCTCGTTGTTACGTGGTGGAGACGGATTACACCTT**

7.2 ADNzima control con actividad ligasa.

10 En este experimento se usó una ADNzima ligasa 7Q10 con brazos de sustrato diseñados para hibridar con las secuencias de sustrato 5LSubB y 3LSubB y la secuencia se lista a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas forman el núcleo catalítico y las bases en *itálica* hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 39 ADNzima ligasa- 7Q10-10/10: **TCTCGTTGTTACGTGGAGGTGGGCTCTAGTGAGTGC**

7.3 Sustrato de MNAzima A (sustrato para la MNAzima A)

En la secuencia siguiente, las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 21 SubA/Pre5LSubB: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATG

15 7.4 El sustrato B 3' para la ligación

La secuencia del sustrato 3' para la ligación usado en este experimento se lista a continuación (5' a 3'). El oligonucleótido tiene un grupo hidroxilo 5'. Las bases en minúscula representan ARN y las mayúsculas representan ADN.

SEQ ID NO: 22 Sustrato B 3' de Ligasa - 3LSubB: gGAACAACGAGAGGAAACCTT

20 7.5 Sustrato para MNAzima C (Sustrato informador fluorescente C para la detección)

25 El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-2. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5', un resto BHQ1 en el extremo 3' y designado SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se monitorizó 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 lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

7.6 Facilitadores del ensamblaje

El facilitador del ensamblaje A reconocido por los dominios sensores de la MNAzima A fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

30 SEQ ID NO: 42 AF-MzCA: CGTCGTGAGATGAGGAAGAGATGGATGGGCAC

El facilitador del ensamblaje B reconocido por los dominios sensores de la MNAzima B fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 43 AF-MzLB: AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

35 El facilitador del ensamblaje C reconocido por los dominios sensores de la MNAzima C fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 24 AF-MzCC: CGACGACCACTCCGACGACAGTCCTATAGTGAGTGCTACAG

7.7 Partzimas para MNAzimas con actividad de escisión.

Se sintetizaron partzimas para MNAzima A con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 45 Partzima A/MNAzima A - 4SyntA2/1(16): GTGCCCATCCATCTCCGGTCGAAATAGTGAGT

40 SEQ ID NO: 46 Partzima B/MNAzima A - 4SyntB3/1(16): CATCTCTTCTCCGAGCTTCTCATCTCACGACG

Se sintetizó una partzima para MNAzima C con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 20 Partzima B/MNAzima C - STB5/2(21)
 TGCCCAGGGAGGCTAGCTCTGTCGTCGGAGTGGTCGTCG

7.8 Detección de actividad ligasa.

7.8.1 Condiciones de la Reacción

La reacción se realizó en tres etapas secuenciales (i), (ii) y (iii) en tres tubos separados como se describe a continuación.

- 5 (i) La escisión de SubA/pre5LSubB por MNAzima A para generar el sustrato 5' de la ligasa (5LSubB) con el extremo requerido fosfato cíclico 2',3' se realizó a 40°C durante 1 hora. Las reacciones contenían 100 nM de partzima 4SyntA2/1(16), 100 nM de partzima 4SyntB3/1(16), 100 nM del facilitador del ensamblaje AF-MzCA, 500 nM SubA/Pre5LSubB, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 50 mM MgCl₂.
- 10 (ii) Las ligaciones se realizaron a 40°C durante 2 horas en un volumen total de reacción de 25 ml. Las reacciones contenían 10 ml de la mezcla de reacción de escisión de la etapa (i), 200 nM 3LSubB, 200 nM AF-MzLB, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 40 mM MgCl₂ y:
- a) 200 nM de ADNzima ligasa control 7Q10-10/10, o
 - b) 200 nM de cada una de División 1 partzimas A y B (RO5LS1A y RO5LS1B), o
 - c) 200 nM de cada una de División 2 partzimas A y B (RO5LS2A y RO5LS2B), o
 - 15 d) 200 nM de cada una de División 3 partzimas A y B (RO5LS3A y RO5LS3B), o
 - e) 200 nM de cada una de División 4 partzimas A y B (RO5LS4A y RO5LS4B), o
 - f) 200 nM de cada una de División 5 partzimas A y B (RO5LS5A y RO5LS5B), o
 - g) 200 nM de cada una de División 6 partzimas A y B (RO5LS6A y RO5LS6B), o
 - h) 200 nM de cada una de División 7 partzimas A y B (RO5LS7A y RO5LS7B), o
 - 20 i) 200 nM de cada una de División 2 partzima A (RO5LS2A) y División 4 partzima B (RO5LS4B).

Una reacción control adicional "sin sustrato 5' de ligación" carecía de 10 ml de la mezcla de reacción de escisión de la etapa (i). Esta mezcla de reacción contenía 200 nM 3LSubB, 200 nM de cada una de División 4 partzimas A y B (RO5LS4A y RO5LS4B), 150 mM NaCl, 2mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 40 mM MgCl₂, 200 nM AF-MzLB y 200 nM de SubA/Pre5LSubB

- 25 (iii) La detección fluorescente debida a la escisión de MNAzima C mediada por una partzima formada por ligación en la etapa (ii) se realizó isotérmicamente a 55°C durante hasta 3,5 horas en el Cepheid Smartcycler con puntos de recogida de datos a intervalos de 5 minutos. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato marcado con fluorescencia SubBi-2-FB. Las reacciones contenían 10 ml de la mezcla de reacción de ligación previa (ii-a o ii-b o ii-c o ii-d o ii-e o ii-f o ii-g o ii-h o ii-i o control "sin sustrato de ligación"), 200 nM de partzima B para MNAzima C (STB5/2(21)), 200 nM del facilitador del ensamblaje para MNAzima C (AF-MzCC), 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 25 mM MgCl₂ y 200 nM del sustrato SubBi-2-FB en un volumen total de reacción de 25 ml. El incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima C (SubBi-2-FB) se monitorizó con el tiempo para las reacciones.

7.8.2 Resultados

- 35 a) Reacciones control.

La reacción de control positivo de la ADNzima ligasa (etapas i, ii-a y iii) mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. Esta reacción confirma que la MNAzima A puede formarse y escindir SubA/Pre5LSubB para generar un producto (5LSubB) que tiene un fosfato cíclico 2', 3' que le hace adecuado para uso como un sustrato por la ADNzima ligasa. La secuencia de 5LSubB es CTGTAGCACTCACTAua (SEQ ID NO: 40) en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN. Esta reacción control demostró que la ADNzima ligasa uni-molecular 7Q10-10/10 ligaba 5LSubB y 3LSubB y formaba un nuevo oligonucleótido (producto de ligación) con la secuencia de CTGTAGCACTCACTAuagGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO: 51) (en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN). Este producto de ligación a su vez funcionaba como un componente de partzima de la MNAzima C que escindió el sustrato C (SubBi-2-FB) resultando en un incremento en la fluorescencia. Este incremento en la fluorescencia actuó como un marcador sustituto de actividad ligasa.

La reacción control "sin sustrato 5' de ligación" (etapas ii y iii sólo) no mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. Esto demuestra que si SubA/Pre5LSubB no es escindido por la MNAzima A para generar 5LSubB no está disponible el sustrato de ligación 5' apropiado para la ligación a 3LSubB. Como resultado, no se genera partzima para MNAzima C y no se observa incremento en la fluorescencia.

50

b) Reacciones diseñadas para ensayar la presencia de actividad ligasa cuando se usan parejas de partzima candidatas que pueden tener o no la capacidad de formar MNAzima ligasas funcionales.

5 Las reacciones que incorporaban las etapas i y iii junto con cualquiera de las etapas ii-e (División 4) o ii-f (División 5) mostraron un incremento en la fluorescencia con el tiempo. La división del núcleo catalítico de la ADNzima ligasa 7Q10 en estas posiciones y reensamblando los núcleos parciales en las partzimas en presencia de un facilitador del ensamblaje produjo MNAzima ligasas activas en estas condiciones de reacción.

10 Las reacciones que incorporaban las etapas i y iii junto con cualquiera de las etapas ii-b (División 1) o ii-c (División 2) o ii-d (División 3) o ii-g (División 6) o ii-h (División 7) o ii-i (División 2/4) no mostraron incremento en la fluorescencia después de 35 min de monitorización de la escisión por MNAzima C. Esto demuestra que la división del núcleo catalítico de la ADNzima ligasa 7Q10 en estas posiciones y reensamblando los núcleos parciales con un facilitador del ensamblaje no produce actividad de MNAzima ligasa detectable en estas condiciones de reacción.

El ejemplo ha generado varias secuencias de partzima que pueden usarse para ensamblar complejos MNA, que son inactivos o tienen varios niveles de actividad enzimática dependiendo de las secuencias específicas y combinaciones de éstas. El diseño general para secuencias partzima candidatas se resume en la Tabla 7.

15 Tabla 7. Diseño general para secuencias de partzimas ensayadas.

Secuencias de las parejas de secuencia de partzima (basado en la ADNzima ligasa 7Q10) que se ensayaron para actividad de MNAzima ligasa potencial en las que N es cualquier nucleótido, (N)x es cualquier número de nucleótidos que se unen a una secuencia sustrato (dominio de sustrato) y (N)y es cualquier número de nucleótidos que se unen a un facilitador del ensamblaje (dominio		
sensor). Los SEQ ID NO sólo se refieren a las secuencia núcleo.		
División#	Partzima A	Partzima B
División 1	(N)yGGCTC (N)x (SEQ ID NO: 101)	(N)xACGTGGAGGTG (N)y (SEQ ID NO: 41)
División 2	(N)y GGGCTC(N)x (SEQ ID NO: 102)	(N)x ACGTGGAGGT (N)y (SEQ ID NO: 44)
División 3	(N)y TGGGCTC(N)x (SEQ ID NO: 103)	(N)xACGTGGAGG(N)y (SEQ ID NO: 104)
División 4	(N)y TGGAGGTGGGCTC (N)x (SEQ ID NO : 47)	(N)xACG(N)y (SEQ ID NO: 48)
División 5	(N)y GGAGGTGGGCTC (N)x (SEQ ID NO : 49)	(N)xACGT(N)y (SEQ ID NO: 50)
División 6	(N)y GTGGAGGTGGGCTC (N)x (SEQ ID NO: 53)	(N)xAC(N)y (SEQ ID NO: 105)
División 7	(N)y GAGGTGGGCTC (N)x (SEQ ID NO: 54)	(N)xACGTG(N)y (SEQ ID NO: 106)
División 2/4	(N)yGGGCTC (N)x (SEQ ID NO: 102)	(N)xACG(N)y (SEQ ID NO: 48)
Secuencia de la ADNzima ligasa 7Q10 en la que N es cualquier nucleótido y (N)x es cualquier número de nucleótidos que se unen a una secuencia sustrato.		
(N)x ACGTGGAGGTGGGCTC(N)x (SEQ ID NO: 52)		

20 Las MNAzimas activas, incluyendo los ejemplos como se ha demostrado anteriormente con divisiones equivalentes a División 4 o División 5 tendrían un amplio número de aplicaciones. Como ejemplo, las MNAzima ligasas podrían usarse para detectar analitos diana. Las MNAzima ligasas pueden diseñarse para ensamblarse sólo en presencia de un analito tal como una secuencia diana de ARN o ADN (el facilitador del ensamblaje). Si el sustrato de ligación 5' y el sustrato de ligación 3' estuvieran cada uno marcados con un marcador fluoróforo y apantallador respectivamente (o viceversa) entonces la ligación resultaría en una disminución de la fluorescencia, lo que podría servir como un indicador de la presencia del analito diana. En un formato alternativo, si el sustrato de ligación 5' estuviera marcado con un resto detectable, por ejemplo un fluoróforo, y el sustrato de ligación 3' estuviera unido en una localización discreta, por ejemplo en un chip o lecho, entonces la ligación resultaría en la aparición de una señal en la localización discreta en presencia del analito diana.

25 La estrategia usada para ensayar la actividad ligasa en este ejemplo se ilustra en la Figura 12. Una vez que se han identificado partzimas activas, puede usarse la misma reacción en cascada para detectar la presencia de un facilitador del ensamblaje, por ejemplo un analito diana. La reacción en cascada que permite la detección usa dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente MNAzimas que pueden ligar sustratos y MNAzimas que

pueden escindir sustratos. El recambio múltiple en cada etapa enzimática en la cascada podría permitir la amplificación de la señal.

La cascada demostrada en este ejemplo e ilustrada en la Figura 12 podría extenderse y usarse para crear una cascada de amplificación con retroalimentación. Si la secuencia del producto de escisión C 5' fuera la misma que el producto de escisión A 5', este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora C podría generar de manera constante el sustrato B 5' que a su vez podría ligarse por la MNAzima ligasa B para crear más partzimas para la formación de más MNAzima escisora C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para amplificación con retroalimentación después del inicio de una reacción por un analito diana que podría dirigir el ensamblaje de MNAzima escisora A. La estrategia permitiría la detección de analitos diana seguido de la amplificación de la señal por una cascada con retroalimentación usando dos tipos de MNAzima, concretamente MNAzima ligasas y MNAzima escisoras.

Además, este ejemplo también puede considerarse como un ejemplo de una reacción en la que la etapa de inicio resulta en la formación de una MNAzima con actividad ligasa. En este escenario, respecto a la Figura 12, el ácido nucleico diana iniciador sería el facilitador del ensamblaje B (AF-MzLB) y el facilitador del ensamblaje A (AF-MzCA) sería una molécula sintética incluida para dirigir el ensamblaje de la MNAzima A. La MNAzima A tendría entonces el único propósito de generar un sustrato ligable B 5' con extremos fosfato cíclico 2'3' en una reacción que podría añadirse a la reacción que detecta el facilitador del ensamblaje diana B usando una MNAzima B con actividad ligasa. Esto podría proporcionar un método práctico para producir sustratos con un extremo fosfato cíclico 2'3' que son costosos de sintetizar y relativamente inestables. Además, las partzimas MNAzima A y el facilitador del ensamblaje A podrían reemplazarse por una ADNzima con actividad de escisión presente bien en una reacción preliminar separada para la generación de un sustrato ligable o la ADNzima podría estar presente en la misma mezcla de reacción que la MNAzima con actividad ligasa. El Ejemplo 11 demuestra que la escisión y la ligación usando una combinación de una MNAzima y una ADNzima puede realizarse en una única mezcla de reacción.

Un experto en la técnica apreciará que existen muchas variantes en esta estrategia en cascada básica. Como ejemplo, la MNAzima B podría usarse para crear productos de ligación que sirven como facilitadores del ensamblaje para otra MNAzima con actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática. En otro ejemplo, la MNAzima C podría modificar un sustrato por medios distintos de la escisión. Las realizaciones adicionales están incluidas a lo largo de la especificación.

Ejemplo 8: Una estrategia ejemplar para cambiar un complejo MNA entre el "estado activo" de una MNAzima activa al "estado inactivo" de un complejo MNAI usando una segunda MNAzima con actividad ligasa.

La Figura 13 ilustra una estrategia ejemplar para cambiar un complejo MNA entre el "estado activado" de una MNAzima activa al "estado inactivado" de un complejo MNAI usando una segunda MNAzima con actividad ligasa. En esta estrategia, una MNAzima A activa, que podría ser capaz de modificar (por ejemplo, escindir o ligar) un sustrato(s) A podría formarse en presencia del componente facilitador del ensamblaje 1 (AFC 1) y componente facilitador del ensamblaje 2 (AFC 2). Una segunda MNAzima B, que tiene actividad ligasa, podría formarse en presencia, por ejemplo, de un facilitador del ensamblaje 3 (AF3) que podría comprender uno o más componentes y podría ligar AFC 2 con un componente inhibidor de la actividad (AIC) causando la formación de un inhibidor de la actividad (AI). Este AI podría unirse a los componentes partzima para la MNAzima A y resultar en la formación de un complejo MNAI A que es inactivo. Como tal, la MNAzima ligasa en este ejemplo podría operar como un interruptor de inactivación para inactivar una MNAzima A. El complejo MNAI inactivo y la MNAzima catalíticamente activa representarían dos estados alternativos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "inactivado" y el estado "activado" respectivamente.

Ejemplo 9. Secuencias y condiciones que permiten la formación de MNAzimas con actividad ligasa y ensayo de estas MNAzimas con actividad ligasa en un formato útil en una cascada de amplificación de la señal.

La ADNzima ligasa 7Z81 se usó como una base para generar secuencias de partzima de MNAzima ligasa candidatas en este ejemplo. Como se ilustra en la Figura 10 cada partzima ligasa estaba comprendida por tres dominios de secuencia, incluyendo (i) un brazo sensor que hibrida con el facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un ácido nucleico diana), (ii) un dominio que constituye parte de un núcleo catalítico y (iii) un brazo de unión a sustrato. Las secuencias de núcleo parcial se diseñaron para incorporar partes de la región catalítica de la ADNzima ligasa 7Z81 que se había reportado previamente que liga ARN mediante la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' a partir de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo hidroxilo 5' (Prior *et al*, 2004).

Se usó un ensayo con múltiples etapas para evaluar la actividad enzimática de combinaciones de secuencias partzima candidatas. La estrategia general se resume en la Figura 12 y también puede formar la base de una técnica de amplificación de la señal. En la primera etapa, la MNAzima A se forma en presencia del facilitador del ensamblaje A y se usa para escindir el sustrato de la MNAzima A generando así un producto de escisión A 5' que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la segunda etapa, la MNAzima B activa con actividad ligasa, se ensambla en presencia del facilitador del ensamblaje B y liga el producto A 5' (sustrato B 5') a un sustrato B 3'. En la tercera etapa, el producto ligado B funciona como una nueva partzima, que junto con otra partzima y un facilitador del

ensamblaje C puede formar MNAzima C y escindir un sustrato C, que puede estar, por ejemplo, marcado con fluorescencia. Se ensayó la actividad catalítica de varias parejas de partzima ligasa candidatas.

9.1 Oligonucleótidos de partzima que incorporan dominios que corresponden a secuencia de núcleo catalítico incompletas de una ADNzima con actividad ligasa (7Z81).

- 5 En este experimento, todas las series de parejas de partzima, para la segunda etapa, se sintetizaron con brazos sensores diseñados para hibridar con un facilitador del ensamblaje (AFMzLB), y con brazos de sustrato diseñados para hibridar con dos secuencias de sustrato, 5LSubB y 3LSubB. Las secuencias de las parejas de partzima usadas en este experimento se listan a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de las MNAzimas candidatas ensambladas, las bases en **negrita** (dominio sensor) hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en *itálica* (dominio de sustrato) hibridan con los sustratos.

	SEQ	ID	NO:	55	División	1	Partzima	A	-
	RO5S1A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>GGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>								
	SEQ	ID	NO:	56	División	1	Partzima	B	-
	RO5S1B: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGCGGAGTGATT</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								
15	SEQ	ID	NO:	57	División	2	Partzima	A	-
	RO5S2A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>GGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>								
	SEQ	ID	NO:	58	División	2	Partzima	B	-
	RO5S2B: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGCGGAGTGAT</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								
20	SEQ	ID	NO:	59	División	3	Partzima	A	-
	RO5S3A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>ATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>								
	SEQ	ID	NO:	60	División	3	Partzima	B	-
	RO5S3B: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGCGGAGTG</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								
	SEQ	ID	NO:	61	División	4	Partzima	A	-
	RO5S4A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>TGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>								
25	SEQ	ID	NO:	62	División	4	Partzima	B	-
	RO5S4B: <u>CCTCTCGTTGACGGCGGAGG</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								
	SEQ	ID	NO:	63	División	5	Partzima	A	-
	RO5S5A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>AGTGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>								
30	SEQ	ID	NO:	64	División	5	Partzima	B	-
	RO5S5B: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGCGGG</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								
	SEQ	ID	NO:	65	División	6	Partzima	A	-
	RO5S6A: CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT <u>GGAGTGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAG TGC</u>								
	SEQ ID NO: 66 División 6 Partzima B - RO5S6B: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGC</u> GTGGAGACGGATTACACCTT								

9.2 ADNzima control con actividad ligasa.

- 35 La ADNzima ligasa usada en este ejemplo se ha reportado previamente que liga ARN y forma una unión fosfodiéster 2'-5' usando un sustrato de ligación 5' con un fosfato cíclico 2', 3' y un sustrato de ligación 3' con un grupo hidroxilo 5' (Prior *et al*, 2004). Aparte del requerimiento de extremos específicos en los sustratos, la ADNzima ligasa usada en este ejemplo también requiere un resto de secuencia específico en la unión de la ligación.

- 40 En este experimento se usó una ADNzima ligasa 7Z81 con brazos de sustrato diseñados para hibridar con las secuencias de sustrato 5LSubB y 3LSubB y la secuencia se lista a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas formar el núcleo catalítico y las bases en *itálica* hibridan con los sustratos.

	SEQ	ID	NO:	17	ADNzima	ligasa	-	7Z81-
	10/10: <i>CCTCTCGTTG</i> <u>ACGGCGGAGTGATT</u> <u>GGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC</u>							

9.3 Sustrato de MNAzima A (sustrato para la MNAzima A)

- 45 La secuencia del Sustrato A (Pre5LSubB2-FB) está a continuación. Está marcado internamente 5' de las ribobases con un resto 6-FAM y marcado 3' de las ribobases con el resto BHQ1 (bases subrayadas). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 67 Sustrato A - Pre5LSubB2-FB: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATGAG

9.4 El sustrato B 3' para la ligación

La secuencia del sustrato 3' para la ligación usado en este experimento se lista a continuación (5' a 3'). El oligonucleótido tiene un grupo hidroxilo 5'. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

5 SEQ ID NO: 22 Sustrato B 3' de Ligasa - 3LSubB: gGAACAACGAGAGGAAACCTT

9.5 Sustrato para MNAzima C (Sustrato Informador fluorescente C para la detección)

10 El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-2. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto Quasar 670 en el extremo 5', un resto BHQ2 en el extremo 3' y designado SubBi-2-Q6B2. La escisión de SubBi-2-Q6B2 se monitorizó a 665 nm con excitación a 635 nm. La secuencia de SubBi-2-Q6B2 se lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-Q6B2: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

9.6 Facilitadores del ensamblaje

El facilitador del ensamblaje A reconocido por los dominios sensores de la MNAzima A fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

15 SEQ ID NO: 68 AF-MzCA2: GCCATTGTGCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

El facilitador del ensamblaje B reconocido por los dominios sensores de la MNAzima B fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 43 AF-MzLB: AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

20 El facilitador del ensamblaje C reconocido por los dominios sensores de la MNAzima C fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 24 AF-MzCC: CGACGACCACTCCGACGACAGTCCTATAGTGAGTGCTACAG

9.7 Partzimas para MNAzimas con actividad de escisión.

Se sintetizaron partzimas para MNAzima A con la secuencia siguiente:

25	SEQ ID NO: 69	Partzima	A/MNAzima	1	-
	RO4A2/1(11);	GCTGGTCATCCAGCAGCGGTCGAAATAGTGAGTGC			
	SEQ ID NO: 70	Partzima	B/MNAzima	1	-
	CTCA TCTCTTCT	CCGAGCGTGTTGACAATGGC			RO4B3/1(12):

Se sintetizó una partzima para MNAzima C con la secuencia siguiente:

30	SEQ ID NO: 20	Partzima	B/MNAzima	C	-	STB5/2(21)
	TGCCAGGGAGGCTAGCTCTGTCTCGGAGTGGTCTCG					

9.8 Detección de actividad ligasa.

9.8.1 Condiciones de la Reacción

La reacción se realizó en tres etapas secuenciales (i), (ii) y (iii) en tres tubos separados como se describe a continuación.

35 (i) La escisión de Pre5LSubB2-FB por MNAzima A para generar el sustrato 5' de la ligasa (5LSubB) con el extremo requerido fosfato cíclico 2',3' se realizó a 40°C durante 1 hora. Las reacciones contenían 50 nM de partzima RO4A2/1(11), 50 nM de partzima RO4B3/1(12), 100 nM del facilitador del ensamblaje AF-MzCA2, 1.000 nM Pre5LSubB2-FB, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 40 mM MgCl₂.

40 (ii) Las ligaciones se realizaron a 40°C durante 2 horas en un volumen total de reacción de 25 ml. Las reacciones contenían 10 ml de la mezcla de reacción de escisión de la etapa (i), 1.000 nM 3LSubB, 500 nM AF-MzLB, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 40 mM MgCl₂ y bien:

- a) 500 nM de ADNzima ligasa control 7Z81-10/10, o
- b) 500 nM de cada una de División 1 partzimas A y B (RO5S1A y ROSS 1B), o
- c) 500 nM de cada una de División 2 partzimas A y B (RO5S2A y RO5S2B), o

- d) 500 nM de cada una de División 3 partzimas A y B (RO5S3A y RO5S3B), o
- e) 500 nM de cada una de División 4 partzimas A y B (RO5S4A y RO5S4B), o
- f) 500 nM de cada una de División 5 partzimas A y B (RO5S5A y RO5S5B), o
- g) 500 nM de cada una de División 6 partzimas A y B (RO5S6A y RO5S6B), o
- 5 h) sin ADNzima ni partzimas (control sin ligasa)

(iii) La detección fluorescente debida a la escisión por MNAzima C mediada por una partzima formada por ligación en la etapa (ii) se realizó isotérmicamente a 55°C durante 2 horas en el Cepheid Smartcycler con puntos de recogida de datos a intervalos de 72 segundos. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato marcado con fluorescencia SubBi-2-Q6B2. Las reacciones contenían 10 ml de mezcla de reacción de ligación previa (ii-a o ii-b o ii-c o ii-d o ii-e o ii-f o ii-g o ii-h, 500 nM de partzima B para MNAzima C (STB5/2(21)), 100 nM del facilitador del ensamblaje para MNAzima C (AF-MzCC), Tampón PCRII (Applied Biosystems), 50 mM MgCl₂ y 1.000 nM del sustrato SubBi-2-Q6B2 en un volumen total de reacción de 25 ml. El incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima C (SubBi-2-Q6B2) se monitorizó con el tiempo para cada reacción.

9.8.2 Resultados

15 a) Reacciones control.

La reacción de control positivo de la ADNzima ligasa (etapas i, ii-a y iii) mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. La señal producida por la formación dependiente de ligasa de MNAzima C se midió en unidades fluorescentes arbitrarias. El cambio global en la fluorescencia (fluorescencia final menos fluorescencia inicial) y el tiempo en el que la reacción se completó (plató en la señal de fluorescencia) se muestra en la Tabla 8. Este cambio en la fluorescencia observado en la reacción control de ADNzima confirmó que las etapas en la reacción en cascada se habían conseguido con éxito. En esta reacción, la MNAzima A se formó y escindió Pre5LSubB2-FB para generar un producto (5LSubB) que tiene un fosfato cíclico 2', 3' que le hace adecuado para uso como un sustrato por la ADNzima ligasa. La secuencia del producto de escisión 5LSubB es CTGTAGCACTCACTAua (SEQ ID NO: 40) en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN. Esta reacción control demostró que la ADNzima ligasa uni-molecular 7Z81-10/10 ligaba 5LSubB y 3LSubB y formaba un nuevo oligonucleótido (producto de ligación) con la secuencia de CTGTAGCACTCACTAuaGGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO: 51) (en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN). Este producto de ligación a su vez funcionaba como un componente de partzima de la MNAzima C, que escindió el sustrato C (SubBi-2-Q6B2) resultando en un incremento en la fluorescencia. Este incremento en la fluorescencia actuó como un marcador sustituto de actividad ligasa.

La reacción control sin ligasa (etapas i, ii-h y iii) mostró un incremento insignificante en la fluorescencia con el tiempo (Tabla 8). Esto demuestra que si no está presente ninguna ligasa, 5LSubB no puede ligarse a 3LSubB. Como resultado, no se genera partzima para MNAzima C y no se observa incremento en la fluorescencia.

35 b) Reacciones diseñadas para ensayar la presencia de actividad ligasa cuando se usan parejas de partzima candidatas que pueden tener o no la capacidad de formar MNAzima ligasas funcionales.

Las reacciones que incorporaron las etapas i y iii junto con la etapa ii-b (División 1), ii-c (División 2), ii-d (División 3), ii-e (División 4), ii-f (División 5) y ii-g (División 6) mostraron un incremento en la fluorescencia con el tiempo. La capacidad de cada pareja de partzima candidata para ligar sustratos se midió por un cambio en unidades fluorescentes arbitrarias. El cambio global en la fluorescencia (fluorescencia final menos fluorescencia inicial) y el tiempo en el que la reacción se completó (plató en la señal de fluorescencia) se muestra en la Tabla 8. La división del núcleo catalítico de la ADNzima ligasa 7Z81 en estas posiciones (Tabla 9) y reensamblando los núcleos parciales en las partzimas en presencia de un facilitador del ensamblaje produjo MNAzima ligasas activas en estas condiciones de reacción.

Tabla 8. Cambio en la fluorescencia con el tiempo para varias partzimas.

	Cambio en la fluorescencia (unidades fluorescentes)	Tiempo para completar la reacción
ADNzima 7Z81 control	1.545	25 minutos
Partzimas con División 1	479	> 2 horas
Partzimas con División 2	1.294	> 2 horas
Partzimas con División 3	1.337	> 2 horas

	Cambio en la fluorescencia (unidades fluorescentes)	Tiempo para completar la reacción
Partzimas con División 4	1.284	84 minutos
Partzimas con División 5	1.755	35 minutos
Partzimas con División 6	1.123	83 minutos
Control - sin ligasa (sin ADNzima o partzimas candidatas)	34	N/A

El ejemplo ha generado varias secuencias de partzima que pueden usarse para ensamblar MNAzimas, que tienen varios niveles de actividad dependiendo de las secuencias específicas y combinaciones de éstas. El diseño general para las secuencias de partzimas candidatas que se ensayaron se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Diseño general para secuencias de partzimas ensayado.

Secuencias de las parejas de secuencia de partzima (basado en la ADNzima ligasa 7Z81) que se ensayaron para actividad MNAzima ligasa potencial en las que N es cualquier nucleótido, (N)x es cualquier número de nucleótidos que se unen a una secuencia sustrato (dominio de sustrato) y (N)y es cualquier número de nucleótidos que se unen a un facilitador del ensamblaje (dominio sensor). Los SEQ ID NO sólo se refieren a las secuencia núcleo.		
División#	Partzima A	Partzima B
División 1	(N)y GGAGGTTAGCTC (N)x (SEQ ID NO: 71)	(N)x ACGGCGGAGTGATTG (N)y (SEQ ID NO: 72)
División 2	(N)y TGGGAGGTTAGCTC (N)x (SEQ ID NO: 73)	(N)x ACGGCGGAGTGAT (N)y (SEQ ID NO: 74)
División 3	(N)y ATTGGGAGGTTAGCTC (N)x (SEQ ID NO : 75)	(N)x ACGGCGGAGTG (N)y (SEQ ID NO : 76)
División 4	(N)y TGATTGGGAGGTTAGCTC (N) x (SEQ ID NO : 77)	(N)x ACGGCGGAG (N)y (SEQ ID NO : 78)
División 5	(N)y AGTGATTGGGAGGTTAGCTC (N)x (SEQ ID NO : 79)	(N)x ACGGCGG (N)y (SEQ ID NO : 80)
División 6	(N)yGGAGTGATTGGGAGGTTAGCT C (N)x (SEQ ID NO : 81)	(N)x ACGGC (N)y (SEQ ID NO: 82)
Secuencia de la ADNzima ligasa 7Z81 en la que N es cualquier nucleótido y (N)x es cualquier número de nucleótidos que se unen a una secuencia sustrato. (N)x ACGGCGGAGTGATTGGGAGGTTAGCTC (N)x (SEQ ID NO: 83)		

- 5 Las MNAzimas activas, incluyendo los ejemplos como se ha demostrado anteriormente, y particularmente la MNAzima con la división equivalente a División 5, tendrían un amplio número de aplicaciones. Como ejemplo, las MNAzima ligasas podrían usarse para detectar analitos diana. Las MNAzima ligasas pueden diseñarse para ensamblarse sólo en presencia de un analito tal como una secuencia diana de ARN o ADN (el facilitador del ensamblaje). Como un ejemplo, si el sustrato de ligación 5' y el sustrato de ligación 3' estuvieran cada uno marcados con un marcador fluoróforo o apantallador respectivamente (o viceversa) entonces la ligación resultaría en una disminución de la fluorescencia, lo que podría servir como un indicador de la presencia del analito diana. En un formato alternativo, si el sustrato de ligación 5' estuviera marcado con un resto detectable, por ejemplo un fluoróforo, y el sustrato de ligación 3' estuviera unido en una localización discreta, por ejemplo en un chip o lecho, entonces la ligación resultaría en la aparición de una señal en la localización discreta en presencia del analito diana.
- 10
- 15 La estrategia usada para ensayar la actividad ligasa en este ejemplo, como se ilustra en la Figura 12, constituye una cascada lineal que podría usarse para crear una cascada de amplificación de la señal con retroalimentación. Si la secuencia del producto C 5' fuera la misma que la del producto A 5' este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima C podría estar generando de manera constante un sustrato B 5' que podría a su vez ligarse por la MNAzima ligasa B

para crear más partzimas para la formación de más MNAzima C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un analito diana), que podría dirigir el ensamblaje de MNAzima A. La estrategia podría permitir la detección de facilitadores del ensamblaje (por ejemplo, analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando dos tipos de MNAzimas, concretamente MNAzimas que podrían ligar sustratos (MNAzima ligasas) y MNAzimas que podrían escindir un sustrato (MNAzimas escisoras).

Un experto en la técnica apreciará que existen muchas variantes en esta estrategia básica. Como ejemplo, la MNAzima B podría usarse para crear productos de ligación que sirven como facilitadores del ensamblaje para otra MNAzima con actividad de escisión, ligasa u otra actividad enzimática. En otro ejemplo, la MNAzima C podría modificar un sustrato por medios distintos de la escisión. Las realizaciones adicionales están incluidas a lo largo de la especificación.

Ejemplo 10. Método general para preparar por ingeniería MNAzimas a partir de ADNzimas.

Las técnicas de desarrollo *in vitro* han facilitado el descubrimiento y desarrollo de muchas ADNzimas (revisado Emillson y Breaker, 2002). Se han descubierto ADNzimas desarrolladas *in vitro* que tienen la capacidad de catalizar un amplio rango de reacciones incluyendo la escisión de ácidos nucleicos, ligación de ácidos nucleicos, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, fosforilación de ADN, enlaces éster, enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de tiamina y escisión de fósforoamidato (revisado Silverman, 2007).

Muchas ADNzimas tienen estructuras básicas similares con múltiples dominios. Estas ADNzimas comprenden un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios de unión a sustrato no conservados ("brazos"), que reconocen e hibridan específicamente con el sustrato (por ejemplo, para ADNzima escisoras o aquellas que actúan en un sustrato) o al menos dos sustratos (por ejemplo, para ADNzima ligasas o aquellas que actúan en al menos dos sustratos). Los dominios de unión al sustrato pueden personalizarse para cualquier sustrato siempre que el sustrato o sustratos contenga un sitio o sitios que pueda modificarse por la ADNzima. Este ejemplo describe una estrategia general para preparar por ingeniería nuevas MNAzimas basadas en cualquier ADNzima conocida. Esta estrategia general se ilustra esquemáticamente en la Figura 14.

El método se describe en primer lugar para obtener MNAzima a partir de ADNzimas con actividad modificadora, por ejemplo, actividad de escisión. En la primera etapa, se identifican posiciones en el núcleo catalítico de la ADNzima en los que se pueden dividir, con el fin de que cada parte parcial del núcleo catalítico pueda distribuirse entre dos secuencias parciales de manera que los dos núcleos parciales conjuntamente constituyen un núcleo catalítico completo. Puede sintetizarse un oligonucleótido A para contener (i) una parte de brazo de unión a sustrato capaz de unirse a un sustrato, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial, y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitador del ensamblaje. Un segundo oligonucleótido B se sintetiza de manera que contiene (i) una parte de brazo de unión al sustrato capaz de unirse al mismo sustrato que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al sustrato en una posición adyacente a la del oligonucleótido A, (ii) una parte de núcleo catalítico parcial que contiene aquellas bases del núcleo catalítico entero de la ADNzima que no están incorporadas en el oligonucleótido A y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse al mismo facilitador del ensamblaje que el oligonucleótido A mediante lo cual el oligonucleótido B se une al facilitador del ensamblaje en una posición adyacente a la del oligonucleótido A. Este proceso puede repetirse preparando así una serie de parejas de oligonucleótidos A y B que incorporan la estructura y los dominios de partzimas, pero pueden o no tener actividad catalítica en presencia de un sustrato y un facilitador del ensamblaje.

Algunas o todas de las parejas de partzima candidatas (parejas de oligonucleótidos A y B de la serie) pueden incubarse en presencia del facilitador del ensamblaje complementario a las partes de brazo sensor de las partzimas y un sustrato que es complementario a las partes de brazo de sustrato de las partzimas. La incubación se realiza en condiciones que son compatibles con la modificación de un sustrato por la ADNzima a partir de la cual se obtuvieron las secuencias de núcleo catalítico parcial. Las parejas de oligonucleótidos A y B, que pueden realizar el mismo tipo de modificación en el sustrato que la ADNzima de la que se obtuvieron las secuencias parciales, son útiles como partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas. Las secuencias de los núcleos catalíticos parciales son adecuadas para la incorporación en otras partzimas. Pueden sintetizarse nuevas partzimas que están personalizadas para nuevos sustratos (cambiando los dominios de unión a sustrato de cada partzima) y/o nuevos facilitadores del ensamblaje (cambiando los dominios de unión sensores de cada partzima).

El método para preparar por ingeniería una MNAzima que actúa en dos sustratos (por ejemplo una MNAzima ligasa) a partir de una enzima de ácidos nucleicos uni-molecular (por ejemplo, una ADNzima ligasa) requiere las etapas similares mediante las cuales en la primera etapa, se identifican las posiciones en el núcleo catalítico de la ADNzima en las cuales puede dividirse, de manera que cada parte parcial del núcleo catalítico puede distribuirse entre dos secuencias parciales de manera que los dos núcleos parciales conjuntamente constituyen un núcleo catalítico entero. Entonces pueden sintetizarse dos oligonucleótidos A y B (partzimas candidatas). Puede sintetizarse un oligonucleótido A para contener (i) una parte de brazo de unión a sustrato capaz de unirse a un primer sustrato (por ejemplo, sustrato ligable), (ii) una parte de núcleo catalítico parcial, y (iii) una parte de brazo sensor capaz de unirse a una molécula facilitadora del ensamblaje. Puede sintetizarse un segundo oligonucleótido B de manera que

contiene (i) un brazo de unión al sustrato capaz de unirse a un segundo sustrato (por ejemplo, sustrato ligable), (ii) una parte de núcleo catalítico parcial que contiene aquellas bases del núcleo catalítico entero de la ADNzima que no están incorporadas en el oligonucleótido A y (iii) una secuencia de brazo sensor capaz de unirse al mismo facilitador del ensamblaje que el oligonucleótido A, mediante lo cual el oligonucleótido B se une al facilitador del ensamblaje en una posición adyacente a la del oligonucleótido A. Este proceso puede repetirse preparando así una serie de parejas de oligonucleótidos A y B que incorporan la estructura y los dominios de partzimas, pero pueden o no tener actividad catalítica en presencia de los sustratos y un facilitador del ensamblaje.

Algunas o todas de las parejas de partzima candidatas (parejas de oligonucleótidos A y B de la serie) pueden incubarse en presencia del facilitador del ensamblaje complementario a las partes de brazo sensor de las partzimas y los sustratos (por ejemplo, sustratos ligables) que son complementarios a las partes de brazo de sustrato de las partzimas. La incubación se realiza en condiciones que son compatibles con la modificación de los sustratos (por ejemplo, por ligación) por la ADNzima a partir de la cual se obtuvieron las secuencias de núcleo catalítico parcial. Las parejas de oligonucleótidos A y B, que pueden realizar la misma modificación (por ejemplo, ligación) en los sustratos que la ADNzima de la que se obtuvieron las secuencias parciales, son útiles como partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas. Las secuencias de los núcleos catalíticos parciales son adecuadas para la incorporación en otras partzimas. Pueden sintetizarse nuevas partzimas que están personalizadas para nuevos sustratos (cambiando los dominios de unión a sustrato de cada partzima) y/o nuevos facilitadores del ensamblaje (cambiando los dominios de unión sensores de cada partzima).

Los ejemplos específicos del uso de esta estrategia para identificar núcleos catalíticos parciales adecuados para la incorporación en partzimas capaces de formar MNAzima activa se demuestran para dos ADNzimas con actividad ligasa (ejemplos 7 y 9 y una ADNzima con actividad de escisión (ejemplo 14).

Además, puede usarse un método similar para examinar la tolerancia a cambios en la secuencia parcial obtenida de la división del núcleo catalítico de la ADNzima que pueden incorporarse en partzimas componentes. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones en los núcleos catalíticos parciales incorporados en las partzimas que incluyen, como ejemplo, inserciones, deleciones, sustitución con bases de ADN alternativas, o sustitución con análogos de bases de ADN tales como ribonucleótidos, bases inosina u otros análogos. Las parejas de partzima candidatas que contienen una o más modificaciones pueden ensayarse como anteriormente para determinar si son o no adecuadas como partzimas que pueden ensamblarse en MNAzimas catalíticamente activas.

Ejemplo 11. Una reacción en cascada que explota la actividad de múltiples enzimas de ácidos nucleicos.

La estrategia general usada en este ejemplo se resume en la Figura 9 y también puede formar la base de una técnica de amplificación de la señal. En este ejemplo específico, la reacción se realizó en dos etapas. En la primera etapa (Figura 9 (i) y (ii)), una MNAzima A se formó en presencia de facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un ácido nucleico diana) y se usó para escindir un sustrato (sustrato de MNAzima A) generando así un producto de escisión 5' que tenía un extremo fosfato cíclico 2', 3'. Simultáneamente, se usó una ADNzima ligasa para ligar el producto de escisión 5' a otro sustrato de ligación B oligonucleotídico creando así un producto de ligación que funcionaba como un nuevo componente de MNAzima (por ejemplo, una partzima). En la segunda etapa (Figura 9 (iii)), el producto de ligación partzima generado en la primera etapa participa en la formación de una nueva MNAzima (MNAzima C), que puede escindir un sustrato (sustrato de MNAzima C). En este ejemplo, el marcaje del sustrato C de la MNAzima con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador permitió la monitorización de la fluorescencia de la reacción.

11.1 Partzimas para MNAzima A

En la primera etapa, la MNAzima A se formó en presencia de un facilitador del ensamblaje (AF-MzCA2) y se usó para escindir el sustrato de MNAzima A (Pre5LSubB2-FB). Las secuencias de las partzimas de MNAzima A (RO4A2/1(11) y RO4B3/1(12)) se listan a continuación. Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico, las bases en negrita hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en itálica hibridan con los sustratos.

SEQ	ID	NO:	69	Partzima	A/MNAzima	A	-
RO4A2/1(11); GCTGGTCATCCAGCAG <u>CGGTCGAAATAGTGAGTGC</u>							
SEQ	ID	NO:	70	Partzima	B/MNAzima	A	- RO4B3/1(12):
CTCA <i>TCTCTTCT</i> <u>CCGAGC</u> GTGTT <i>CGACAATGGC</i>							

11.2 ADNzima con Actividad ligasa

La ADNzima ligasa usada en este ejemplo se ha reportado previamente que liga ARN mediante la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' a partir de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo hidroxilo 5' (Prior *et al*, 2004). Aparte del requerimiento de un sustrato 5' con un extremo fosfato cíclico 2',3', la ADNzima ligasa usada en este ejemplo también requiere un resto de secuencia específico en la unión de la ligación.

En la primera etapa, se usó en este experimento la ADNzima ligasa 7Z81 (7Z81-10/10) con brazos de sustrato diseñados para hibridar con las secuencias de sustrato 5LSubB y 3LSubB y la secuencia se lista a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas forman el núcleo catalítico y las bases en itálica hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 17 ADNzima ligasa - 7Z81-
10/10: CCTCTCGTTGACGGCGGAGTGATTGGGAGTTAGCTCTAGTGAGTGC

11.3 Partzimas para MNAzima C

5 En la segunda etapa el producto ligado funcionó como una partzima, que junto con una partzima B (STB5/2(21)) y el facilitador del ensamblaje (AF-MzCC), formó MNAzima C y escindió un sustrato C marcado con fluorescencia (SubBi-2-Q6B2). La partzima A control (LS817A4/2), que era la misma secuencia que el producto ligado también formó MNAzima C con partzima B (STB5/2(21)). Las secuencias siguientes corresponden a las partzimas, que forman parte de MNAzima C. Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico, las bases en negrita hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en itálica hibridan con los sustratos.

10 SEQ ID NO: 20 Partzima B/MNAzima C - STB5/2(21)
TGCCCAGGGAGGCTAGCTCTGTCGTCGGAGTGGTCTCG

SEQ ID NO: 84 Partzima A/MNAzima C -
LS817A4/2 CTGTAGCACTCACTATAGGAACAACGAGAGGAAACCTT

11.4 Sustrato de MNAzima A (sustrato para la MNAzima escisora A)

15 El sustrato de MNAzima A se escindió por la MNAzima escisora A. El fragmento 5' resultante indicado 5LSubB se ligó a 3LSubB por la ADNzima ligasa. La secuencia del sustrato A (Pre5LSubB2-FB) está a continuación. Está marcado internamente 5' de las ribobases con un resto 6-FAM y marcado 3' de las ribobases con el resto BHQ1 (bases subrayadas). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 67 Sustrato A - Pre5LSubB2-FB: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATGAG

20 11.5 Sustrato de ADNzima Ligasa B

La secuencia del sustrato 3' para la ligación usado en este experimento se lista a continuación (5' a 3'). El oligonucleótido tiene un grupo hidroxilo 5'. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 22 Sustrato 3' B de Ligasa - 3LSubB: gGAACAACGAGAGGAAACCTT

25 11.6 Sustrato para MNAzima C (Sustrato informador fluorescente C para la detección)

El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-2. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto Quasar 670 en el extremo 5', un resto BHQ2 en el extremo 3' y designado SubBi-2-Q6B2. La escisión de SubBi-2-Q6B2 se monitorizó a 665 nm con excitación a 635 nm. La secuencia de SubBi-2-Q6B2 se lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

30 SEQ ID NO: 4 SubBi-2-Q6B2: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

11.7 Facilitadores del ensamblaje

El facilitador del ensamblaje A reconocido por los dominios sensores de la MNAzima A fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 68 AF-MzCA2: GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

35 El facilitador del ensamblaje C reconocido por los dominios sensores de la MNAzima C fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 24 AF-MzCC: CGACGACCACTCCGACGACAGTCCTATAGTGAGTGCTACAG

11.8 Condiciones de la Reacción

La reacción se realizó en dos etapas secuenciales, 1 y 2, en dos tubos separados como se describe a continuación.

40 (1) La escisión de Pre5LSubB2-FB por MNAzima A para generar el producto de escisión 5'/sustrato de ligasa (5LSubB) con el extremo fosfato cíclico 2', 3' requerido, y la ligación de este fragmento con 3LSubB por la ADNzima ligasa, se realizó a 45°C durante 2 horas en un volumen total de reacción de 50 ml. La reacciones contenían, 70 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 50 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 2mM KCl, 40 nM RO4B3/1(12), 40 nM RO4A2/1(11), 200 nM Pre5LSubB2-FB y bien:

45 a) 40 nM AF-MzCA2, 200 nM ADN Ligasa 7Z81-10/10 y 100 nM 3LSubB; o

b) 40 nM AF-MzCA2 y 100 nM 3LSubB; o

- c) 40 nM AF-MzCA2 y 200 nM ADN Ligasa 7Z81-10/10; o
- d) 200 nM ADN Ligasa 7Z81-10/10 y 100 nM 3LSubB; o
- e) 100 nM 3LSubB solo; o
- f) 200 nM ADN Ligasa 7Z81-10/10 solo

5 (2) La detección fluorescente que resulta de la escisión por MNAzima C se realizó isotérmicamente a 55°C durante 1 hora en el Cepheid Smartcycler. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato marcado con fluorescencia SubBi-2-Q6B2. Las reacciones contenían 10 ml de una de las mezclas de reacción de ligación previas (1-a o 1-b o 1-c o 1-d o 1-e o 1-f) y 200 nM de partzima B (STB5/2(21)) y 200 nM facilitador del ensamblaje (AF-MzCC) para MNAzima C, y 200 nM del sustrato SubBi-2-Q6B2 en un volumen total de reacción de 25 ml. También se incluyó una reacción de control positivo (1-g) en la que 200 nM de la partzima A control para MNAzima C (LS817A4/2) también se añadió a 10 ml de reacción (1-f).

11.9 Resultados

El incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima C (SubBi-2-Q6B2) se monitorizó con el tiempo para reacciones que habían contenido los reactivos oligonucleotídicos siguientes (Tabla 10).

15 Tabla 10. Incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima C (SubBi-2-Q6B2) monitorizado con el tiempo.

	Etapa 1	Etapa 2	Resultado
Reacción 1 (ensayo 1-a)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * Facilitador del ensamblaje A (diana) * ADNzima ligasa Sustrato ligasa B	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C	Se observó un incremento en la fluorescencia con el tiempo y la reacción llegó a término en 15 minutos.
Reacción 2 (1-b control - sin ADNzima ligasa)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * Facilitador del ensamblaje A (diana) * Sustrato ligasa B	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 3 (1-c control - sin sustrato 3' ligasa B)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * Facilitador del ensamblaje A (diana) ADNzima ligasa	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 4 (1-d control - sin facilitador del ensamblaje A)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * ADNzima ligasa * Sustrato ligasa B	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C	Se observó incremento mínimo en la fluorescencia con el tiempo

	Etapa 1	Etapa 2	Resultado
Reacción 5 (1-e control - sin ADNzima ligasa y sin facilitador del ensamblaje A)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * Sustrato ligasa B	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 6 (1-f control - sin sustrato ligasa B y sin facilitador del ensamblaje A)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A ADNzima ligasa	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del Ensamblaje C * Sustrato C	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 7 (1-g control positivo con MNAzima C partzima A LS817A4/2)	* MNAzima A partzimas * Sustrato A * ADNzima ligasa	* 10 ml de la etapa 1 * MNAzima C partzima B * Facilitador del ensamblaje C * Sustrato C * MNAzima C partzima A LS817A4/2	Se observó un incremento en la fluorescencia con el tiempo y la reacción llegó a término en menos de 1 minuto

El nivel de fluorescencia se midió con el tiempo para la etapa (2) de las reacciones 1 a 7 (Tabla 10). La Reacción 1 (1-a), que había contenido todos los componentes de reacción oligonucleotídicos para las etapas (1) y (2), mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. El cambio en la fluorescencia observado fue mayor que las 484 unidades arbitrarias en esta reacción resultando en un incremento de aproximadamente 46 en el tiempo 0 a por encima de 530 después de 1 hora de monitorización de la fluorescencia.

Por el contrario, la Reacción 2 (1-b), que carecía de oligonucleótido ADNzima ligasa (7Z81-10/10) para la etapa (1) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 3 (1-c), que carecía de sustrato de ligasa B (3LSubB) pero contenía la ADNzima ligasa de la etapa (1) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 4 (1-d) que carecía de facilitador del ensamblaje A (AF-MzCA2) de la etapa (1) mostró un mínimo incremento en la fluorescencia con el tiempo por encima de la desviación de fondo observada de aproximadamente 40 unidades arbitrarias durante el curso de 1 hora de monitorización de la fluorescencia. La Reacción 5 (1-e) que carecía tanto del facilitador del ensamblaje A como de la ADNzima ligasa de la etapa (1) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 6 (1-f) que carecía tanto del sustrato de ligasa B como del facilitador del ensamblaje A no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 7 (1-g) era el control positivo que contenía la MNAzima C partzima A control (LS817A4/2), y mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo mediante la cual la reacción se completó en menos de 1 minuto. Conjuntamente, estas reacciones indican que los eventos siguientes han ocurrido en la Reacción 1 (1-a).

En primer lugar, la MNAzima A escinde el Sustrato A (Pre5LSubB2-FB) en presencia del facilitador del ensamblaje diana específico A (AF-MzCA2) produciendo dos fragmentos, uno de los cuales fue el fragmento 5' 5LSubB (CTGTAGCACTCACTAua) (SEQ ID NO: 40) que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En segundo lugar, 5LSubB se ligó a un segundo sustrato oligonucleotídico B de ADNzima ligasa (3LSubB) presente en la mezcla de reacción de la etapa (1) y esto resultó en la formación de un nuevo oligonucleótido (producto de ligación) con la secuencia de CTGTAGCACTCACTAuagGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO: 51) (en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN). Este producto de ligación a su vez funcionó como una partzima para MNAzima C. Esta partzima A ligada de nuevas se asocia con MNAzima C partzima B y facilitador del ensamblaje C para crear MNAzima C. La MNAzima C escindió el sustrato de la MNAzima C (SubBi-2-Q6B2) resultando en la separación de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador causando así un incremento en la fluorescencia.

Los controles "sin ligación" (Reacción 2 (1-b) y 3 (1-c)) demostraron que la ligación del fragmento de escisión 5' (5LSubB) con extremo fosfato cíclico 2', 3' a un segundo sustrato de ligasa B (3LSubB) es esencial para la formación del componente partzima de MNAzima C.

5 Los controles "sin facilitador del ensamblaje A (AF-MzCA2)" (Reacciones 4 (1-d), 5 (1-e) y 6 (1-f)) de mostraron que la escisión del sustrato de MNAzima A (Pre5LSubB2-FB) por la MNAzima A y la generación de un fragmento 5' con los extremos fosfato cíclico 2', 3' era esencial para la ligación posterior y formación de la partzima requerida para el ensamblaje y actividad de MNAzima C.

10 La reacción en cascada en este ejemplo permitió la detección de la presencia de un facilitador del ensamblaje, en este ejemplo una secuencia de ácido nucleico diana. La reacción en cascada que permite la detección usa dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente ADNzimas que pueden ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir sustratos. El recambio múltiple en cada etapa enzimática en la cascada podría permitir la amplificación de la señal.

15 La cascada demostrada en este ejemplo e ilustrada en la Figura 9 podría extenderse y usarse para crear una cascada de amplificación con retroalimentación. Si la secuencia del producto de escisión C 5' fuera la misma que el producto de escisión A 5', este producto también podría servir como un sustrato B 5' y podría iniciarse una reacción en cascada con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora C podría generar de manera constante el sustrato B 5' que a su vez podría ligarse por la ADNzima ligasa B para crear más partzimas para la formación de más MNAzima escisora C. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para amplificación con retroalimentación después del inicio de una reacción por un analito diana que podría dirigir el ensamblaje de MNAzima escisora A. La estrategia podría permitir la detección de analitos diana seguido de la amplificación de la señal por una cascada con retroalimentación usando dos tipos de enzimas de ácidos nucleicos, concretamente ADNzima ligasas y MNAzima escisoras.

25 Además, será obvio para un experto en la técnica que la ADNzima ligasa podría ligar dos fragmentos y crear varias enzimas posibles, componentes de enzima o sustratos útiles en esta cascada que incluyen pero no están limitados a, a) una partzima para una segunda MNAzima (por ejemplo, una MNAzima escisora como se muestra en este ejemplo y marcada como MNAzima C en la Figura 9); o b) un nuevo facilitador del ensamblaje para una segunda MNAzima como se describe en el ejemplo 12, y marcada como MNAzima escisora 2 en la Figura 15; o c) una nueva ADNzima capaz de modificar un sustrato o sustratos (por ejemplo, por escisión, ligación etc) o un sustrato adecuado para modificación por una MNAzima o ADNzima. Además, será obvio para un experto en la técnica que la ADNzima con actividad ligasa podría ser sustituida por una MNAzima con actividad ligasa como se demuestra en el ejemplo 7 y 9. La estrategia es versátil y podría realizarse bien como una cascada secuencial de la primera y segunda etapas o como una reacción en cascada con retroalimentación en la que la etapa 2 (Figura 9 (iii)) crea un componente para la etapa 1 (Figura 9 (i) y (ii)). Además, la etapa 2 (Figura 9 (iii)) podría crear un componente para una reacción posterior adicional.

35 Ejemplo 12: Un ejemplo de una reacción en cascada que explota la actividad de múltiples enzimas de ácidos nucleicos

40 La estrategia general usada en este ejemplo se resume en la Figura 15 y también puede formar la base de una técnica de amplificación de la señal. En la primera etapa, una MNAzima (MNAzima escisora 1) se forma en presencia de facilitador del ensamblaje (por ejemplo, un ácido nucleico diana) y se usa para escindir un sustrato (sustrato de MNAzima 1) generando así un producto de escisión 5' que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En la segunda etapa, se usa una ADNzima ligasa para ligar el producto de escisión generado en la etapa uno a otro sustrato de ligación oligonucleotídico creando así un producto de ligación que funciona como un facilitador del ensamblaje. En la tercera etapa, el producto de ligación facilitador del ensamblaje generado en la etapa dos participa en la formación de una nueva MNAzima (MNAzima escisora 2), que puede escindir un sustrato (sustrato de MNAzima 2). En este ejemplo, el marcaje del sustrato de MNAzima 2 con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador permitió la monitorización de la fluorescencia de la reacción.

12.1 Partzimas para MNAzima escisora 1

50 En la primera etapa, la MNAzima escisora 1 se formó en presencia de un facilitador del ensamblaje (AF-MzCA2) y se usó para escindir el sustrato de MNAzima 1 (Pre5LSubB2-FB). Las secuencias de las partzimas de MNAzima escisora 1 (RO4A2/1(11) y RO4B3/1(12)) se listan a continuación. Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico, las bases en negrita hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en *italica* hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 69 Partzima A/MNAzima 1 -
RO4A2/1(11); **GCTGGT**CATCCAGCAGCGGTCGAAATAGTGAGTGC

55 SEQ ID NO: 70 Partzima B/MNAzima 1 - RO4B3/1(12): *CTCATCTCTTCT*CCGAGCGTGTTCGACAATGGC

12.2 ADNzima con Actividad ligasa

La ADNzima ligasa usada en este ejemplo se ha reportado previamente que liga ARN mediante la formación de una unión fosfodiéster 2'-5' a partir de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo hidroxilo 5' (Prior *et al*, 2004). Aparte del requerimiento de un sustrato 5' con un extremo fosfato cíclico 2',3', la ADNzima ligasa usada en este ejemplo también requiere un resto de secuencia específico en la unión de la ligación.

- 5 En la segunda etapa, se usó en este experimento la ADNzima ligasa 7Z81 (7Z81-10/10) con brazos de sustrato diseñados para hibridar con las secuencias de sustrato 5LSubB y 3LSubB y la secuencia se lista a continuación (5' a 3'). Las bases subrayadas forman el núcleo catalítico y las bases en itálica hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 17 ADNzima ligasa - 7Z81-10/10: CCTCTCGTTGACGGCGGAGTGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGTC

10 12.3 Partzimas para MNAzima escisora 2

En la tercera etapa, el producto ligado funciona como un nuevo facilitador del ensamblaje, que junto con una pareja de partzimas puede formar MNAzima escisora 3 y escindir un sustrato 3 marcado con fluorescencia (SubBi-3-TxB2). Las secuencias siguientes corresponden a las partzimas, que forman componentes de MNAzima escisora 2. Las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico, las bases en negrita hibridan con el facilitador del ensamblaje y las bases en itálica hibridan con los sustratos.

SEQ ID NO: 85 Partzima A/MNAzima 2 - LIGFACA5/3: **AAGGTTTCCTCTCGTTGTTCTACAACGAGGTTGTGCTG**

SEQ ID NO: 86 Partzima B/MNAzima 2 - LIGFACB6/3: **CGGTTGGTGAGGCTAGCTATAGTGAGTGCTACAG**

20 12.4 Sustrato de MNAzima 1 (sustrato para la MNAzima escisora 1)

El sustrato de MNAzima 1 se escindió por la MNAzima escisora 1. El fragmento 5' resultante indicado 5LSubB se ligó a 3LSubB por la ADNzima ligasa. La secuencia del sustrato 1 (Pre5LSubB2-FB) está a continuación. Está marcado internamente 5' de las ribobases con un resto 6-FAM y marcado 3' de las ribobases con el resto BHQ1 (bases subrayadas). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

25 SEQ ID NO: 67 Sustrato 1 - Pre5LSubB2-FB: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATGAG

12.5 Sustrato de ADNzima Ligasa

La secuencia del sustrato 3' para la ligación usado en este experimento se lista a continuación (5' a 3'). El oligonucleótido tiene un grupo hidroxilo 5'. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

30 SEQ ID NO: 22 Sustrato 3' de Ligasa - 3LSubB: gGAACAACGAGAGGAAACCTT

12.6 Sustrato de MNAzima 2 (Sustrato Informador Fluorescente para la MNAzima escisora 2)

35 El sustrato informador usado en este ejemplo fue SubBi-3. En el presente ejemplo, SubBi-3 se marcó en los extremos con un resto Texas Red en el extremo 5', un resto BHQ2 en el extremo 3' y designado SubBi-3-TxB2. La escisión de SubBi-3-TxB2 se monitorizó a 610 nm (longitud de onda de emisión de TxB2) con excitación a 585 nm (longitud de onda de excitación de TxB2). La secuencia de SubBi-3-TxB2 se lista a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 87 SubBi-3-TxB2: CAGCACAACCGuCACCAACCG

12.7 Secuencia del facilitador del ensamblaje para MNAzima escisora 1

40 El facilitador del ensamblaje reconocido por los dominios sensores de la MNAzima escisora 1 fue un oligonucleótido de ADN sintético con la secuencia siguiente:

SEQ ID NO: 68 AF-MzCA2: GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

12.8 Condiciones de la Reacción

La reacción se realizó en tres etapas secuenciales (i), (ii) y (iii) en tres tubos separados como se describe a continuación.

- 45 (i) La escisión de Pre5LSubB2-FB por MNAzima escisora 1 para generar el producto de escisión 5'/sustrato de ligasa (5LSubB) con el extremo fosfato cíclico 2', 3' requerido se realizó a 40°C durante 66 minutos en un volumen total de reacción de 100 ml. Las reacciones contenían 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C), 50 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 nM RO4B3/1(12), 50 nM RO4A2/1(11) y bien:

- a) 1.000 nM Pre5LSubB2-FB, 50 nM AF-MzCA2; o
- b) 1.000 nM Pre5LSubB2-FB; o
- c) 50 nM AF-MzCA2.

5 (ii) La ligación se realizó a 40°C durante 2 horas en un volumen total de reacción de 50 ml. Las reacciones contenían 25 ml de mezcla de reacción de escisión previa (i-a) o (i-b), o (i-c), 500 nM 3LSubB, en una reacción con una concentración final de 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y 50 mM MgCl₂ y:

- a) 500 nM de ADNzima ligasa 7Z81-10/10, o
- b) sin ADNzima ligasa (control sin ligación)

10 (iii). La detección fluorescente debida a la escisión de MNAzima que resulta del ensamblaje de partzimas para MNAzima escisora 2 en presencia del facilitador del ensamblaje formado por ligación del producto de escisión de Pre5LSubB2-FB (5LSubB) y el sustrato de ligación (3LSubB) se realizó isotérmicamente a 50°C durante 2 horas en el Cepheid Smartcycler. Las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato marcado con fluorescencia SubBi-3-TxB2. Las reacciones en duplicado contenían 10ml de una de las mezclas de reacción de ligación previas
 15 ((i-a/ii-a) o (i-a/ii-b) o (i-b/ii-a) o (i-b/ii-b) o (i-c/ii-a) o (i-c/ii-b)) y 200 nM de partzima A (LIGFACA5/3) y 200 nM partzima B (LIGFACB6/3) para MNAzima escisora 2, y 400 nM del sustrato SubBi-3-TxB2 en un volumen total de reacción de 25 ml.

12.9 Resultados

El incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima 2 (SubBi-3-TxB2) se monitorizó con el tiempo para reacciones que habían contenido los reactivos oligonucleotídicos siguientes (Tabla 11).

20 Tabla 11. Incremento en la fluorescencia debido a la escisión del sustrato de MNAzima 2 (SubBi-3-TxB2) monitorizado con el tiempo.

	Etapa (i)	Etapa (ii)	Etapa (iii)	Resultado
Reacción 1 (Ensayo i-a/ii-a)	*MNAzima partzimas 1 * Facilitador del ensamblaje 1 (diana)	* 25 ml de la etapa (i) * ADNzima ligasa	* 10ml de la etapa (ii) *Sustrato 2	Un incremento en fluorescencia
Reacción 2 (Control i-a/ii-b - sin ADNzima ligasa)	*MNAzima partzimas 1 *Sustrato 1 * Facilitador del ensamblaje 1 (diana)	* 25 ml de la etapa (i) * Sustrato de ligasa	* 10ml de la etapa (ii) *MNAzima partzimas 2 *Sustrato 2	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 3 (Control i-b/ii-a - sin Facilitador del ensamblaje I (diana))	*MNAzima partzimas 1 *Sustrato 1	* 25 ml de la etapa (i) * Sustrato de ligasa * ADNzima ligasa	* 10ml de la etapa (ii) *MNAzima partzimas 2 *Sustrato 2	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 4 (Control i-b/ii-b-sin facilitador del ensamblaje 1 (diana) y sin ADNzima ligasa)	*MNAzima partzimas 1 *Sustrato 1	* 25 ml de la etapa (i) * Sustrato de ligasa	* 10ml de la etapa (ii) *MNAzima partzimas 2 *Sustrato 2	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo

	Etapa (i)	Etapa (ii)	Etapa (iii)	Resultado
Reacción 5 (Control i-c/ii-a - sin Sustrato 1)	*MNAzima 1 partzimas * Facilitador del ensamblaje 1 (diana)	* 25 ml de la etapa (i) * Sustrato de ligasa * ADNzima ligasa	* 10pl de la etapa (ii) *MNAzima 2 partzimas *Sustrato 2	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo
Reacción 6 (Control i-c/ii-b-sin Sustrato I y sin ADNzima ligasa)	*MNAzima 1 partzimas * Facilitador del ensamblaje I (diana)	* 25ml de la etapa (i) * Sustrato de ligasa	* 10ml de la etapa (ii) *MNAzima 2 partzimas *Sustrato 2	No se observó incremento en la fluorescencia con el tiempo

El nivel de fluorescencia se midió con el tiempo para la etapa (iii) de las reacciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (realizadas en duplicado) (Tabla 10). La Reacción 1 (i-a/ii-a), que había contenido todos los componentes de reacción oligonucleotídicos para las etapas (i), (ii) y (iii), mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. El cambio en la fluorescencia observado fue mayor que las 900 unidades arbitrarias en esta reacción resultando en un incremento de aproximadamente 180 en el tiempo 0 a por encima de 1.100 después de 2 horas.

Por el contrario, las reacciones 2, 3, 4, 5 y 6 no mostraron incremento en la fluorescencia con el tiempo por encima de la desviación de fondo observada de aproximadamente 50 unidades arbitrarias durante el curso de las 2 horas de monitorización de la fluorescencia. Como tal, la Reacción 2(i-a/ii-b), que carecía del oligonucleótido de ADNzima ligasa para la etapa (ii), no mostró un incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 3 (i-b/ii-a), que carecía del facilitador del ensamblaje 1 (AF-MzCA2) pero contenía la ADNzima ligasa de la etapa (ii) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 4 (i-b/ii-b), que carecía tanto del facilitador del ensamblaje 1 (AF-MzCA2) como de la ADNzima ligasa de la etapa (ii) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 5 (i-c/ii-a), que carecía del Sustrato 1 (Pre5LSubB2-FB) pero contenía la ADNzima ligasa de la etapa (ii) no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. La Reacción 6 (i-c/ii-b), que carecía tanto del Sustrato 1 (Pre5LSubB2-FB) como de la ADNzima ligasa no mostró incremento en la fluorescencia con el tiempo. Conjuntamente estas reacciones indican que los eventos siguientes han ocurrido en la reacción 1.

En primer lugar, la MNAzima escisora 1 escinde el Sustrato 1 (Pre5LSubB2-FB) en presencia del facilitador del ensamblaje específico 1 (AF-MzCA2) produciendo dos fragmentos, uno de los cuales fue el fragmento 5' 5LSubB (CTGTAGCACTCACTAua) (SEQ ID NO: 40) que tiene un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En segundo lugar, 5LSubB se ligó a un segundo sustrato oligonucleotídico B de ADNzima ligasa (3LSubB) presente en la mezcla de reacción de la etapa (ii) y esto resultó en la formación de un nuevo oligonucleótido (producto de ligación) con la secuencia de CTGTAGCACTCACTAuagGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO: 51) (en la que mayúscula representa bases de ADN y minúscula representa bases de ARN). Este producto de ligación funcionó a su vez como un facilitador del ensamblaje para MNAzima escisora 2. Este nuevo facilitador del ensamblaje ligado se asocia con las partzimas para crear MNAzima escisora 2. La MNAzima escisora 2 escindió el sustrato de la MNAzima 2 (SubBi-3-TxB2) resultando en la separación de una pareja de marcadores fluoróforo/apantallador causando así un incremento en la fluorescencia.

Los controles "sin ligación" (Reacción 2, 4 y 6) demostraron que la ligación del fragmento de escisión 5' (5LSubB) con extremo fosfato cíclico 2', 3' a un segundo sustrato de ligasa (3LSubB) es esencial para la formación del componente facilitador del ensamblaje de MNAzima escisora 2.

Los controles "sin facilitador del ensamblaje (AF-MzCA2)" (Reacción 3 y 4) demostraron que la escisión del Sustrato 1 (Pre5LSubB2-FB) por la MNAzima escisora 1 y la generación de un fragmento 5' con los extremos fosfato cíclico 2', 3' (5LSubB) era esencial para la ligación posterior y formación de un facilitador del ensamblaje requerido para el ensamblaje de MNAzima escisora 2.

La estrategia demostrada en este ejemplo podría usarse para crear una cascada de amplificación de la señal con retroalimentación. Si la escisión por MNAzima escisora 2 generara el mismo producto de escisión 5' que el generado por MNAzima escisora 1 este producto de escisión también podría ligarse para formar un producto de ligación que podría funcionar a su vez como otro nuevo componente MNAzima (por ejemplo, partzima, facilitador del ensamblaje o sustrato) para el ensamblaje de complejos adicionales de MNAzima escisora 2.

Además, será obvio para un experto en la técnica que la ADNzima ligasa podría ligar dos fragmentos y crear varias enzimas posibles o componentes de enzima útiles en esta cascada que incluye pero no está limitado a, a) un nuevo facilitador del ensamblaje para una segunda MNAzima escisora (como se muestra en este ejemplo) o b) una nueva partzima para una segunda MNAzima como se muestra en los ejemplos 6, 7, 9, y 11, o c) una nueva ADNzima

capaz de modificar un sustrato o sustratos (por ejemplo, por escisión, ligación etc). Además, será obvio para un experto en la técnica que la ADNzima con actividad ligasa podría ser sustituida por una MNAzima con actividad ligasa como se demuestra en el ejemplo 7 y 9. La estrategia es versátil y podría realizarse bien como una cascada secuencial de la primera, segunda y tercera etapa o como una reacción en cascada con retroalimentación en la que la etapa 3 crea un componente para la etapa 2 y la etapa 2 crea componentes para la etapa 3. Además, la etapa 3 podría crear un componente para una reacción posterior adicional.

Ejemplo 13: Una reacción en cascada con posible retroalimentación

Una representación esquemática de una variación de una cascada de amplificación con retroalimentación se ilustra en la Figura 16. Las etapas iniciales de una cascada que implica escisión por MNAzima, ligación por ADNzima y escisión por MNAzima se ilustran en la Figura 15 y se demuestran en el ejemplo 6, 7, 9, 11 y 12. El esquema descrito en este ejemplo e ilustrado en la Figura 16 extiende la estrategia de la cascada en el ejemplo 6, 7, 9, 11 y 12 y describe una estrategia para una cascada de amplificación con retroalimentación.

Como se ilustra en la Figura 16, en una primera etapa una MNAzima escisora 1 podría ensamblarse sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un ácido nucleico diana) y podría escindir el sustrato de MNAzima 1 para liberar un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2', 3'. En una segunda etapa una ADNzima ligasa (o una MNAzima ligasa ensamblada) podría ligar el producto de escisión 5' de la primera etapa a un sustrato de ligación 3' para crear un producto de ligación que podría servir como un facilitador del ensamblaje para otra MNAzima escisora 2. En una tercera etapa un facilitador del ensamblaje formado por ligación en la segunda etapa podría dirigir el ensamblaje de las partzimas que podrían formar una MNAzima escisora 2 que podría escindir el sustrato 2 en dos productos, un producto de escisión 5' con un extremo fosfato cíclico 2',3' y un producto de escisión 3'. Una señal detectable podría generarse después de la escisión del sustrato 2 si este sustrato estuviera marcado, por ejemplo, con una pareja de marcadores fluoróforo y apantallador.

Además, si la secuencia de uno de los productos de escisión de MNAzima escisora 2 fuera útil como un componente facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 3 esto podría iniciar una cascada con retroalimentación. En este caso, la MNAzima escisora 3 podría tener diferentes brazos sensores que la MNAzima escisora 1 pero podría tener los mismos brazos de sustrato que la MNAzima escisora 1. Así, si la MNAzima escisora 3 se ensamblara en presencia de un componente facilitador del ensamblaje generado por la escisión por la MNAzima escisora 2, y si la MNAzima escisora 3 escindiera el sustrato 1 el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 3 también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora 3 generaría de manera constante el producto de escisión 5' que a su vez podría servir como un sustrato para la ligación por la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) para crear más facilitadores del ensamblaje que podrían dirigir el ensamblaje de más MNAzima escisora 2. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un analito diana) que permite el ensamblaje de MNAzima escisora 1. La estrategia podría permitir la detección de uno o más facilitadores del ensamblaje (por ejemplo analitos diana) seguido de la amplificación de la señal usando una ADNzima o una MNAzima que puede ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir un sustrato.

En una variación adicional, la ADNzima (o MNAzima) con actividad ligasa podría ligar fragmentos para formar una ADNzima capaz de escindir el sustrato 2 para crear un componente facilitador del ensamblaje para una MNAzima 3. Como tal, en esta variación la MNAzima escisora 2 podría reemplazarse por una ADNzima escisora creada por ligación a partir de la segunda etapa.

También será obvio para un experto en la técnica que la señal podría generarse por la escisión del sustrato 1 y/o sustrato 2 siempre que los sustratos estén marcados, por ejemplo, con parejas de marcadores fluoróforo apantallador. En este caso, la escisión resultaría en un incremento en la fluorescencia. Además, sería posible medir un cambio en la fluorescencia después de la ligación del sustrato de ligación y el producto 5' de la MNAzima escisora 1 y/o MNAzima escisora 3 si los fragmentos estuvieran cada uno marcados bien con un fluoróforo o un apantallador. En este escenario, la ligación resultaría en un cambio en la fluorescencia bien en disolución o en una localización específica en un ensayo en el que, por ejemplo, un sustrato ligable está unido a un soporte sólido.

El componente facilitador del ensamblaje generado por la escisión (o ligación) en la etapa 2 o etapa 3 por una MNAzima o una ADNzima podría ser uno cualquiera de numerosos diseños. Como ejemplo, podrían parecerse a cualquiera de las configuraciones para facilitador del ensamblaje y/o brazos sensores de partzima como se ilustra en la Figura 6.

En otra variación de estrategia de cascada con retroalimentación en la que los productos de MNAzima escisora 2 podrían usarse como un componente facilitador del ensamblaje para una MNAzima escisora 3, la MNAzima escisora 3 podría tener una estructura modificada. En esta variante, la MNAzima escisora 3 podría tener diferentes brazos sensores que la MNAzima escisora 1 pero puede tener un brazo de sustrato (en una de las partzimas) para MNAzima 3 que es el mismo que la secuencia de la partzima de la MNAzima escisora 1 que interacciona con esa parte de la secuencia en el sustrato 1 (la parte 5' del sustrato) que posteriormente se liga por la ligasa. Como tal, la MNAzima escisora 3 escindiría un sustrato (sustrato escindible 3) que tiene la misma secuencia en la parte 5' pero

que tiene una parte diferente en el extremo 3' o viceversa respecto al sustrato escindible 1. El sitio de escisión del sustrato 3 podría estar en la unión de aquellas secuencias que comparten los sustratos escindibles 1 y 3 y aquellas que se diferencian. En este caso, cuando la MNAzima escisora 3 se ensamblara en presencia de un componente facilitador del ensamblaje generado por la escisión por la MNAzima escisora 2, y si la MNAzima escisora 3 escindiera el sustrato 3 el producto de escisión 5' de la MNAzima escisora 3 también podría servir como un sustrato 5' para la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) y podría iniciarse una reacción en cascada de amplificación con retroalimentación. En esta reacción, la MNAzima escisora 3 generaría de manera constante el producto de escisión 5' que a su vez podría servir como un sustrato para la ligación por la ADNzima ligasa (o la MNAzima ligasa ensamblada) para crear más componentes, por ejemplo, un facilitador del ensamblaje que podría dirigir el ensamblaje de más MNAzima escisora 2. Esta estrategia podría proporcionar un mecanismo para la amplificación de la señal con retroalimentación después del inicio de una reacción por un facilitador del ensamblaje (por ejemplo un analito diana) que permite el ensamblaje de MNAzima escisora 1. La estrategia podría permitir la detección de un facilitador del ensamblaje (por un analito diana) seguido de la amplificación de la señal usando una ADNzima o una MNAzima que puede ligar sustratos y MNAzimas que pueden escindir un sustrato.

También entenderá un experto en la técnica que las enzimas de ácidos nucleicos usadas en la cascada podrían crear diferentes componentes que podrían usarse en una reacción posterior tal como en una situación con retroalimentación. Como ejemplo, respecto a la Figura 16 una MNAzima escisora 2 podría crear un brazo estabilizador para MNAzima escisora 3, en lugar del componente facilitador del ensamblaje como se ilustra. En otra variación, la MNAzima escisora 2 podría reemplazarse por una MNAzima ligasa que podría crear, por ejemplo una partzima o un facilitador del ensamblaje para MNAzima escisora 3, o una ADNzima escisora a diferencia de la ilustración en la Figura 16 mediante lo cual una MNAzima escisora 2 crea un componente facilitador del ensamblaje.

En otra estrategia variante, la ADNzima (o MNAzima) ligasa podría ligar fragmentos y crear una nueva partzima capaz de asociarse con otra partzima y un facilitador del ensamblaje presente en la reacción formando así una MNAzima escisora 2 que podría escindir el sustrato 2 para crear un componente del facilitador del ensamblaje para una MNAzima 3.

Las variaciones descritas también pueden usarse según sea apropiado en otras cascadas a lo largo de la especificación. Las variaciones adicionales descritas en otro lugar de las especificaciones también podrían aplicarse aquí.

Las cascadas de enzimas de ácidos nucleicos, incluyendo las cascadas con retroalimentación, permiten la generación de señales después de la detección de analitos diana. La primera MNAzima en la cascada puede ser una MNAzima o apta-MNAzima, así pueden diseñarse sistemas de MNAzima para la detección de dianas de ácido nucleico y analitos distintos de ácido nucleico, por ejemplo proteínas o lípidos.

Además, las cascadas con retroalimentación podrían amplificar además la salida o señal detectable. Las cascadas de amplificación de la señal que usan enzimas de ácidos nucleicos tienen ventajas sobre las tecnologías de amplificación y detección de dianas, por ejemplo PCR en tiempo real. Aunque las tecnologías de amplificación de dianas son herramientas potentes que se han usado ampliamente en investigación y/o diagnóstico clínico, cada una tiene desventajas inherentes. Todas requieren el uso de enzimas proteicas (por ejemplo, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa y/o ligasa). La inclusión de enzimas proteicas incrementa la complejidad y coste de la fabricación de los reactivos y disminuye la vida a temperatura ambiente de los kits que contienen los reactivos. Otros retos técnicos asociados incluyen la contaminación por replicones (amplicones diana) de reacciones previas que da lugar a una señal de falso positivo y/o señal de fondo causada por la replicación de secuencias de cebador (dímeros de cebadores) o fondo causada por la ligación independiente de diana.

Ejemplo 14: Ensayo de la actividad de MNAzima a partir de una serie de parejas de partzima que contienen secuencias de núcleo catalítico parciales variantes obtenidas del núcleo catalítico 10:23

Pueden prepararse enzimas de ácidos nucleicos multi-componente (MNAzimas) que incorporan secuencias parciales de una variedad de ADNzimas desarrolladas *in vitro*. Se han demostrado MNAzimas activas, basadas en secuencias parciales de las ADNzimas 8:17 y 10:23. Además, se ha mostrado que varios diseños alternativos de partzima basados en las ADNzimas 8:17 y 10:23 tienen o carecen de actividad de escisión (PCT/AU2006/001473, Johnson & Johnson Research Pty Limited). Este ejemplo identifica secuencias de partzima tanto activas como inactivas basadas en secuencias de núcleo catalítico parciales de la ADNzima 10:23 que pueden escindir un sustrato. Además, el ejemplo proporciona un protocolo general para las etapas necesarias para identificar el o los sitios óptimos para dividir una secuencia de núcleo catalítico de manera que, cuando las secuencias de núcleo catalítico parciales se incorporan en partzimas, se generan MNAzimas funcionales activas.

Otras ADNzimas, bien conocidas o desarrolladas *in vitro*, podrían someterse a un análisis similar al descrito en este ejemplo y en los ejemplos 7 y 9. Por lo tanto, estos ejemplos proporcionan un método que un experto en la técnica podría usar para identificar secuencias de núcleo catalítico parciales para MNAzimas activas capaces de muchas funciones incluyendo escisión (este ejemplo) o ligación (ejemplos 7 y 9), u otras funciones desarrolladas *in vitro*, incluyendo pero no limitado a fosforilación de ácidos nucleicos, adición de una cubierta a los ácidos nucleicos, adenilación de aminoácidos, síntesis de cofactores, polimerización de ARN, polimerización dirigida por molde,

5 conjugación ARN-proteínas, reacción de aldol, oxidación de alcoholes, reducción de aldehído, síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, alquilación, síntesis de amida, síntesis de urea, formación de enlaces peptídicos, síntesis de peptidil-ARN, transferencia de acilo, aminoacilación, hidrólisis de carbonato, alquilación de fósforotioato, matalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, formación de nanopartículas de Pd, isomerización de bifenilo, formación de enlaces éster, formación de enlaces amida, desglicosilación de ADN, fotoreversión de dímeros de timina y escisión de fosforamidato.

14.1 Oligonucleótidos de Partzima

10 El método en este ejemplo se usó para investigar qué posiciones en la secuencia del núcleo catalítico de 10:23 son adecuadas para dividir en secuencias de núcleo catalítico parciales que, después de la incorporación en partzimas, resultan en MNAzimas funcionalmente activas. La secuencia 10:23 se dividió en varios puntos y las dos secuencias parciales se incorporaron en una serie de parejas de partzima que se diseñaron para escindir un sustrato en presencia de una diana (gen RPLPO humano). Los núcleos catalíticos parciales para cada pareja de partzima que se ensayaron se muestran en la Tabla 12 respecto a la secuencia completa de núcleo catalítico de la ADNzima 10:23 (Santoro y Joyce, 1997).

15 Tabla 12: Bases y posición en la ADNzima 10:23 y en una serie de parejas de partzima variantes en las que las bases en las posiciones 1 a 15 del núcleo se han distribuido de manera diferente entre dos partzimas A y B.

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:B5 (T8-A9)	Partzima A								A	C	A	A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A	G	C	T						
Diseño 7 A5:B6 (C7-T8)	Partzima A							T	A	C	A	A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A	G	C							
Diseño 8 A6:B7 (A11-A12)	Partzima A											A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A	G	C	T	A	C	A			
Diseño 9 A7:B8 (A9-C10)	Partzima A									C	A	A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A	G	C	T	A					
Diseño 10 A8:B9 (G6-C7)	Partzima A						C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A	G								
Diseño 11 A9:B10 (A5-G6)	Partzima A					G	C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partzima B	G	G	C	T	A									

Todas las secuencias están escritas 5' a 3'. El diseño de MNAzima y la nomenclatura de las partzimas identifica la ADNzima y la localización de la división en el núcleo. Por ejemplo, el Diseño 6 es una MNAzima obtenida de 10:23 con diseño partzima A4 y partzima B5 (A4:B5), en la que el núcleo se ha dividido entre T en la posición 8 y A en la posición 9 (T8-A9).

20 En este experimento, la serie de parejas de partzima se sintetizaron todas con brazos sensores diseñados para hibridar con el exón 5 del gen RPLPO humano, y con los brazos de sustrato dirigidos frente al sustrato, SubBi-2. Las parejas de partzima usadas en este experimento se sintetizaron por Sigma-Prologo y sus secuencias se listan a continuación (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 itálica hibridan con el sustrato. La "-P" indica la fosforilación en 3' del oligonucleótido.

RPLPO Pareja de Partzima A4:B5

SEQ ID NO: 6 RO5A4/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT** -P

25 SEQ ID NO: 88 ROSB5(16)/2-P *TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACA* -P

RPLPO Pareja de Partzima A5:B6

SEQ ID NO: 89 RO5A5(22)/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT** -P

SEQ ID NO: 90 RO5B6(16)/2-P **TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGATTACA** -P

RPLPO Pareja de Partzima A6:B7

5 SEQ ID NO: 91 RO5A6(22)/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACGAGAGGAAACCTT** -P

SEQ ID NO: 92 RO5B7(16)/2-P **TGCCCAGGGAGGCTAGCTACAGTGGAGACGGATTACA** -P

RPLPO Pareja de Partzima A7:B8

SEQ ID NO: 93 RO5A7(22)/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTCAACGAGAGGAAACCTT** -P

SEQ ID NO: 94 RO5B8(16)/2-P **TGCCCAGGGAGGCTAGCTAGTGGAGACGGATTACA** -P

10 RPLPO Pareja de Partzima A8:B9

SEQ ID NO: 95 RO5A8(22)/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTCTACAACGAGAGGAAACCTT** -P

SEQ ID NO: 96 RO5B9(16)/2-P **TGCCCAGGGAGGCTAGGTGGAGACGGATTACA** -P

RPLPO Pareja de Partzima A9:B10

SEQ ID NO: 97 RO5A9(22)/2-P **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTGCTACAACGAGAGGAAACCTT** -P

15 SEQ ID NO: 98 RO5B10(16)/2-P **TGCCCAGGGAGGCTAGTGGAGACGGATTACA** -P

14.2. Sustrato Informador

El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, 5' a 3', como a continuación. En el presente ejemplo, SubBi-2 se marcó en los extremos con un resto 6-FAM en el extremo 5' y un resto BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se monitorizó 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 minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

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

Las secuencias de los cebadores se muestran, 5' a 3', a continuación.

25 SEQ ID NO: 99 5' Cebador 5RO5/2 GCTACCCAACTGTTGCATC

SEQ ID NO: 100 3' Cebador 3RO5/2 AGCAGCCACAAAGGCAGA

14.4. Molde diana

El ADN genómico humano extraído de células K562 se usó como molde en la reacción de PCR.

14.5. Condiciones de la reacción

30 La amplificación en tiempo real de la secuencia diana y la detección de la actividad catalítica de las parejas de partzima se llevaron a cabo en una reacción de 25 mL ciclada en un termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclado fueron 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1° C en temperatura por ciclo), y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 50°C durante 30 segundos. Cada reacción contenía 0,04 mM 5RO5/2 y 0,2 mM de 3RO5/2, 10 mM MgCl₂, 50 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Immobuffer (Bioline), 0,2 mM SubBi-2-FB, 1x Rox marcador de referencia (Invitrogen), 10 Unidades de Rnasina (Progema) y 1 Unidad de Polimerasa Immolase (Bioline) y 100 ng de ADN genómico. Además, cada reacción contenía una pareja de partzimas 0,2 mM de partzima A y 0,2 mM de partzima B (RPLPO Pareja de Partzima A4:B5 o A5:B6 o A6:B7 o A7:B8 o A8:B9 o A9:B10).

14.6. Resultados

40 Usando un método MNazima-PCR en tiempo real, la actividad catalítica se detectó a partir de tres de las seis parejas de partzima RPLPO. La pareja de partzima A4:B5 y A5:B6 mostraron altos niveles de actividad catalítica, permitiendo la detección de la diana después de 22 ciclos (Tabla 13). La pareja de partzima A7:B8 también fue activa, aunque menos activa que A4:B5 y A5:B6. No se detectó actividad catalítica de las parejas de partzima A6:B7, A8:B9 o A9:B10 en las condiciones de este experimento.

Tabla 13: Valores de Ciclo Umbral (Ct) obtenidos usando varias parejas de partzima

División del Núcleo (véase la tabla anterior, este ejemplo)	Ct	Comentario
A4:B5 (T8-A9)	19.3	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas
A5:B6 (C7-T8)	21.6	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas
A6:B7 (A11-A12)	Sin señal a 50 ciclos	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
A7:B8 (A9-C10)	31.7	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas
A8:B9 (G6-C7)	Sin señal a 50 ciclos	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
A9:B10 (A5-G6)	Sin señal a 50 ciclos	Esta combinación de secuencias parciales de núcleo catalítico en estas partzimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
Los valores Ct se promedian a partir de reacciones en triplicado, cuando el nivel umbral de fluorescencia se ajustó a 0,2 y la fluorescencia de fondo en la línea base se restó entre los ciclos 1 y 14.		

Este ejemplo demuestra que existen varias formas de dividir el núcleo catalítico de la ADNzima 10:23 de manera que cuando las secuencias parciales del núcleo se incorporan en partzimas, pueden formar MNAzimas catalíticamente activas. El ejemplo también demuestra que no todas las secuencias parciales del núcleo forman MNAzimas activas cuando se incorporan en partzimas. El método demostrado en este ejemplo puede usarse para identificar las secuencias parciales del núcleo adecuadas para incorporación en partzimas capaces de ensamblarse en MNAzimas activas.

Patentes y Publicaciones de Patente:

Publicación Internacional PCT No. WO 99/50452

10 Otras Referencias:

Achenbach, J., Nutiu, R. y Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymes. *Analytica Chimica Acta*. 534(1): 41-51.

Benenson, Y., Paz-Elizur, T., Adar, R., Keinan, E., Livneh, Z. y Shapiro, E. (2001) Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. *Nature*. Nov 22; 414(6862):430-4

15 Breaker, R.R. y Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol. Dec*; 1(4): 223-9.

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.

20 Coppins, R.L. y Silverman, S.K. (2004) Rational modification of a selection strategy leads to deoxyribozymes that create native 3'-5' RNA linkages

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.

25 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.

- Emillson, G.M. y Breaker, R.R. (2002) Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 596-607.
- Flynn-Charlebois, A., Prior, T.K., Hoadley, K.A. y Silverman, S.K. (2003) In vitro evolution of an RNA-cleaving DNA enzyme into an RNA ligase switches the selectivity from 3'-5' to 2'-5'. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 5346-50
- 5 Haseloff, J. y Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature.* Ago 18; 334(6183): 585-91.
- Hobartner, C. y Silverman, S.K. (2007) Recent advances in DNA catalysis. *Biopolymers.* 87 (5-6): 279-291.
- Huizenga, D. y Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry.* 34: 656-665
- 10 Kurata, H., Miyagishi, M., Kuwabara, T., Warashima M. y Taira, K.(2000) Maxizymes: Allosterically controllable ribozymes with biosensor function. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 5, 359-363
- 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.
- 15 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.
- 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.
- Paul, N. y Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems. *Current Opinion in Chemical Biology.* 8(6): 634-639.
- 20 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.
- Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. y Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. *Nature.* 344(6266): 565-7.
- 25 Prior, T.K., Semlow, D.R. Flynn-Charlebois, Rashid, I. y Silverman, S.K. (2004) Structure-function correlations derived from faster variants of a RNA ligase deoxyribozyme. *Nucleic Acids Research*, 32, 1075-1082.
- Raillard, S.A. y Joyce, G.F. (1996) Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozyme. *Biochemistry.* 35(36): 11693-701.
- Santoro, S. y Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 4262-4266.
- 30 Santoro, S.W. y Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochem.* 37(38): 13330-42.
- Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. y Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozymes. *J Mol Biol.* Mayo 28;339(2): 355-63.
- 35 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.
- Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA). *Chem Biol. Ene*;11(1): 7-8.
- Silverman, S.K. (2007) In vitro selection and application of nucleic acid enzymes (Ribozymes and deoxyribozymes). *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology.* En Prensa.
- 40 Tabor, J.J., Levy, M. y Ellington, A.D. (2006) Deoxyribozymes that recode sequence information. *Nucleic Acids Res.* 34(8): 2166-2172
- 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. Abr*;6(6): 237-50.
- 45 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): 240617-22.

Listado de Secuencias

<110> Johnson & Johnson Research Pty. Limited

<120> Enzimas y complejos de ácidos nucleicos y métodos para su uso

5 <130> 804701C

<150> US 11/697.021

<151> 05-04-2007

10 <150> AU 2007901833

<151> 05-04-2007

<150> US 60/910.427

15 <151> 05-04-2007

<160> 106

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <221> Fosforilación

<222> (38)..(38)

<400> 1

35 actggatgtc catctgtctg acaacgagag gaaacctt 38

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> Fosforilación

<222> (23)..(23)

<400> 2

50 tgcccagga ggctagctta tac 23

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <220>

<221> Fosforilación

<222> (15)..(15)

65 <400> 3

cttcgtgagg gtgag 15

5 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> ARN
 <222> (12)..(13)
 15 <400> 4

aaggttctc cguccctggg ca 22

20 <210> 5
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5

30 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

<210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (40)..(40)

<400> 6

45 caaacgagtc ctggcctgt ctacaacgag aggaacctt 40

<210> 7
 <211> 47
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

55 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (47)..(47)

60 <400> 7

tgcccagga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc cacttgc 47

65 <210> 8
 <211> 51
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 8

gcaagtggga aggtgtaatc cgtctccaca gacaaggcca ggactcgttt g 51

10 <210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 9

20 gcaagtggga aggtgtaatc cgtct 25

<210> 10
<211> 26
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 10

ccacagacaa ggccaggact cgtttg 26

<210> 11
<211> 48
<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 11

aaggtttcct cgtccctggg caccacagac aaggccagga ctcgtttg 48

45 <210> 12
<211> 59
<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 12

55 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtacctgggg gagtattgcg gaggaaggt 59

<210> 13
<211> 31
<212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

65 <400> 13

catctctct ccgagcgtct gtaccgtgta c 31
 <210> 14
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 14
 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacggt 30
 15 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 15
 25 ccaggtactc actattt 17
 <210> 16
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> ARN
 <222> (10)..(10)
 40 <400> 16
 actcactata ggaagagatg 20
 <210> 17
 45 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 17
 cctctcgtg acggcggagt gattgggagg ttagctctag tgagtgc 47
 55 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 65 tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt 28

ES 2 425 066 T3

<210> 19
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 19
catctcttct ccgagctaag cacttta 27

<210> 20
15 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20
25 tgcccagga ggctagctct gtcgtcggag tggcgtcg 39

<210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
35 <221> ARN
<222> (16)..(17)

<400> 21
40 ctgtagcact cactauagga agagatg 27

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

50 <220>
<221> ARN
<222> (1)..(1)

<400> 22
55 ggaacaacga gaggaaacct t 21

<210> 23
<211> 22
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

65 <400> 23

taaagtgctt atagtcagg ta 22

5 <210> 24
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 24

15 cgagcaccac tccgacgaca gtctatagt gaggctaca g 41

<210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 25

25 aacgagtcct ggccttgctt ggctctagt agtgc 35

<210> 26
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 26

tctcgttgtt acgtggaggt ggtggagacg gattacacct t 41

40 <210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 27

50 aacgagtcct ggccttgctt gggctctagt gaggctaca g 36

<210> 28
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 28

tctcgttgtt acgtggaggt ggtggagacg gattacacct t 40

65 <210> 29
 <211> 37
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 5 <400> 29
 aacgagtcct ggccttgctc tgggctctag tgagtgc 37
 10 <210> 30 .
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 20 tctcgttggt acgtggaggg tggagacgga ttacacct 39
 <210> 31
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <400> 31
 aacgagtcct ggccttgctc tggaggtggg ctctagtgag tgc 43
 <210> 32
 35 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 tctcgttggt acggtggaga cggattacac ctt 33
 45 <210> 33
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 55 aacgagtcct ggccttgctc ggaggtgggc tctagtgagt gc 42
 <210> 34
 <211> 34
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 65 <400> 34

tctcgttggt acgtgtggag acggattaca cctt 34

5 <210> 35
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 35

aacgagtcct ggccttgct gtggaggtgg gctctagtga gtgc 44

15 <210> 36
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 36

25 tctcgttggt acgtggagac ggattacacc tt 32

30 <210> 37
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37

aacgagtcct ggccttgct gaggtgggct ctagtgagtg c 41

40 <210> 38
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 38

50 tctcgttggt acgtgtgga gacggattac acctt 35

55 <210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 39

tctcgttggt acgtggaggt gggctctagt gagtgc 36

65 <210> 40
 <211> 17
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 5 <220>
 <221> ARN
 <222> (16)..(17)
 10 <400> 40
 ctgtagcact cactaua 17
 <210> 41
 15 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 41
 acgtggaggt g 11
 25 <210> 42
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 42
 35 cgtcgtgaga tgaggaagag atggatgggc ac 32
 <210> 43
 <211> 42
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 45 <400> 43
 aagggtgtaat ccgtctccac agacaaggcc aggactcgtt tg 42
 50 <210> 44
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 44
 60 acgtggaggt 10
 <210> 45
 <211> 32
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 45
 5 gtgcccatcc atctccggtc gaaatagtga gt 32
 <210> 46
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 15 <400> 46
 catctcttct ccgagcttcc tcatctcacg acg 33
 20 <210> 47
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 30 tggaggtggg ctc 13
 <210> 48
 <211> 3
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 40 <400> 48
 acg 3
 <210> 49
 45 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 49
 55 ggaggtgggc tc 12
 <210> 50
 <211> 4
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 50
 65 acgt 4

ES 2 425 066 T3

<210> 51
 <211> 38
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

 10 <220>
 <221> ARN
 <222> (16)..(18)

 <400> 51
 15 ctgtagcact cactauagga acaacgagag gaaacctt 38

 <210> 52
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 25 <400> 52

 acgtggaggt gggctc 16

 30 <210> 53
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

 <400> 53
 40 gttgaggtgg gctc 14

 <210> 54
 <211> 11
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 50 <400> 54

 gaggtgggct c 11

 <210> 55
 <211> 44
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

 <400> 55
 65 caaacgagtc ctggccttgt ctggaggta gctctagtga gtgc 44

 <210> 56

ES 2 425 066 T3

<211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 56

10 cctctcgttg acggcggagt gattggtgga gacggattac acct 45
 <210> 57
 <211> 46
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 57
 caaacgagtc ctggccttgt ctggggagt tagctctagt gagtgc 46
 <210> 58
 25 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 58

35 cctctcgttg acggcggagt gatgtggaga cggattacac ctt 43
 <210> 59
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 59

45 caaacgagtc ctggccttgt ctattgggag gttagctcta gtgagtgc 48
 <210> 60
 <211> 41
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

55 <400> 60
 cctctcgttg acggcggagt ggtggagacg gattacacct t 41
 60 <210> 61
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 425 066 T3

<400> 61

5 caaacgagtc ctggccttgt ctgattggg aggttagctc tagtgagtgc 50

<210> 62
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 62

cctctcgttg acggcggagg tggagacgga ttacacct 39

<210> 63
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 63

caaacgagtc ctggccttgt ctagtattg ggaggttagc tctagtgc gc 52

30 <210> 64
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 64

cctctcgttg acggcgggtg gagacggatt acacct 37

<210> 65
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 65

caaacgagtc ctggccttgt ctggagtgat tgggaggta gctctagtga gtgc 54

55 <210> 66
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 66

65 cctctcgttg acggcgtgga gacggattac acct 35

<210> 67

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> ARN
 10 <222> (16)..(17)

<400> 67

15 ctgtagcact cactauagga agagatgag 29

<210> 68
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 68

25 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31

<210> 69
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 69

gctggtcatc cagcagcggc cgaaatagtg agtgc 35

40 <210> 70
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 70

50 ctcatctctt ctccgagcgt gttcgacaat ggc 33

<210> 71
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 71

ggaggttagc tc 12

65 <210> 72
 <211> 15
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 5 <400> 72
 acggcggagt gattg 15
 10 <210> 73
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 73
 20 tgggaggta gctc 14
 <210> 74
 <211> 13
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <400> 74
 acggcggagt gat 13
 <210> 75
 35 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 75
 attgggaggt tagctc 16
 45 <210> 76
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 76
 55 acggcggagt g 11
 <210> 77
 <211> 10
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 77

tgattgggag gttagctc 18
 <210> 78
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 10 <400> 78
 acggcggag 9
 15 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 79
 25 agtgattggg aggttagctc 20
 <210> 80
 <211> 7
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 35 <400> 80
 acggcgg 7
 40 <210> 81
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 81
 ggagtgattg ggaggttagc tc 22
 50 <210> 82
 <211> 5
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 82
 60 acggc 5
 <210> 83
 <211> 27
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 83
 acggcggagt gattgggagg ttagctc 27

<210> 84
 10 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 84
 20 ctgtagcact cactatagga acaacgagag gaaacctt 38

<210> 85
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 85
 30 aaggttcct ctggtgttc ctacaacgag gttgtgctg 39

<210> 86
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 86
 cggttggtga ggctagctat agtgagtgct acag 34

<210> 87
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> ARN
 55 <222> (11)..(12)

<400> 87
 60 cagcacaacc gucaccaacc g 21

<210> 88
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> Fosforilación
 5 <222> (34)..(34)

<400> 88

10 tgcccagga ggctagctgt ggagacggat taca 34

<210> 89
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 20 <221> Fosforilación
 <222> (41)..(41)

<400> 89

25 caaacgagtc ctggcctgt ctacaacga gaggaaacct t 41

<210> 90
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (33)..(33)

<400> 90

40 tgcccagga ggctagcgtg gagacggatt aca 33

<210> 91
 <211> 37
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (37)..(37)

55 <400> 91

caaacgagtc ctggcctgt ctacgagagg aaacctt 37

<210> 92
 60 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>

<221> Fosforilación
 <222> (37)..(37)
 <400> 92
 5 tgcccagga ggctagctac agtgagacg gattaca 37
 <210> 93
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 15 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (39)..(39)
 20 <400> 93
 caaacgagtc ctggcctgt ctcaacgaga gaaacctt 39
 <210> 94
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (35)..(35)
 35 <400> 94
 tgcccagga ggctagctag tggagacgga ttaca 35
 <210> 95
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> Fosforilación
 50 <222> (42)..(42)
 <400> 95
 caaacgagtc ctggcctgt ctctacaacg agaggaaacc tt 42
 55 <210> 96
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> Fosforilación
 65 <222> (32)..(32)

<400> 96

5 tgcccagga ggctagtg agacggatta ca 32

<210> 97
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (43)..(43)

<400> 97

20 caaacgagtc ctggccttgt ctgctacaac gagaggaaac ctt 43

<210> 98
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> Fosforilación
 <222> (31)..(31)

<400> 98

35 tgcccagga ggctagtgga gacggattac a 31

<210> 99
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

45 <400> 99

gctaccaac tgtgcatc 19

50 <210> 100
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 100

60 agcagccaca aaggcaga 18

<210> 101
 <211> 5
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 425 066 T3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 101
ggctc 5

10 <210> 102
<211> 6
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 102
gggctc 6

20 <210> 103
<211> 7
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 103
tgggctc 7

30 <210> 104
<211> 9
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 104
acgtggagg 9

45 <210> 105
<211> 2
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 105
ac 2

55 <210> 106
<211> 5
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 106
65 acgtg 5

REIVINDICACIONES

1. Uso de una enzima de ácidos nucleicos multi-componente con actividad ligasa (MNAzima ligasa) para ligar dos sustratos en el que dichos sustratos son ligados por dicha MNAzima ligasa sólo en presencia de un facilitador del ensamblaje de la MNAzima, para formar un producto después del reclutamiento de dichos sustratos por los brazos de sustrato de dicha MNAzima ligasa, en el que dicho producto se asocia con los componentes de al menos un complejo de ácidos nucleicos.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1 en el que dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un facilitador del ensamblaje, partzima, sustrato, ADNzima, brazo estabilizador, inhibidor de la actividad, inhibidor del ensamblaje, o componente de éstos.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2 en el que el producto puede participar en una cascada.
4. El uso de la reivindicación 1 en el que al menos un sustrato es el producto de una reacción catalizada por una enzima de ácidos nucleicos.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho producto es un componente de una MNAzima.

Figura 1.

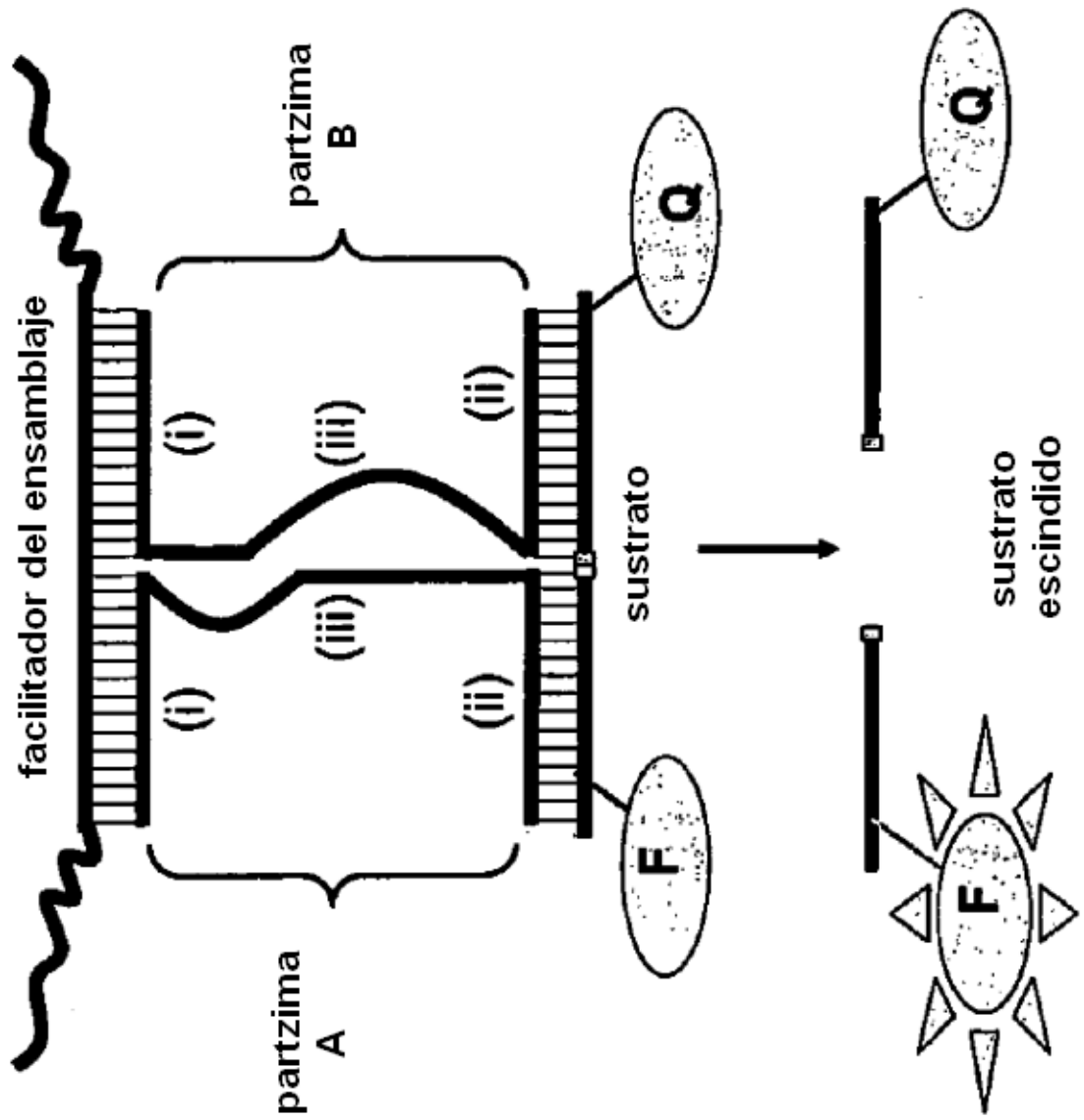


Figura 2

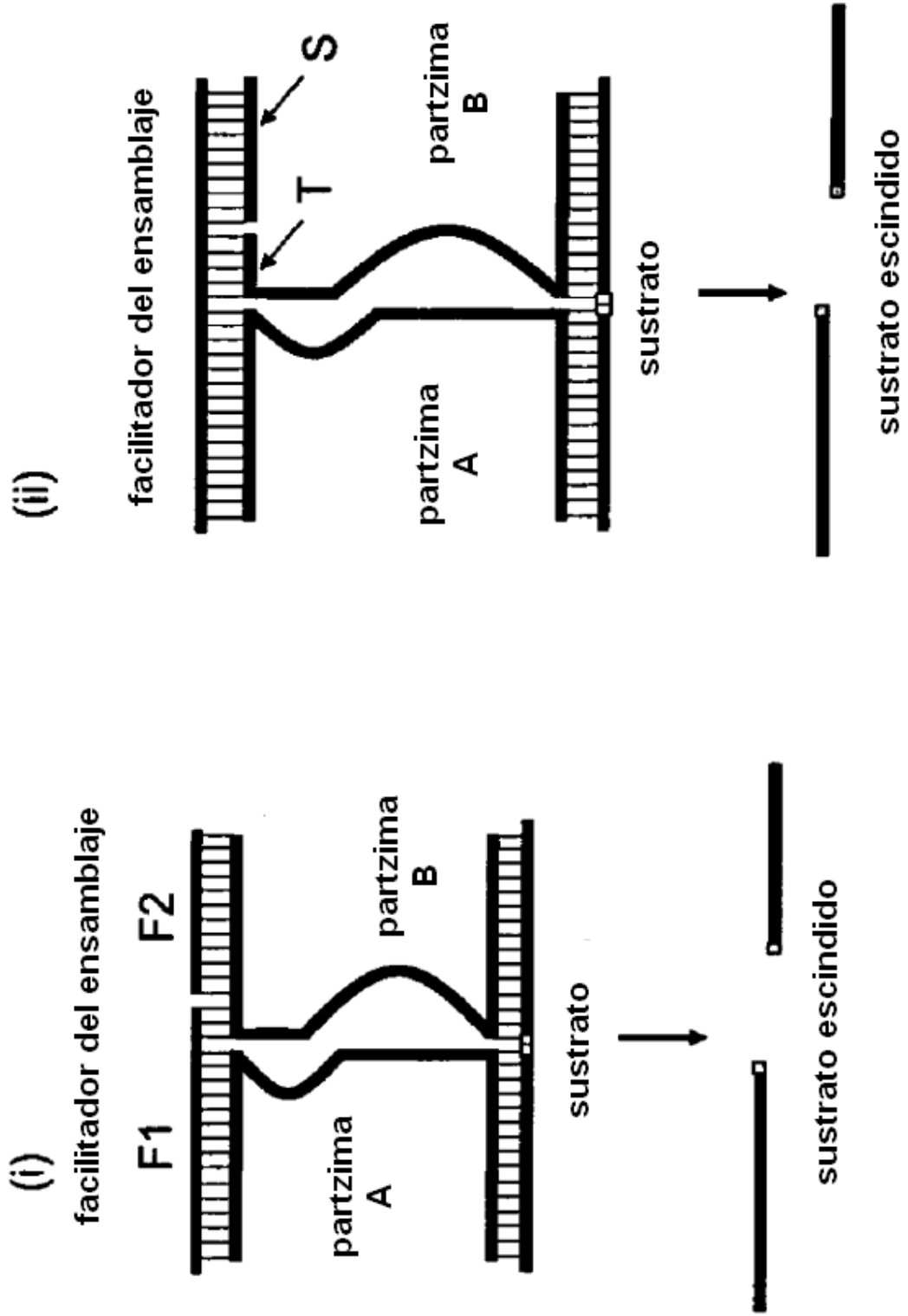


Figura 3.

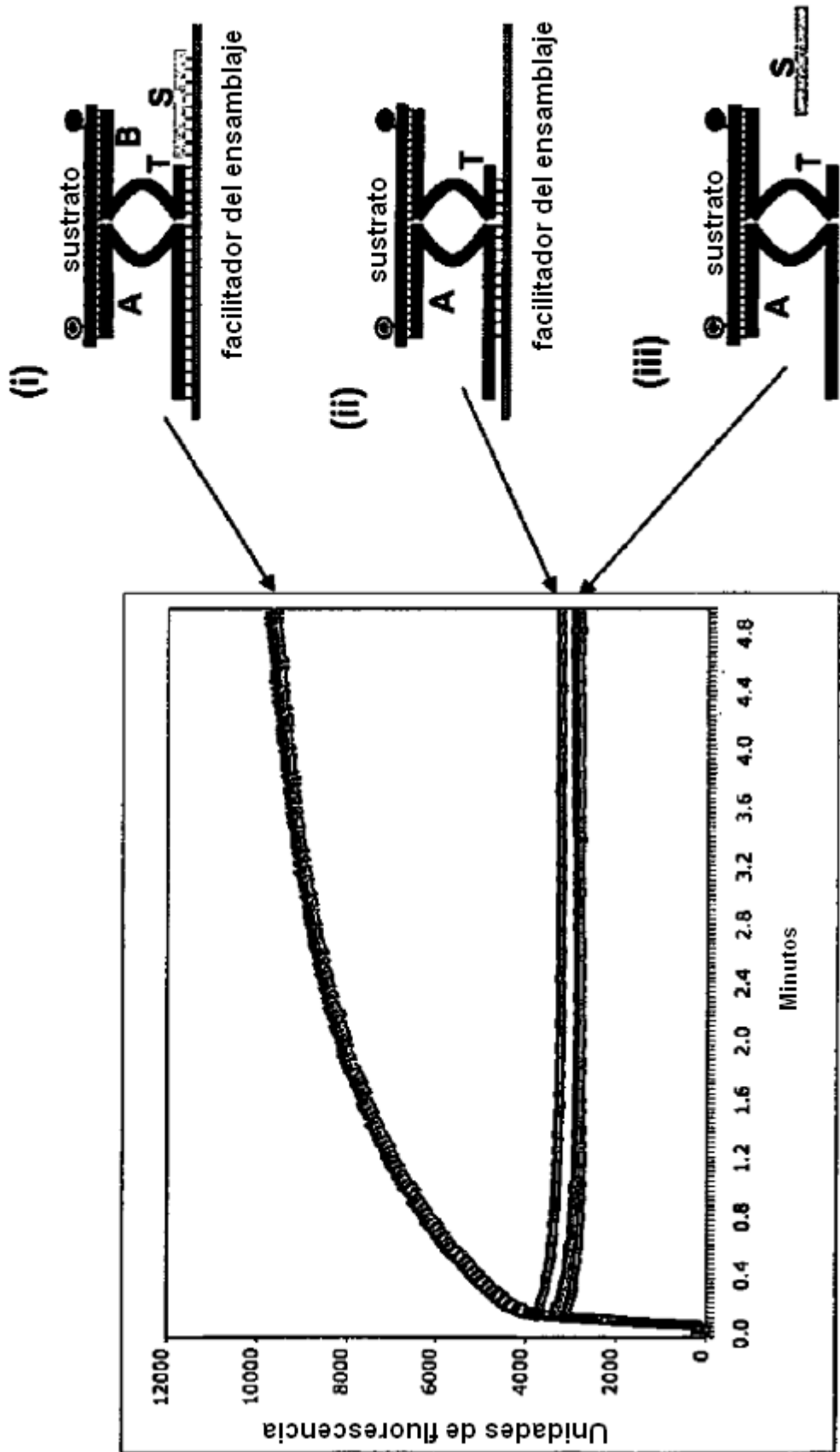


Figura 4

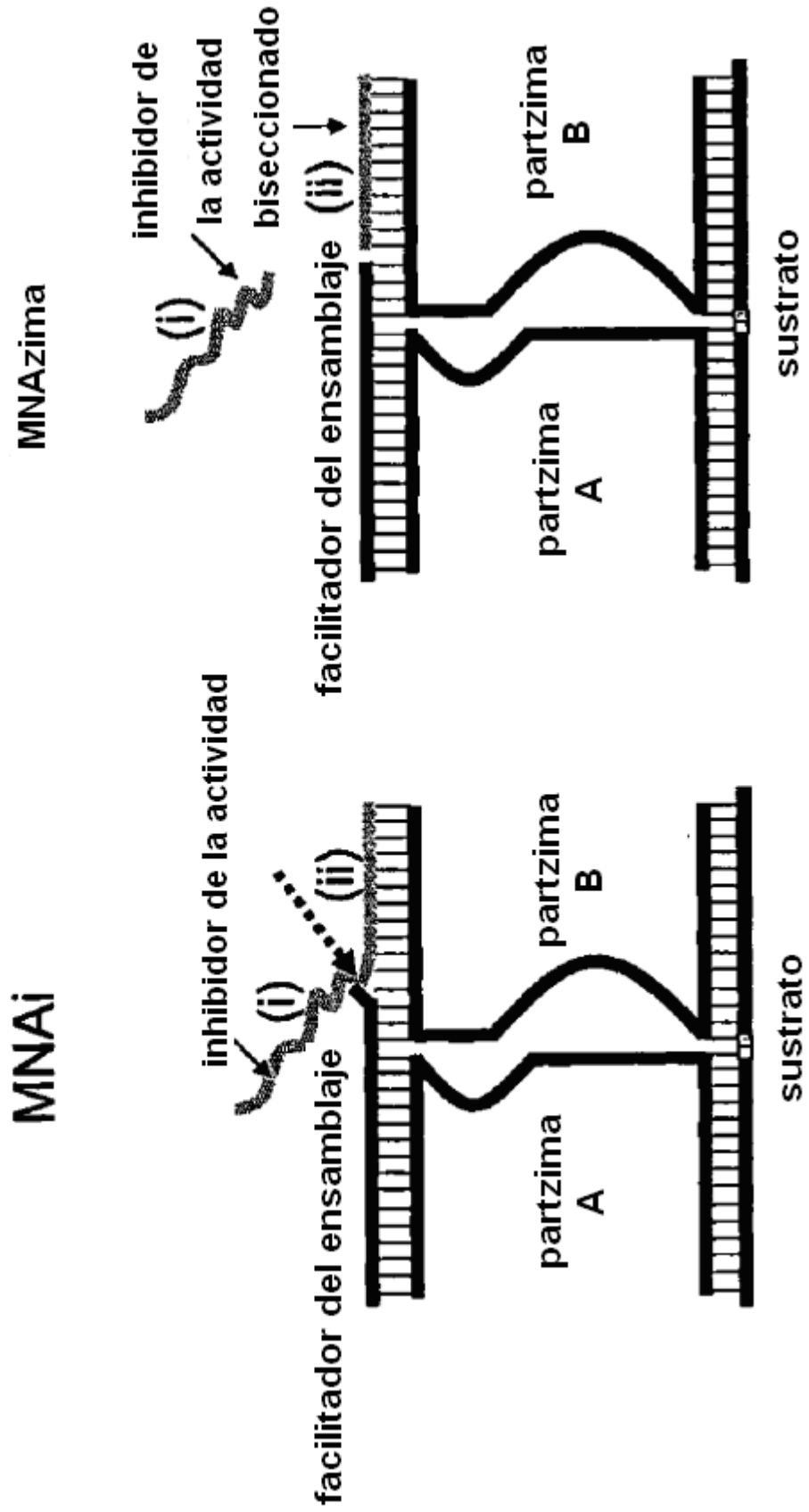


Figura 5

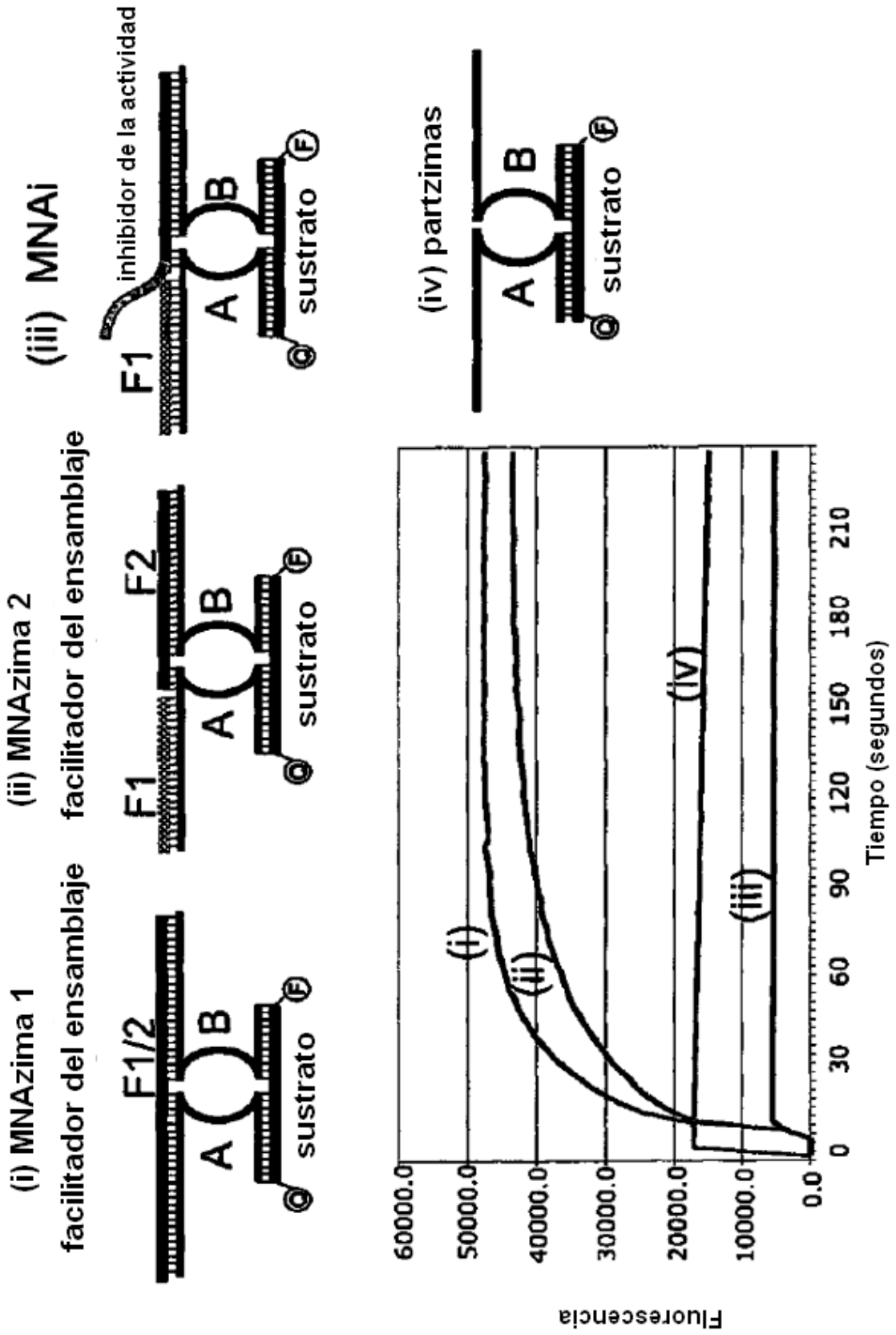


Figura 6

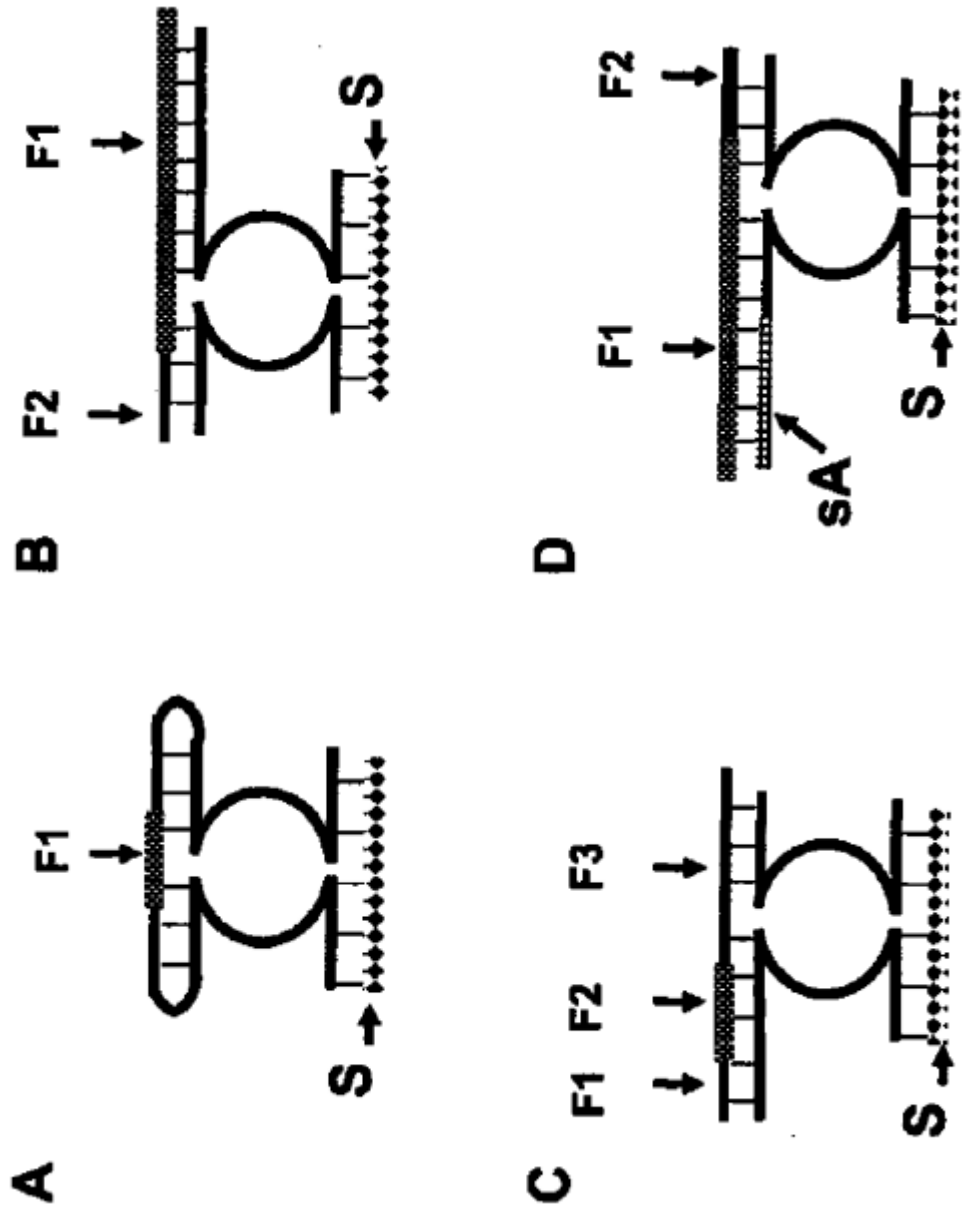


Figura 7

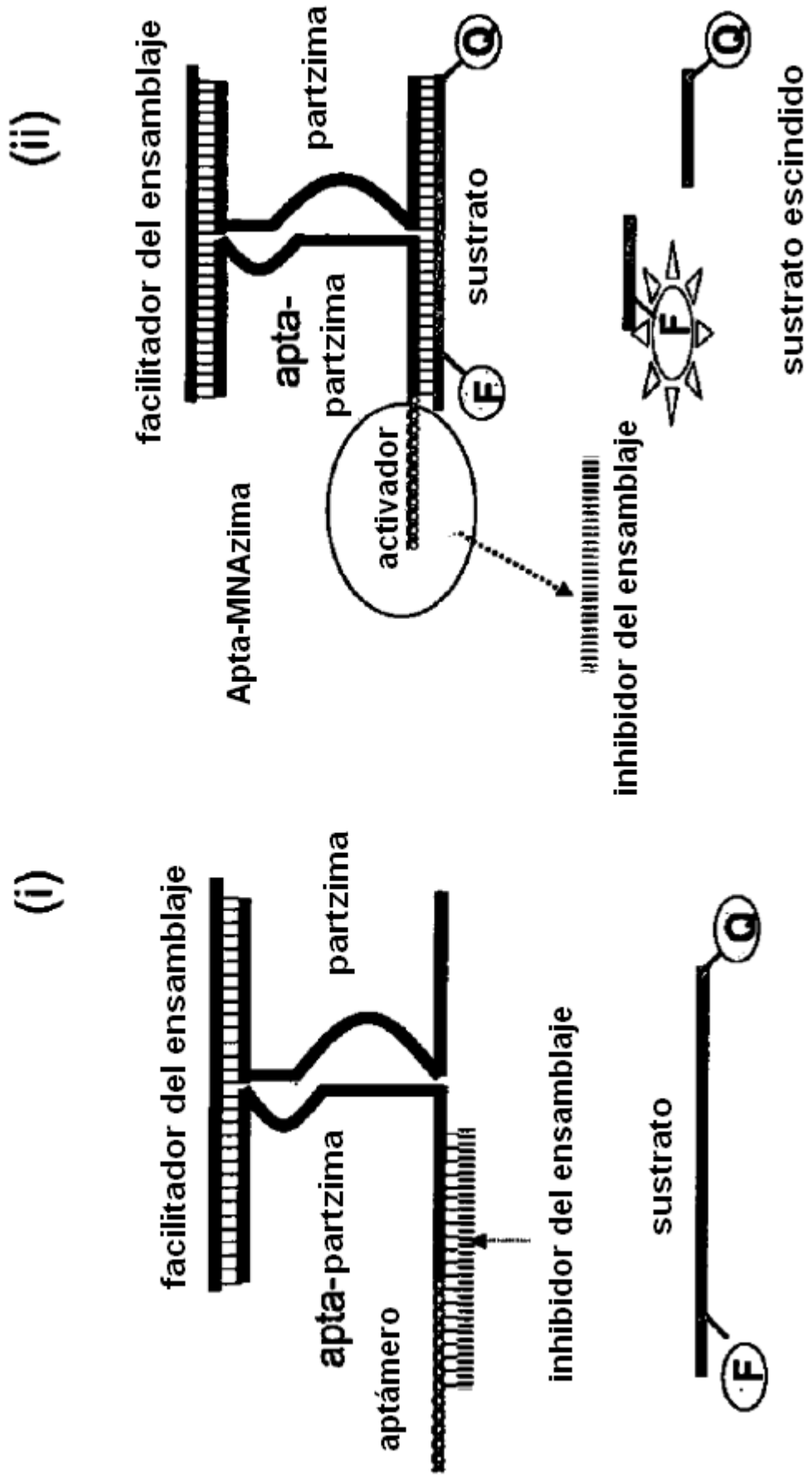
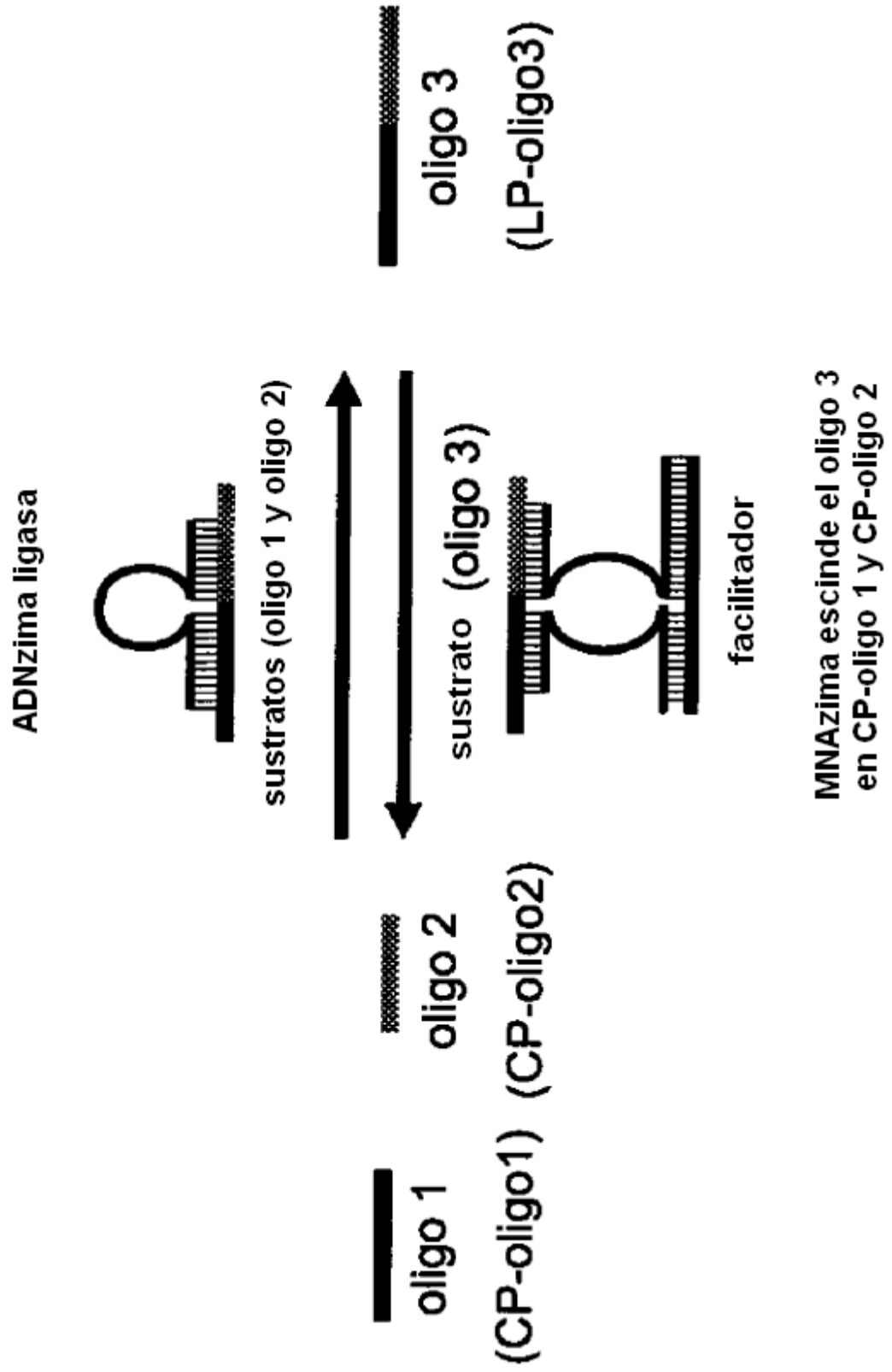


Figura 8



MNAzima escinde el oligo 3 en CP-oligo 1 y CP-oligo 2

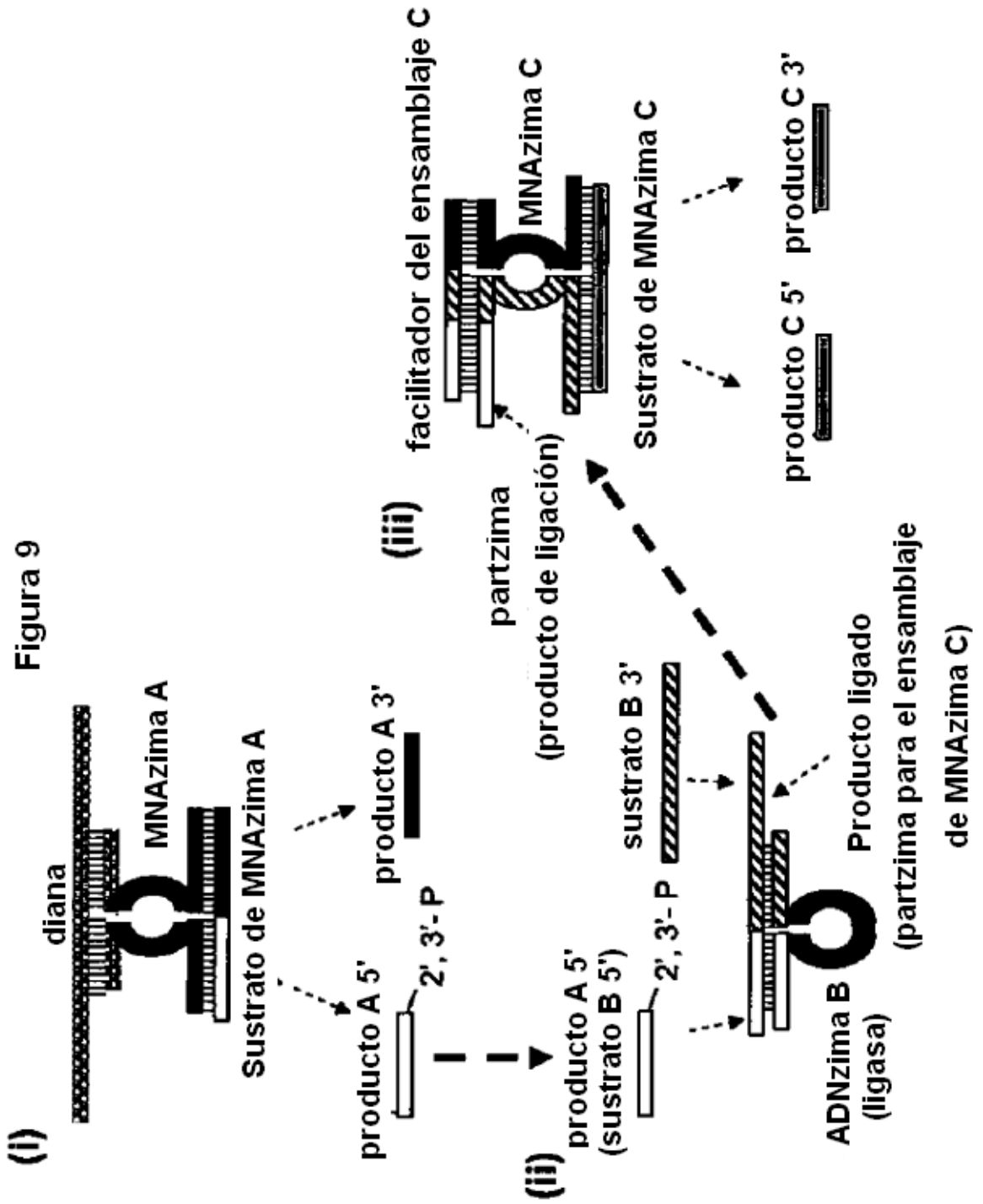


Figura 10.

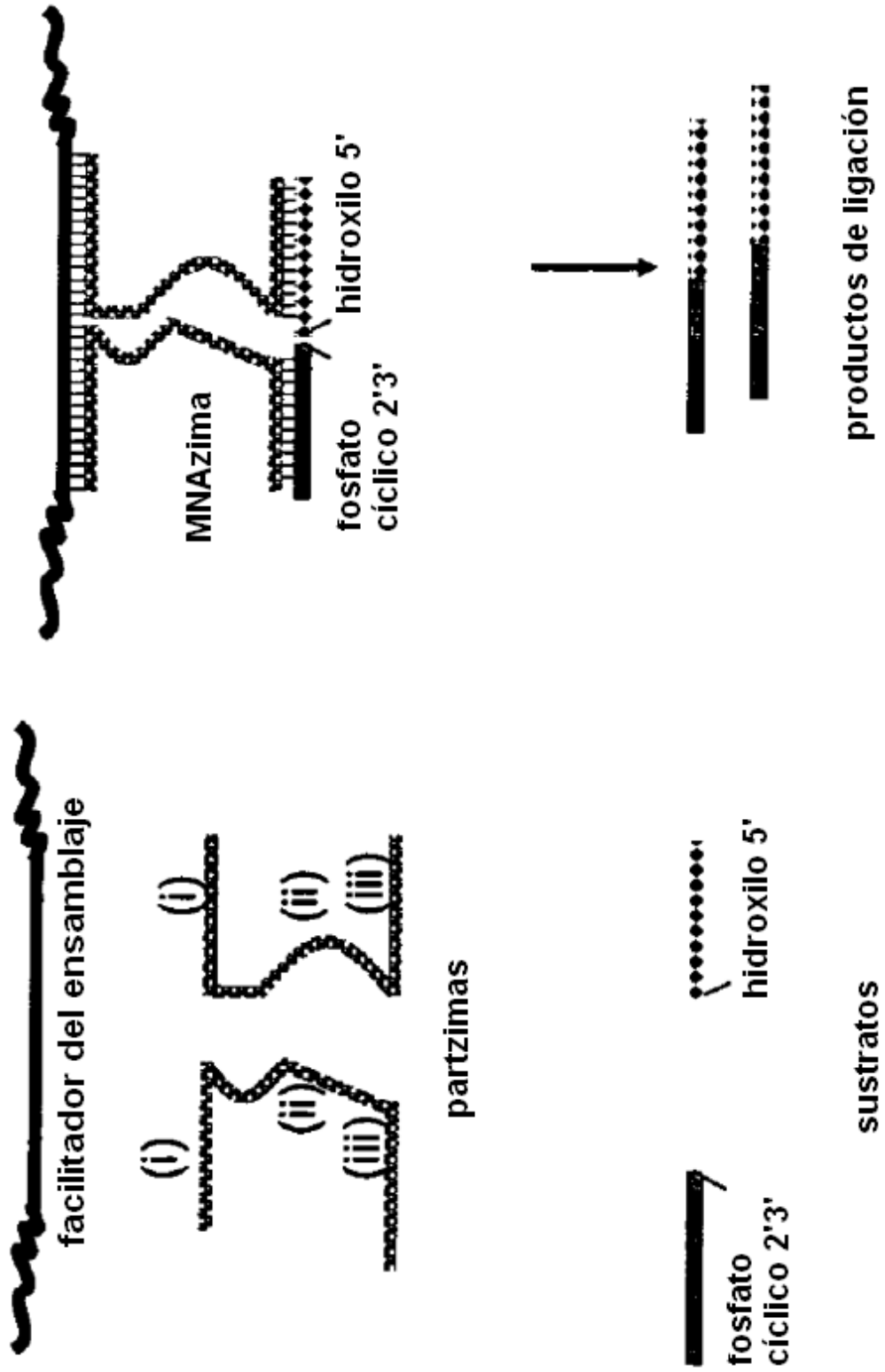
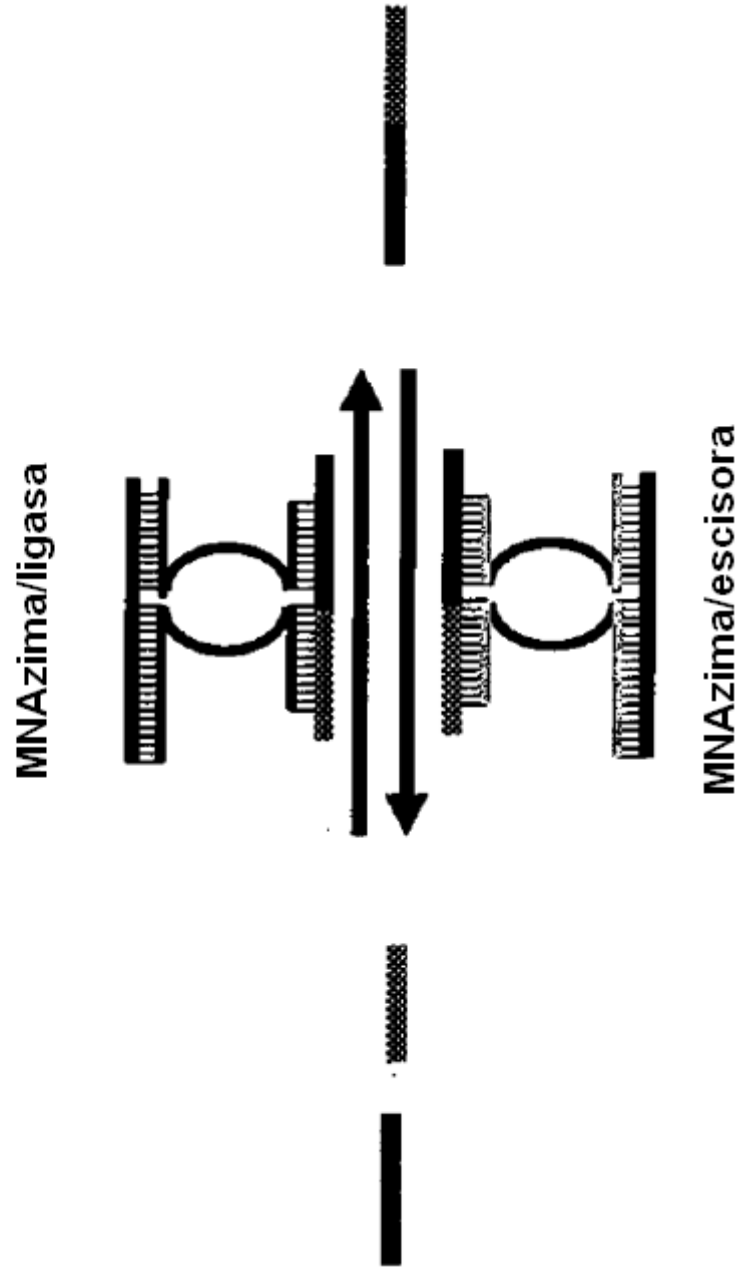
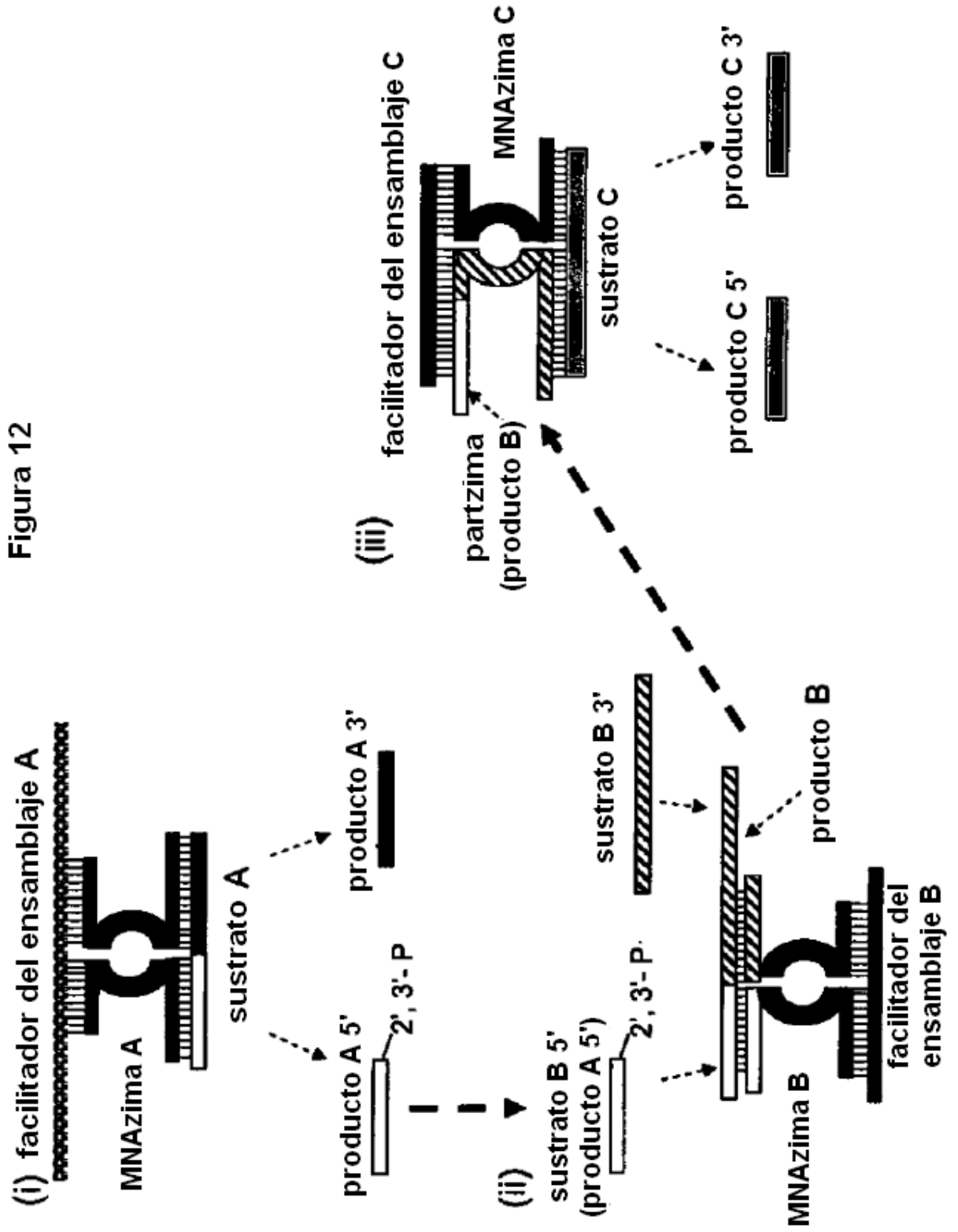


Figura 11





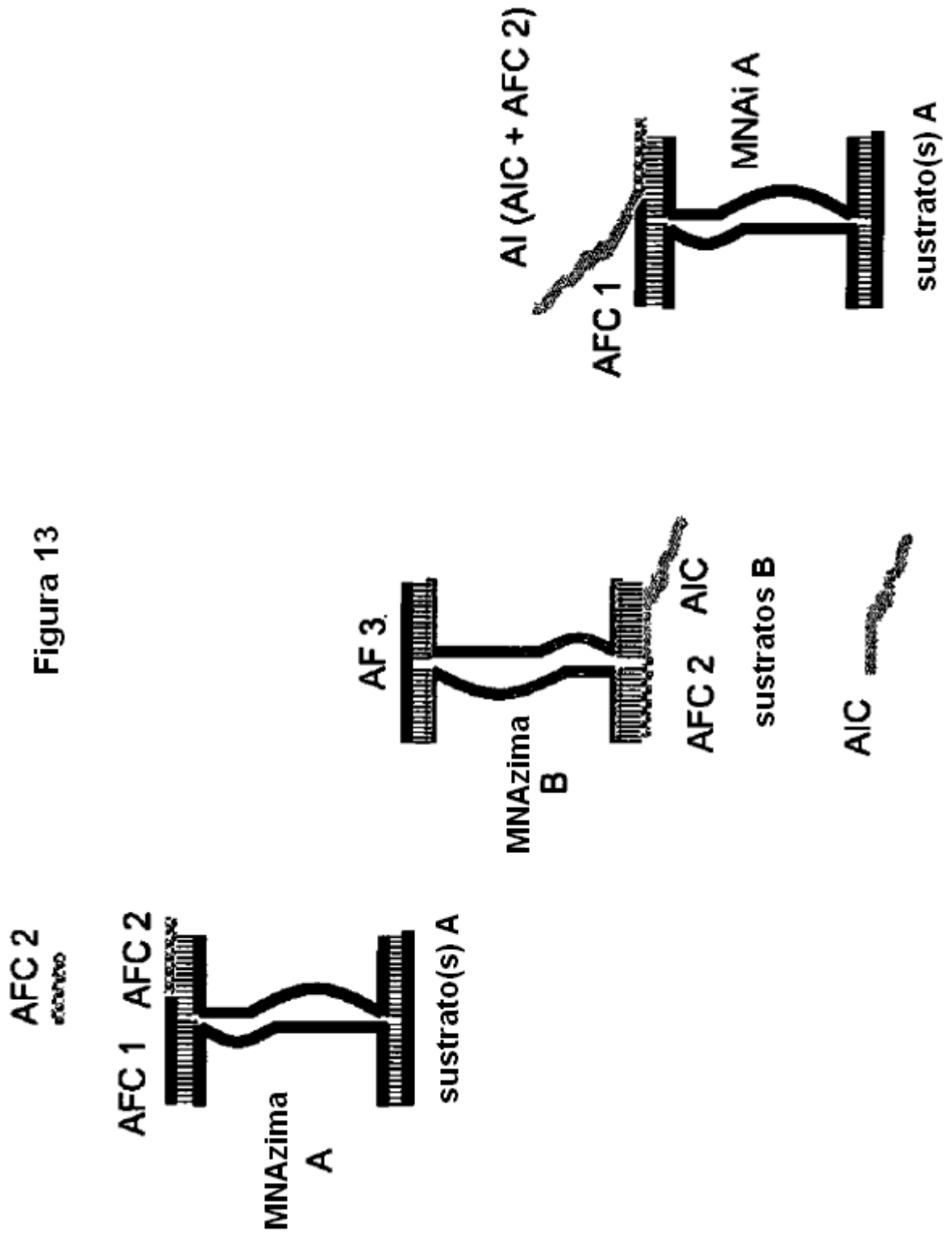


Figura 13

Figura 14

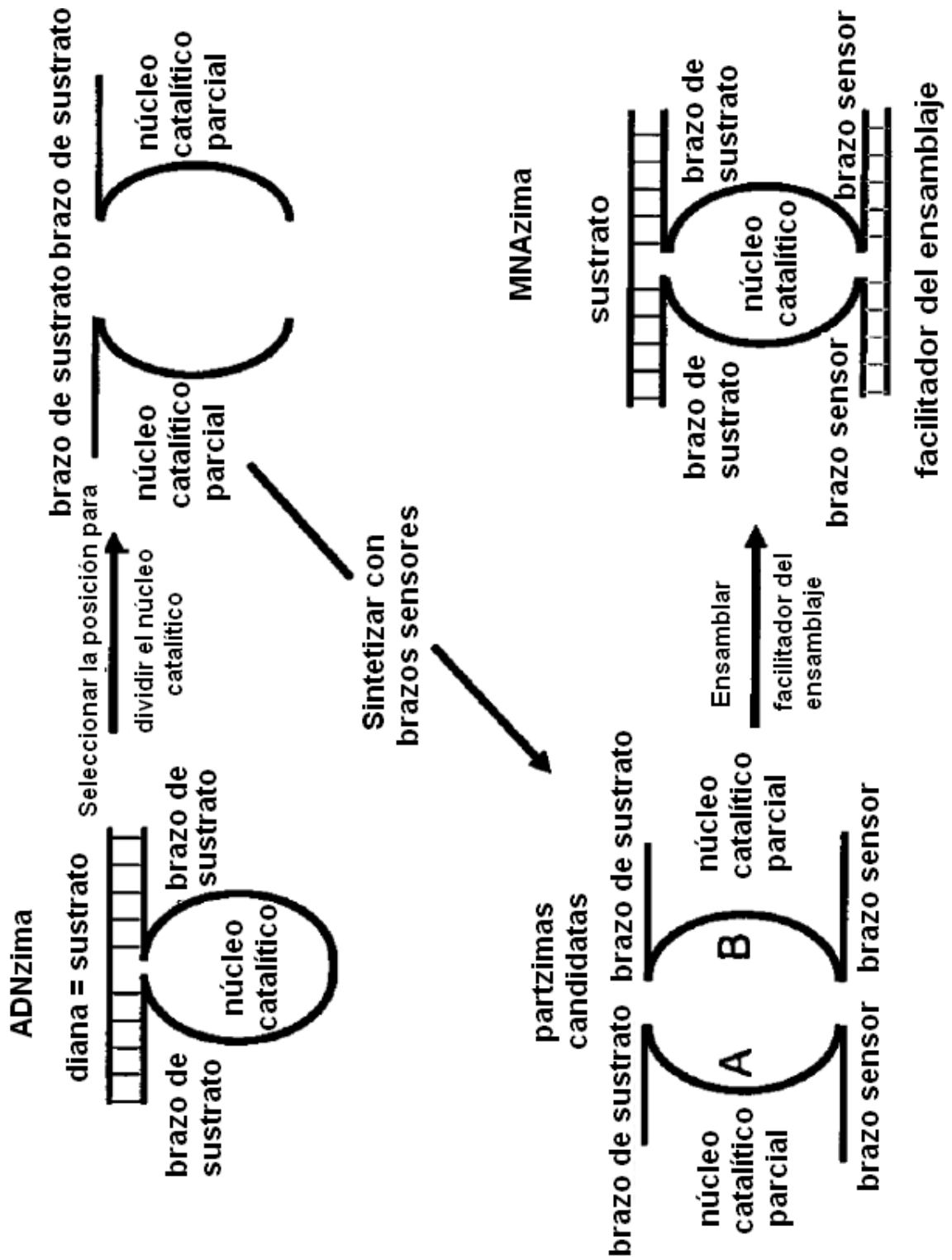


Figura 15

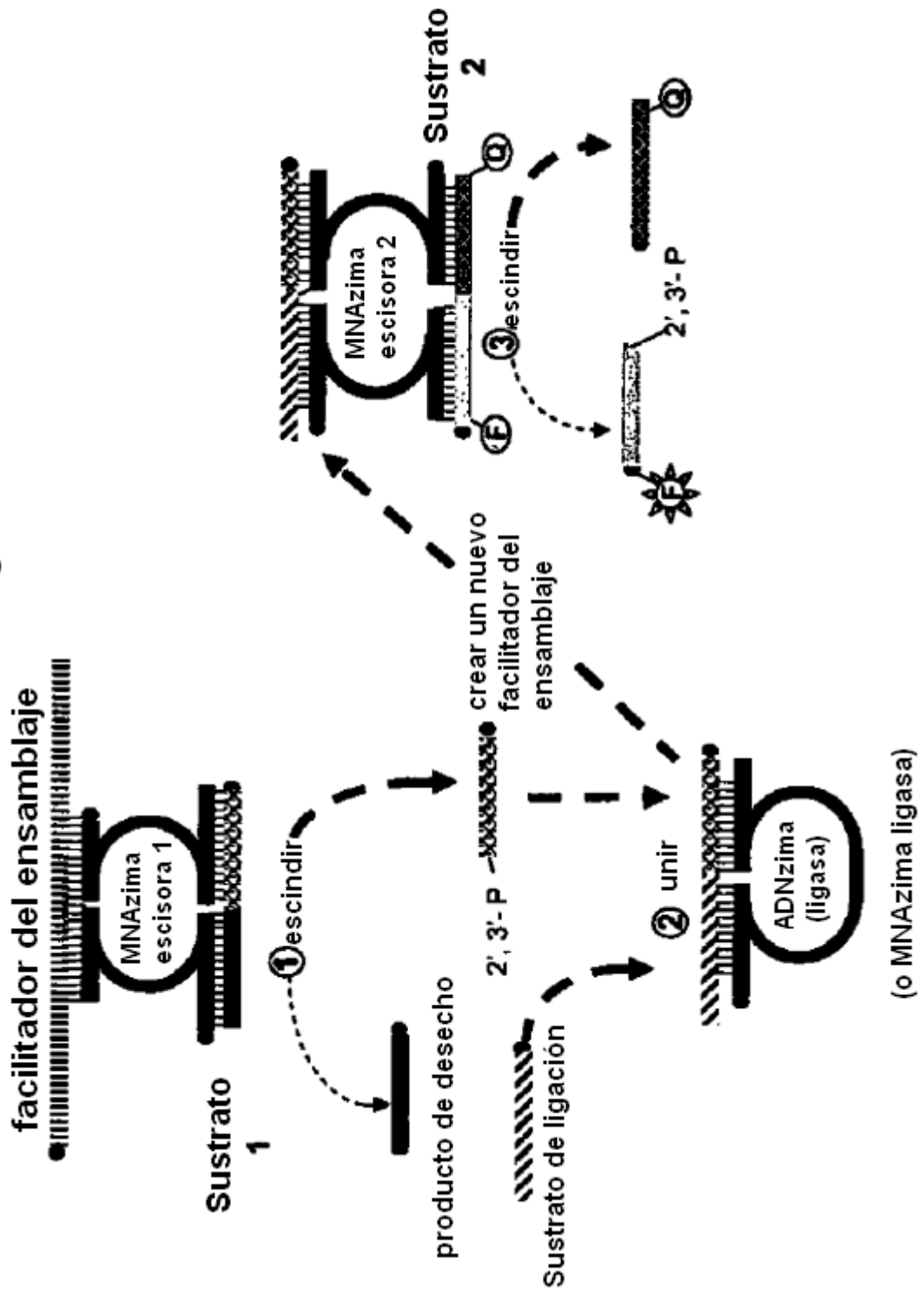


Figura 16

