

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 076**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2006 E 11167771 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2385141**

54 Título: **Enzimas de ácido nucleico de múltiples componentes y métodos para su uso**

30 Prioridad:

07.10.2005 US 724567 P

13.10.2005 US 726291 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2013

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:

**MOKANY, ELISA;
BIRKETT, DONALD JOHN;
TODD, ALISON VELYIAN y
DOAN, TRAM BICH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 076 T3

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

Descripción

Enzimas de ácido nucleico de múltiples componentes y métodos para su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a ácidos nucleicos catalíticos de múltiples componentes y a métodos para su uso. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones que comprenden enzimas de ácido nucleicos de múltiples componentes de autoensamblaje, a métodos para preparar tales composiciones, y a métodos para usar tales composiciones, que incluyen la detección, identificación y/o cuantificación de dianas tales como facilitadores del ensamblaje y otras entidades mediante la detección de la modificación catalítica de los sustratos por dichas enzimas de ácidos nucleicos de múltiples componentes.

10 Antecedentes de la invención

Diversas publicaciones, que pueden incluir patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos, se citan a lo largo de la memoria descriptiva entre paréntesis, y las citas completas de cada uno se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva.

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

20 En particular, se han caracterizado ADNzimas y ribozimas que escinden específicamente distintas secuencias de ácidos nucleicos después de la hibridación a través de emparejamiento de bases de Watson y Crick. Las ADNzimas son capaces de escindir moléculas ya sea de ARN (Breaker y Joyce, 1994; Santoro y Joyce, 1997) ya sea de ADN (Carmi *et al.*, 1996). Las moléculas de ARN catalíticas (ribozimas) también son capaces de escindir tanto secuencias de ARN (Haseloff y Gerlach, 1988) como de ADN (Raillard y Joyce, 1996). La velocidad de escisión catalítica de la mayoría de las enzimas de ácidos nucleicos depende de la presencia y concentración de iones metálicos divalentes tales como Ba²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, y Pb²⁺ (Santoro y Joyce, 1998; Brown *et al.*, 2003).

25 Los ácidos nucleicos catalíticos, tales como la ribozima cabeza de martillo y las ADNzimas 10:23 y 8:17, tienen múltiples dominios. Éstos tienen un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios de unión al sustrato no conservados ("brazos" de hibridación), que son regiones de secuencia que se unen específicamente al sustrato. Haseloff y Gerlach diseñaron la ribozima cabeza de martillo, que fue llamada así por la estructura tallo-bucle que mantiene los dos dominios conservados juntos formando el núcleo catalítico (Haseloff y Gerlach, 1988). Las ADNzimas "10:23" y "8:17" son capaces de escindir sustratos de ácidos nucleicos en enlaces fosfodiéster de ARN específicos (Santoro y Joyce, 1997). La ADNzima 10:23 tiene un dominio catalítico de 15 desoxinucleótidos flanqueado por dos brazos de reconocimiento del sustrato. La ADNzima 8:17 tiene un dominio catalítico de 14 desoxinucleótidos que también está flanqueado por dos brazos de reconocimiento del sustrato.

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

35 Se ha demostrado que los ácidos nucleicos catalíticos toleran solo ciertas modificaciones en la zona que forma el núcleo catalítico (Perreault *et al.*, 1990; Perreault *et al.*, 1991; Zaborowska *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2004; Silverman, 2004). Los ejemplos de las secuencias responsables de la actividad catalítica de las ADNzimas se enumeran en la Tabla 1.

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

Tipo de ADNzima	Secuencia de la ADNzima	Secuencia del sustrato
8:17	$(N)_xTNNNAGCNNNWCGK(N)_x$	$(N')_x(RN)_xG(N')_x$
10:23	$(N)_xGGMTMGHNDNNNMGD(N)_x$	$(N')_xrR rY(N')_x$

N = A, C, T, G o cualquier análogo; N' = cualquier nucleótido complementario a N; $(N)_x$ o $(N')_x$ = cualquier número de nucleótidos; W = A o T, K = A, G o AA; rN = cualquier base ribonucleotídica; $(RN)_x$ = cualquier número de ribonucleótidos; RR = A o G; rY = C o U, M = A o C, H = A, C o T; D = G, A o T

5 Se ha intentado en ciertas condiciones la sustitución de ciertos desoxirribonucleótidos por ciertos ribonucleótidos en ribozimas conocidas (McCall et al., 1992). Las ribozimas que se han convertido completamente en ADN no tienen actividad debido a las diferencias conformacionales de ARN y ADN (Perreault et al., 1990). Estos estudios demuestran que las enzimas de ARN no pueden modificarse a enzimas de ADN que funcionan por simple sustitución de ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos.

10 Se han realizado algunos estudios que intentaron desarrollar ciertas ribozimas homodiméricas o heterodiméricas para aplicaciones terapéuticas (Kuwabara et al, 1999; Kuwabara et al, 2000; Oshima et al, 2003). En esos estudios, el núcleo catalítico de la ribozima comprendía únicamente ribonucleótidos. Por otra parte, no se ha considerado la capacidad de que las ADNzimas funcionen en formatos diméricos o multiméricos, ni se ha proporcionado ninguna información en cuanto a cómo extrapolar de una ribozima dimérica una ADNzima dimérica en términos de una posible estructura de una ADNzima dimérica y de la actividad resultante .

15 Se han utilizado ácidos nucleicos catalíticos combinados con protocolos de amplificación *in vitro* como medio de generar una señal detectable, permitiendo de ese modo el seguimiento en tiempo real de las secuencias diana de ácido nucleico amplificadas (Todd et al., 2000) (Patente de los Estados Unidos 6.140.055; Patente de los Estados Unidos 6.201.113; documento WO 99/45146; documento PCT/IB99/00848; documento WO 99/50452). La detección de zimógeno (Patente de los Estados Unidos 6.140.055; Patente de los Estados Unidos 6.201.113; documento WO 99/45146; documento PCT/IB99/00848; documento WO 99/50452), también conocida en la técnica como detección DzyNA (Todd et al., 2000), da como resultado la amplificación concurrente de la diana y la señal. Esto se produce porque las ADNzimas o ribozimas catalíticas co-amplifican junto con las secuencias diana para producir amplicones que funcionan como verdaderas enzimas susceptibles de recambio múltiple. Como tal, cada amplicón de ácido nucleico catalítico escinde múltiples sustratos informadores. Las ADNzimas y ribozimas se introducen en los amplicones mediante el uso de cebadores con etiquetas 5' que son secuencias antisentido, inactivas de ácidos nucleicos catalíticos. Cuando estas secuencias se copian durante la amplificación *in vitro* las secuencias efectoras catalíticamente activas se co-amplifican junto con secuencia diana. El enfoque de zimógeno/DzyNA es muy flexible, puesto que la amplificación de la señal catalítica puede estar vinculada a métodos de amplificación de la diana incluyendo, métodos de amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), amplificación por desplazamiento de la hebra ("SDA"), o amplificación por círculo rodante ("RCA"), producción de amplicones de ADNzima; y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico ("NASBA"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR"), o amplificación mediada por transcripción ("TMA") que producen amplicones de ribozima. Además, puesto que se han descubierto o desarrollado numerosas moléculas de ácidos nucleicos catalíticos con una amplia gama de actividades catalíticas, el enfoque de zimógeno puede utilizar un sustrato informador que no sea un ácido nucleico, donde la lectura del análisis depende de una modificación química que no sea la escisión de un sustrato de ácido nucleico. El enfoque de zimógeno/DzyNA (Todd et al., 2000) o NASBA/ribozima (documento WO 00/58505) puede ser considerado sensible y útil, pero existe la posibilidad de ruido debido a la amplificación de secuencias de cebadores.

40 Se ha utilizado NASBA para producir amplicones de ARN que contienen ácido nucleico diana y una sección del núcleo catalítico de la ribozima cabeza de martillo (Gaara), introducida como secuencia antisentido etiquetada a un cebador y a continuación copiada (documento WO 00/58505). La secuencia adicional requerida para la actividad catalítica (CURNrGrA) se introdujo como secuencia efectora en una segunda molécula, que se había marcado con un fluoróforo y un extintor, y que también servía como sustrato informador. Algunas de las bases de ribonucleótidos (rN más arriba) deben permanecer como ribonucleótidos, o la actividad de la ribozima catalítica se pierde. Dos moléculas que consisten enteramente en ADN se consideraron incapaces de formar enzimas heterodiméricas catalíticamente activas (documento WO 00/58505).

45 Los ácidos nucleicos catalíticos también se han utilizado para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido ("SNP"). El requerimiento estricto del emparejamiento de bases de Watson y Crick entre los brazos de unión de los ácidos nucleicos catalíticos y el sustrato ha permitido el desarrollo de métodos que permiten la discriminación de secuencias cortas estrechamente relacionadas. Se ha demostrado que las ADNzimas y ribozimas discriminan entre

dos secuencias que difieren en tan poco como una sola base (Cairns et al., 2000) (documento WO 99/50452).

Las ADNzimas tienen propiedades que proporcionan ventajas sobre las ribozimas para algunas aplicaciones *in vitro*. El ADN es inherentemente más estable que el ARN y por lo tanto es más robusto con una vida útil más larga. El ADN se puede almacenar durante largos períodos a temperatura ambiente, ya sea en disolución o en forma liofilizada. Las ADNzimas también son preferibles sobre la mayoría de las enzimas de proteínas en ciertas aplicaciones porque, por ejemplo, no son desnaturalizadas irreversiblemente por la exposición a altas temperaturas durante la amplificación.

Por lo tanto, existe una necesidad continua en la técnica de métodos simples, rápidos, y de coste eficaz para la detección, identificación y cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos y otras entidades, que proporcionan preferiblemente ácidos nucleicos catalíticos basados en ADNzimas y/o ribozimas.

En la publicación internacional WO 03/089650 se dan a conocer sensores moleculares novedosos, incluyendo sensores de ácido nucleico de múltiples componentes y Halfzimas, que utilizan constructos de ácido nucleico enzimáticos cuya actividad puede ser modulada por la presencia o ausencia de diversos agentes de señalización.

Kossen et al, 2004, describen una "hemi"-ribozima ligasa que se activa de manera similar por tres oligonucleótidos no estructurados, que representan las principales variantes de secuencia de una diana de la región 5' no traducida (5'-UTR) del virus de la hepatitis C, y por un ARN estructurado que corresponde a la totalidad de la 5'-UTR.

Vaish et al, 2003, describen una estrategia para la detección ultrasensible de ácidos nucleicos utilizando "hemi" ribozimas que están desprovistas de actividad catalítica a menos que se complementen con un ácido nucleico diana que actúa en trans.

Compendio de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje de MNAzima para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada uno de dichos al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor;

en donde tras el autoensamblaje, la porción del brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos sensores de la MNAzima, la porción del brazo para el sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos para el sustrato de la MNAzima y la porción del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como un núcleo catalítico de la MNAzima;

y en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con dicho facilitador del ensamblaje de MNAzima a fin de mantener el primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de modificar al menos un sustrato, y en donde dichos brazos para el sustrato de dicha MNAzima establecen contacto con un sustrato de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede modificar dicho sustrato.

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

El facilitador del ensamblaje puede ser una diana a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico se puede seleccionar del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y primicroARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos. El ARN ribosomal puede ser ARN ribosomal 16S.

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

El ácido nucleico puede ser amplificado. La amplificación puede comprender una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

La composición puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que actúa para estabilizar al menos una de dichas porciones del brazo para el sustrato o porciones del brazo sensor.

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

Las porciones del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico se pueden seleccionar del grupo que comprende los SEC ID NO: 149 -153, 155 -157, 159 y 161, y las porciones del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico se pueden seleccionar del grupo que comprende los SEC ID NO: 166 -170 y 172.

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

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

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

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

20 El sustrato puede comprender un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, un análogo de ácido nucleico, un ácido péptidonucleico, un ácido nucleico bloqueado, una quimera de ácido péptidonucleico, o cualquier combinación de los mismos. La proteína puede comprender al menos uno de un anticuerpo, un polipéptido, una glicoproteína, una lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos. El sustrato puede comprender adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula, o una combinación de las mismas. El sustrato puede estar unido a un soporte insoluble o estar libre en disolución. El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.

30 Los brazos para el sustrato pueden establecer contacto con dicho sustrato a través del emparejamiento de bases complementarias.

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

40 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador del ensamblaje o dicho sustrato se puede seleccionar del grupo que comprende ADN, ARN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido peptidonucleico, o una combinación de los mismos. El facilitador del ensamblaje y dicho sustrato pueden comprender ácidos nucleicos que son completamente o parcialmente complementarios a al menos parte de dichos primer o segundo componentes oligonucleotídicos. Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador del ensamblaje o dicho sustrato puede comprender al menos una sustitución o adición de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2'-O-metilcitidina tiouridina, 5-carboximetilaminometilo, dihidrouridina, 2'-O-metilpseudouridina, betaD-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, betaD-manosilmetiluridina, 5-metoxicarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metilpurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosil-purina-6-il)-N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico de ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético (v), wibutóxosina, 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, betaD-arabinosiluridina, betaD-arabinosilimidina.

La composición puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje

adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, en donde cada uno de dichos al menos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos comprende una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor;

5 en donde tras el autoensamblaje de al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico, la porción del brazo sensor de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman los brazos sensores de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, la porción del brazo para el sustrato de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman los brazos para el sustrato de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y la porción del núcleo catalítico de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional;

10 y en donde los brazos sensores de dicha al menos una MNAzima adicional interactúan con dicho al menos un facilitador del ensamblaje adicional con el fin de mantener dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones de núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional, dicho núcleo catalítico capaz de actuar sobre al menos un sustrato adicional, y en donde los brazos para el sustrato de dicha al menos una MNAzima adicional establecen contacto con al menos un sustrato adicional de manera que el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional puede actuar sobre dicho al menos un sustrato adicional.

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

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

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

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

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

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

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

35 El facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico se puede seleccionar 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 codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos. El ARN ribosomal puede ser ARN ribosomal 16S.

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

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

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

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

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

El método puede comprender adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que entra en

contacto con al menos una porción de cualquiera o ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos para el autoensamblaje de la MNAzima. El tercer componente oligonucleotídico puede estar compuesto de más de molécula.

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

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

10 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

(c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:

15 (1) el autoensamblaje de dicha al menos una primera MNAzima y

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

(d) detectar dicho efecto detectable.

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

20 El facilitador del ensamblaje puede ser una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar. La diana puede comprender un ácido nucleico. El ácido nucleico se puede seleccionar del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos. El ARN ribosomal puede ser ARN ribosomal 16S.

25 La fuente del ácido nucleico se puede seleccionar del grupo que comprende una fuente sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de los mismos.

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

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

35 El método puede comprender adicionalmente la detección de dicho efecto detectable durante o después de dicha amplificación. El efecto detectable puede ser indicativo de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje. El efecto detectable puede medirse cuantitativa o cualitativamente.

40 El sustrato puede ser un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido peptidonucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido peptidonucleico, o cualquier combinación de los mismos. La proteína comprende al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glicoproteína, lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos. El sustrato puede comprender adicionalmente al menos uno de una nanopartícula o micropartícula o combinación de los mismos. El sustrato puede estar unido a un soporte insoluble o estar libre en disolución.

45 El sustrato puede comprender un ácido nucleico y dichos brazos para el sustrato pueden establecer contacto con dicho sustrato a través del emparejamiento de bases complementarias.

50 El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación del sustrato por la MNAzima, un efecto detectable proporcionado por la porción detectable aumenta o se reduce. El efecto detectable puede detectarse por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

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

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

El método puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, dichos al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje adicional para formar al menos una
10 MNAzima catalíticamente activa adicional, y

en donde al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado por la MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.

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

15 Al menos uno de cada sustrato adicional puede estar unido a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanecen unidas al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.

Un sustrato adicional puede estar unido a al menos un soporte insoluble de manera que se produce un efecto detectable cuando ese sustrato es modificado por su respectiva MNAzima.

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

(a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de dicha diana para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima); y en donde al menos uno de dicho primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprenden adicionalmente al menos una porción de aptámero;
25

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

(1) unión de dicha diana a dichas porciones de aptámero y

(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

30 (c) determinar la presencia de la actividad catalítica de la MNAzima, en donde la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

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

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

La diana puede ser identificada, detectada o cuantificada.

35 El método puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, dichos al menos tercer y al menos cuarto componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos una diana adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional

40 y en donde al menos uno de dichos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos comprenden al menos una porción de aptámero adicional que se une a dicha al menos una diana adicional.

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

45 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje y dicha al menos una diana para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima); y en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un facilitador del ensamblaje comprenden adicionalmente al menos un aptámero o una porción del mismo y en donde dicha diana es susceptible de unirse a dicho al menos un aptámero o porción del mismo;

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

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

(1) la unión de dicha diana a dicho al menos un aptámero o porción del mismo y

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

5 (3) la eliminación de dicha inhibición de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa, y

(d) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha MNAzima, en donde la presencia de dicha actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

10 La al menos una diana puede ser seleccionada del grupo que comprende proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos.

Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje o inhibidor pueden estar unidos a un soporte insoluble.

15 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, aptámero o porción de aptámero pueden comprender adicionalmente dicho inhibidor.

Al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o facilitador del ensamblaje puede comprender, adicionalmente, una porción de secuencia de auto-complementaria capaz de formar una estructura en horquilla. La estructura en horquilla puede inhibir el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa.

20 El aptámero o porción del mismo pueden estar compuestos de al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.

La inhibición del autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa puede eliminarse tras el contacto de dicho aptámero o porción de aptámero con la diana.

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

25 El inhibidor se puede seleccionar del grupo que comprende ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido nucleico peptídico, o una combinación de los mismos.

30 El método puede comprender adicionalmente proporcionar un sustrato que puede ser modificado por dicha MNAzima para proporcionar un efecto detectable. La modificación se puede seleccionar del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida. El sustrato puede no estar modificado por dichos primer o segundo componentes oligonucleotídicos individualmente o por dichos ambos primer y segundo componentes oligonucleotídicos en ausencia de dicho facilitador del ensamblaje y dicha diana.

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

El sustrato puede comprender adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula o combinación de los mismos.

40 La detección del efecto detectable puede ser indicativa de dicha actividad catalítica de dicha MNAzima catalíticamente activa y en donde dicha actividad catalítica es indicativa de dicha diana. El efecto detectable se puede medir cuantitativa o cualitativamente. El efecto detectable se puede detectar por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, 45 fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.

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

- (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje y dicha al menos una primera diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 5 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha al menos primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
- (c) en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un primer facilitador del ensamblaje o dicho al menos un primer sustrato comprenden adicionalmente un aptámero y en donde dicha diana es capaz de unirse al menos a una porción de dicho aptámero, proporcionar al menos un primer inhibidor que es capaz de inhibir dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa en ausencia de dicha diana;
- 10 (d) poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador del ensamblaje, dicho sustrato y dicho inhibidor con una muestra que contiene supuestamente dicha diana en condiciones que permiten:
- 15 (1) la unión de dicha diana a dicho aptámero y
- (2) la eliminación de dicha inhibición de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa
- (3) la actividad catalítica de la MNAzima; y
- (e) determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicha diana.
- Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador del ensamblaje puede estar constituido por ADN o un análogo del mismo.
- 20 El aptámero, o porción del mismo, se puede unir a una diana seleccionada del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, pequeños moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porciones o combinaciones de los mismos.
- 25 Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, sustrato, o inhibidor puede estar unido a un soporte insoluble.
- Al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, aptámero o porción de aptámero puede comprender adicionalmente dicho inhibidor.
- 30 El aptámero o porción del mismo puede estar compuesto de al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.
- Al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje o el sustrato puede comprender, adicionalmente, una porción de secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla. La estructura en horquilla puede inhibir el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa. La inhibición del autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa puede eliminarse tras el contacto de dicho aptámero o porción de aptámero con la diana.
- 35 El inhibidor puede ser capaz de unirse a al menos uno del grupo que comprende dicho aptámero o porción del mismo. El inhibidor se puede seleccionar del grupo que comprende ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptid nucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido peptid nucleico, o una combinación de los mismos.
- 40 El sustrato puede comprender un ácido nucleico o una proteína. El ácido nucleico puede comprender al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido peptid nucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido peptid nucleico, o cualquier combinación de los mismos. La proteína puede comprender al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glicoproteína, lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos.
- 45 El sustrato puede comprender adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula o combinación de los mismos.
- La detección de dicho efecto detectable puede detectar la presencia de dicha diana. El efecto detectable se puede medir cuantitativa o cualitativamente. El efecto detectable se puede detectar por espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 50

El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable. La modificación se puede seleccionar del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

5 El método puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, en donde dichos al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje adicional y al menos una diana adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa menos adicional, y

10 en donde al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado por la MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona un efecto detectable adicional;

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

15 en donde al menos una molécula inhibidora adicional entra en contacto con una porción de dicho aptámero adicional, inhibiendo de ese modo dicho autoensamblaje de dicha MNAzima adicional catalíticamente activa en ausencia de dicha diana adicional; y

en donde dicho al menos un facilitador del ensamblaje entra en contacto con al menos una porción de dichos componentes oligonucleotídicos adicionales.

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

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

Al menos uno de cada sustrato adicional puede estar unido a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanece unida al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.

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

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

30 (b) proporcionar al menos un sustrato, dicho sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

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

(1) el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa, y

35 (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y

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

40 La variante de secuencia se puede seleccionar del grupo que comprende polimorfismos de un único nucleótido, polimorfismos de múltiples nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, variantes de secuencia por desplazamiento del marco, variantes de secuencia sin sentido, o cualquier combinación de los mismos. La variante de secuencia puede estar presente en ADN o ARN.

Cualquiera o ambos de dicho primer componente oligonucleotídico y dicho segundo componente oligonucleotídico pueden estar compuestos de más de una molécula.

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

50 El autoensamblaje de la enzima de ácido nucleico de múltiples componentes puede requerir el contacto de al menos una porción de cualquiera o de ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos con el ácido nucleico que comprende dicha secuencia variante.

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

10 El efecto detectable se puede detectar por medio de espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

15 El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.

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

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

El método puede comprender adicionalmente

20 (a) proporcionar al menos un tercer componente oligonucleotídico y al menos un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos una variante de la secuencia de ácido nucleico adicional para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa adicional (MNAzima);

25 (b) poner en contacto dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente, al menos, una variante de la secuencia de ácido nucleico adicional en presencia de al menos un sustrato adicional susceptible de ser modificado por dicha al menos una MNAzima adicional, en donde dicha modificación de dicho al menos un sustrato adicional proporciona al menos un efecto detectable adicional en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de al menos una MNAzima, y

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

(c) detectar dicho al menos un efecto detectable adicional, detectando de ese modo la presencia de dicha al menos una variante de secuencia adicional.

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

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

35 El método puede comprender adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene dicho sustrato unido al mismo.

Al menos uno de cada sustrato adicional puede estar unido a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanece unida al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.

40 De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia de una variante de secuencia de un ácido nucleico que comprende

45 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico susceptibles de autoensamblaje en presencia de un ácido nucleico para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

(b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene que supuestamente el ácido nucleico, en presencia de al menos un primer sustrato modificable por dicha al menos una primera MNAzima, en donde el sustrato comprende una porción detectable capaz de proporcionar al menos un primer efecto detectable tras la modificación del sustrato por dicha al menos una primera MNAzima en condiciones que permiten:

50

(1) el autoensamblaje de la MNAzima y

(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

(c) en donde la ausencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de una variante de secuencia en dicho ácido nucleico.

5 De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia de al menos un ácido nucleico metilado que comprende

10 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se auto-ensamblan en presencia de ácido nucleico metilado para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

(b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona al menos un primer efecto detectable;

15 (c) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente el ácido nucleico metilado en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de la MNAzima catalíticamente activa, y

(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

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

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

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

La fuente de dicho ácido nucleico metilado se puede seleccionar del grupo que comprende una fuente sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de los mismas.

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

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

El método puede comprender adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos uno de dicho sustrato o dichos primer o segundo componentes oligonucleotídicos, o una combinación de los mismos unidos allí.

35 El efecto detectable se puede detectar mediante espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

El sustrato puede comprender una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.

40 La modificación se puede seleccionar del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

45 El método puede comprender adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, en donde dichos al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un ácido nucleico metilado adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y

en donde al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado por dicha MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.

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

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

Al menos uno de dicho sustrato adicional puede estar unido a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable adicional y una porción extintora adicional del sustrato adicional permanece unida al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.

- 5 De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de al menos un facilitador del ensamblaje que utiliza una cascada de amplificación que comprende
- (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 10 (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un primer sustrato unido al mismo, dicho primer sustrato es susceptible de ser modificado por dicha MNAzima, en donde dicho primer sustrato comprende al menos una tercera molécula que comprende al menos una primera enzima catalíticamente activa que es liberada tras modificación de dicho primer sustrato por dicha primera MNAzima;
- 15 (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho facilitador del ensamblaje, en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dicho primer sustrato unido al mismo en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de dicha MNAzima y
- (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y
- 20 (d) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un segundo sustrato unido al mismo, dicho segundo sustrato escindible por dicha primera enzima catalíticamente activa en donde dicho segundo sustrato comprende al menos una cuarta molécula que comprende al menos un radical detectable que es liberado tras la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima; y
- 25 (e) en donde dicha primera enzima catalíticamente activa modifica una pluralidad de dicho segundo sustrato liberando de este modo una pluralidad de radicales detectables;
- (f) en donde dichos restos detectables son detectables después de la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima catalíticamente activa, y;
- (g) en donde la detección de dichos radicales detectables es indicativa de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje.
- 30 Los radicales detectables pueden comprender, adicionalmente, una segunda enzima catalíticamente activa adicional capaz de modificar dicho primer sustrato liberando de este modo la enzima catalíticamente activa adicional. Al menos una de dicha primera o dicha segunda enzima catalíticamente activa se puede seleccionar del grupo que comprende MNAzimas, ADNzimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleasas de restricción, exonucleasas, proteasas, proteinasas, hidrolasas, liticasas, peptidasas, dipeptidasas, esterases, caspasas, catepsinas, desulfidrasas, amidasas, glicosidasas.
- 35 El facilitador del ensamblaje puede comprender una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar. La diana se puede seleccionar del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquiera de sus derivados, porciones o combinaciones. El ácido nucleico se puede seleccionar 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 codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos.
- 40 De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la detección de una diana utilizando una cascada de amplificación de la señal mediada por MNAzima que comprende
- 45 (a) proporcionar un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de dicha diana para formar una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 50 (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene un primer y un segundo sustrato unidos al mismo, dichos primer y segundo sustratos son susceptibles de ser modificados por dicha primera MNAzima, en donde dichos primer y segundo sustratos comprenden al menos un tercer y un cuarto componentes oligonucleotídicos, respectivamente, capaces de formar una segunda MNAzima catalíticamente activa, en donde dichos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos se liberan tras la modificación de dichos

primer y segundo sustratos por dicha primera MNAzima;

5 (c) proporcionar dicho soporte insoluble que tiene un tercer y un cuarto sustrato anclados al mismo, dichos tercer y cuarto sustratos son susceptibles de ser modificados por dicha segunda MNAzima, en donde dichos tercer y cuarto sustratos comprenden al menos un quinto y un sexto componentes oligonucleotídicos, respectivamente, capaces de formar una tercera MNAzima catalíticamente activa, en donde dicho quinto y dicho sexto componentes oligonucleotídicos se liberan tras la modificación de dichos tercer y cuarto sustratos por dicha segunda MNAzima, y;

(d) proporcionar un facilitador del ensamblaje capaz de facilitar el ensamblaje de dicha segunda y dicha tercera MNAzima, y;

10 (e) proporcionar un quinto sustrato que es susceptible de ser modificado por dicha segunda MNAzima para proporcionar un efecto detectable;

15 (f) poner en contacto dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicha diana, en presencia de dicho facilitador del ensamblaje, y en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dichos primer, segundo, tercer y cuarto sustratos unidos al mismo en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dichas primera, segunda y tercera, MNAzimas, y

(2) la actividad catalítica de dicha primera, segunda y tercera, MNAzimas; y

20 (g) en donde dicha tercera MNAzima modifica dichos primer y segundo sustratos proporcionando de ese modo adicionalmente dicha segunda MNAzima en donde dicha segunda MNAzima modifica adicionalmente al menos uno de dichos tercer, cuarto y quinto sustratos proporcionando de ese modo adicionalmente dicha tercera MNAzima proporcionando de ese modo adicionalmente dicho efecto detectable, y;

(h) en donde la detección de dicho efecto detectable es indicativa de la presencia de dicha diana.

25 La diana se puede identificar, detectar o cuantificar. La diana se puede seleccionar del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, porciones o combinaciones de los mismos. El ácido nucleico se puede seleccionar 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 codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

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

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

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

De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la fabricación de una pluralidad de enzimas de ácidos nucleicos de múltiples componentes (MNAzimas) que reconocen cada una al menos un facilitador del ensamblaje y modifican un sustrato, comprendiendo el método:

40 (a) proporcionar una pluralidad de facilitadores del ensamblaje que se van a identificar, detectar o cuantificar,

45 (b) diseñar dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada uno de los al menos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprende una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor,

50 en donde tras el autoensamblaje, la porción del brazo sensor de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman los brazos sensores de la MNAzima, la porción del brazo para el sustrato de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman los brazos para el sustrato de la MNAzima, y la porción del núcleo catalítico de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de la MNAzima;

y en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con un facilitador del ensamblaje a fin de

mantener los primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de actuar sobre al menos un sustrato, y en donde los brazos para el sustrato de la MNAzima establecen contacto con un sustrato de manera que el núcleo catalítico de la MNAzima puede modificar dicho sustrato;

(c) alterar dichos dos o más componentes oligonucleotídicos de manera que la porción del brazo para el sustrato y la porción del núcleo catalítico de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos es constante, y la porción del brazo sensor de al menos uno de los primer y segundo componentes oligonucleotídicos está adaptada para reconocer otro de la pluralidad de facilitadores del ensamblaje, y

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

De acuerdo con un decimotercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar la presencia de una pluralidad de dianas que comprende una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas que corresponden cada una a al menos una de una pluralidad de dianas, y al menos un sustrato.

De acuerdo con un decimocuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para el ensamblaje de una pluralidad de MNAzimas que comprende una pluralidad de facilitadores del ensamblaje, una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas que corresponden cada una a cada uno de la pluralidad de facilitadores del ensamblaje, y al menos un sustrato.

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

Breve descripción de los dibujos

Una realización preferida de la presente invención se describirá a continuación, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en donde:

Figura 1: Diseño de una MNAzima: se muestra una representación de un diseño ilustrativo de una MNAzima, en donde porciones del brazo para el sustrato (A) de las partzimas A y B se unen a un sustrato Informador, al que se une una etiqueta fluorescente (izquierda) y un extintor (derecha). Las porciones del núcleo catalítico (C) se encuentran entre las porciones del brazo para el sustrato (A) y partes del brazo sensor (B). Tras la unión de las porciones del brazo sensor (B) a una diana, el sustrato Informador es escindido en el Sitio de Escisión de la MNAzima, aumentando de este modo la fluorescencia.

Figura 2: Estrategias para la detección de la diana mediada por MNAzima: se muestra es un diagrama de flujo que muestra las aplicaciones ilustrativas de los métodos para la detección de la diana utilizando MNAzimas. Las MNAzimas se pueden utilizar para (1) la detección directa; (2) la detección de amplicones generados, por ejemplo, mediante PCR, SDA, LAMP, RCA, TMA, 3SR o NASBA, ya sea durante, o después de, la amplificación; y (3) el inicio una cascada de amplificación de la señal.

Figura 3: Método para la detección de dianas utilizando una MNAzima y sustratos genéricos anclados: se muestran una representación de MNAzimas ilustrativas y un método para la detección de dianas utilizando MNAzimas que escinden sustratos fijados a un soporte. En esta realización, la MNAzima se forma solo en presencia de un facilitador del ensamblaje (diana). Cuando la MNAzima escinde el sustrato fijado entre un fluoróforo y un extintor, se genera una señal. Como se muestra aquí, tras la escisión entre el fluoróforo F y el extintor Q, se produce un aumento de fluorescencia. En general, el método se puede diseñar de manera que cualquier fluoróforo F o extintor Q pueda permanecer unido al soporte una vez que se produce la escisión. Panel (i): El soporte mostrado solo tiene un sustrato fijado a él. Panel (ii): Puede haber múltiples sustratos fijados en diferentes posiciones. Cada sustrato puede ser escindido solo por una MNAzima formada en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima específica - aquí, las Dianas 1 y 2 facilitan el autoensamblaje de las MNAzimas 1 y 2 respectivamente. De este modo, en este ejemplo la MNAzima 1 solo se auto-ensambla en presencia de la Diana 1 y solo escinde el Sustrato 1. Del mismo modo, la MNAzima 2 solo se auto-ensambla en presencia de la Diana 2 y solo escinde el Sustrato 2. La señal puede ser localizada mediante el posicionamiento del sustrato en la superficie, permitiendo así la detección específica de diferentes facilitadores del ensamblaje.

Figura 4: Métodos ilustrativos para la detección de dianas: se muestran ejemplos de métodos que utilizan una MNAzima para detectar un analito diana (An), por ejemplo, incluyendo pero no limitado a una proteína o una molécula pequeña. Este ejemplo muestra la generación de una señal mediante la escisión por MNAzima de un sustrato marcado con un fluoróforo (F) y un extintor (Q). Se podían utilizar diseños generales en otros formatos, por lo que la señal se genera mediante una modificación distinta de la escisión y/o donde la lectura no es fluorescente, sino, por ejemplo, colorimétrica, radiactiva, etc. Se ilustran tres estrategias generales en esta figura. (i) Se conecta un aptámero para la unión a un analito diana a una partzima (una apta-partzima). Esta molécula tiene auto-complementariedad, y no puede contribuir al ensamblaje de la MNAzima activa en la ausencia del analito diana.

También se proporcionan una segunda partzima, un sustrato y un facilitador del ensamblaje. Cuando un analito diana específico se une al dominio del aptámero, las bases complementarias dentro de la apta-partzima se separan, lo que permite que la apta-partzima adopte una conformación por medio de la cual puede contribuir al ensamblaje de la MNAzima activa. La MNAzima activa puede escindir el sustrato y generar fluorescencia. (ii) Se conecta un aptámero para la unión a un analito diana a un facilitador del ensamblaje. Esta molécula tiene auto-complementariedad, y no puede dirigir las partzimas para alinear y ensamblar una MNAzima activa en ausencia del analito diana. También se proporcionan dos partzimas y un sustrato. Cuando un analito diana específico se une al dominio del aptámero, las bases complementarias dentro del facilitador del ensamblaje se separan, lo que permite el facilitador del ensamblaje adopte una conformación mediante la cual puede dirigir el ensamblaje de las MNAzimas activas. La MNAzima activa puede escindir el sustrato y generar fluorescencia. (iii) Se incuban dos apta-partzimas, cada una de las cuales contiene una porción de un aptámero, en presencia de un sustrato. En la ausencia de analito diana, las dos apta-partzimas no se pueden ensamblar para formar una MNAzima activa. Cuando un analito diana específico está presente, y se une a ambos dominios que contienen una porción del aptámero, las dos apta-partzimas se ponen en estrecha proximidad y se pueden ensamblar en una MNAzima activa. La MNAzima activa puede escindir el sustrato y generar fluorescencia.

Figura 5: Amplificación mediante PCR de microARN y detección utilizando MNAzimas: se muestra una representación de una estrategia con MNAzima para la amplificación y detección de secuencias cortas tales como especies micro-ARN (miR). El método utiliza un cebador 3' que se une al miR en el extremo 3' y que tiene una secuencia de extensión no relacionada (que se muestra en los recuadros discontinuos) que puede (partes (i) y (ii), Cebador en Bucle, izquierda), o no (partes (iii) y (iv), cebador Etiquetado, derecha), formar una estructura de tallo-bucle en el extremo 5'. El cebador miR 3' se extiende en presencia de transcriptasa inversa (partes (i) y (iii)), seguido de amplificación mediante PCR utilizando cebadores 5' y 3' con una secuencia específica miR en los extremos 3' y una secuencia de extensión no relacionada en los extremos 5' (partes (ii) y (iv)). Los amplicones se pueden detectar por medio de MNAzimas, que hibridan con el amplicón, incluyendo la región entre los cebadores 5' y 3'. Un requerimiento para la complementariedad estricta de los brazos sensores de la MNAzima y el ácido nucleico diana permite la discriminación de secuencias estrechamente relacionadas. F: fluoróforo; Q: extintor.

Figura 6: Detección de MNAzima acoplada a la amplificación de la señal mediada por la enzima: se muestra una representación de una MNAzima para iniciar una cascada de amplificación de la señal. En esta realización las MNAzimas desencadenan una cascada aguas abajo de generación de señal, en donde (de izquierda a derecha, panel superior) se forma una MNAzima solo en presencia de una diana y a continuación libera una enzima desde una posición fijada sobre un soporte. Como se muestra en el panel inferior, la enzima liberada escinde después una molécula de sustrato fluorescente. El sustrato fluorescente se detecta fácilmente. F: fluoróforo; Q: extintor.

Figura 7: Detección de analitos utilizando MNAzimas y la amplificación de la señal: Una MNAzima puede desencadenar una cascada generada utilizando ADNzimas separadas espacialmente. Como se muestra en las etapas numeradas sucesivamente, un evento de escisión con MNAzima inicial, que se produce solo en presencia de la diana, puede escindir el sustrato inmovilizado, liberando de este modo una primera ADNzima fijada A ("A") (etapas 1-3). La ADNzima A, una vez liberada, se escinde a continuación y libera una segunda ADNzima fijada B ("B") (marcada con fluoróforo) (etapas 4-6) que, a su vez, se escinde y libera ADNzima A adicional (etapas 7-8), dando como resultado el inicio de una cascada. La amplificación exponencial de la señal facilita la medición ya que la ADNzima B con el fluoróforo es liberada en la cascada subsiguiente. F: fluoróforo; Q: extintor.

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

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

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

Figura 11: Uso de MNAzimas para discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas: Panel (i): Se ilustran secuencias de ADN homólogas a las secuencias hsa-miR-20 y miR relacionadas, utilizadas como secuencia diana en los experimentos de las Figuras 11 y 12. Se subrayan las diferencias en la secuencia entre D-20 y D-miR

relacionada. La línea discontinua en negrita vertical separa las regiones de los oligonucleótidos reconocidos por los dos brazos sensores. Panel (ii): Representa las secuencias ilustrativas para una MNAzima de diseño 4 para la detección de miR-20. Panel (iii): Resultados para la escisión dependiente de la diana MNAzima D-20 de un sustrato informador. Reacciones de control mostradas: oligonucleótidos "inespecíficos" (D-17-5p, D-106a, D-106b, D-93), y reacciones de control "sin diana" (dH₂O).

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

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

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

Figura 15: Detección de secuencias cortas (22 unidades) amplificadas: Panel (i): Resultados para la escisión dependiente de la diana de un sustrato informador mediante un sistema de MNAzima de diseño 4 que se dirige a la secuencia miR-20 humana. Las reacciones MNAzima con MiR-20 se llevaron a cabo con cualquiera de (i) 10¹² (1 E+12) copias del oligonucleótido Diana D-20 de control (no amplificado); (ii) amplicones de PCR (5 ml) producidos mediante amplificación de 2 x 10⁷ (2 E+7) copias del oligonucleótido diana D-20 utilizando cebadores complementarios a las secuencias miR-20, (iii) reacciones de PCR "sin diana" que carecen del oligonucleótido Diana D-20, (iv) 10⁸ (1 E+8) copias del oligonucleótido Diana D-20 (no amplificado); y (v) una Diana D-17-5p de control "inespecífica" (2 x 10⁷ (2 E+7) copias amplificadas mediante PCR). Panel (ii): Comparación de la secuencia Diana D-20 y la secuencia inespecífica, D-17-5p. El oligonucleótido D-17-5p tiene un emparejamiento erróneo en la región de unión al cebador de PCR con respecto a la secuencia Diana D-20, y un emparejamiento erróneo en la región (que se encuentra entre los cebadores) que es interrogada por los brazos sensores de las MNAzimas.

Figura 16: Detección de amplicones de miR-20 amplificados: Ejemplo de detección de los criterios de valoración de los amplicones utilizando MNAzimas después de la amplificación mediante PCR. Se utilizó PCR para amplificar microARN mir-20 presente en el ARN total de células del timo humanas, y detectado utilizando la metodología de MNAzima. Las muestras amplificadas y los controles son los mostrados.

Figura 17: Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo del exón 5 de RPLPO mediante diseño 6 de MNAzima: Ejemplo de la detección y la cuantificación en tiempo real utilizando la metodología de MNAzima, en donde el gen de RPLPO se detectó utilizando MNAzimas para controlar la acumulación de exón 5 de RPLPO. Panel (i): diseño 6 MNAzima; Panel (ii): señal de fluorescencia que indica la PCR en tiempo real para diferentes cantidades de molde según se muestra; Panel (iii): curva patrón y cuantificación de material amplificado. Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en la fluorescencia para la detección por MNAzima de ADN genómico humano amplificado mediante PCR. R² = 0,995, pendiente = -3,698

Figura 18: Representación esquemática de un análisis múltiplex ilustrativo de múltiples dianas: Se pueden detectar simultáneamente dos o más dianas utilizando dos o más sustratos, cada uno específico para una MNAzima. Los sustratos se marcan preferiblemente con diferentes fluoróforos. En este ejemplo, la Diana 1 se puede detectar controlando el incremento de la fluorescencia FAM y la Diana 2 se puede detectar controlando el incremento de la fluorescencia JOE. Q: extintor, FAM, JOE: fluoróforos.

Figura 19: Detección individual múltiplex de secuencias de RPLPO y D-20: La detección de RPLPO se controló utilizando un sustrato marcado con JOE y la detección de la secuencia Diana D-20 se controló utilizando un sustrato marcado con FAM. Panel (i): el diseño 6 de MNAzima comprende partzimas para un solo sistema de MNAzima, ya sea para RPLPO (panel superior) o para D-20 (panel inferior); Panel (ii): el diseño 6 de MNAzima contiene partzimas para las MNAzimas dirigidas tanto a RPLPO como a D-20.

Figura 20: Detección por MNAzima de dianas utilizando un aptámero: Se representa una estrategia ilustrativa para la detección de una diana. En esta estrategia, se incorpora una secuencia de aptámero se incorpora al extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual solo se forma una MNAzima activa en presencia de la diana. Los componentes oligonucleotídicos requeridos para la estrategia de detección con MNAzima ilustrada incluyen: (a) una partzima patrón; (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 posibilitando el ensamblaje de una MNAzima activa (en presencia de la diana); (d) un sustrato con sonda informadora; y (e) un 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 analito diana (panel (i)), el inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato con sonda informadora. En presencia de un analito diana (panel (ii)), la diana se une a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, evitando la unión del inhibidor del ensamblaje y permitiendo la unión y escisión del sustrato con la sonda informadora. Como tales, las MNAzimas solo se pueden formar y ocasionar la generación de la señal fluorescente en presencia de la diana.

Figuras 21: Detección por MNAzima de moléculas pequeñas utilizando un aptámero: Se representa un ejemplo de uso de MNAzimas para la detección de dianas, específicamente de ATP. Se demostró la estrategia ilustrada en la Figura 20 utilizando el ejemplo de detección de una molécula pequeña, ATP. Panel (i) ilustra las secuencias de los componentes oligonucleotídicos que se usaron para la detección de ATP. Estos comprenden una partzima, un aptapartzima (que incorpora un aptámero para unión a ATP), un inhibidor del ensamblaje del aptámero/MNAzima, un sustrato informador y un facilitador del ensamblaje. Panel (ii) El análisis de escisión de subBi-1-FB muestra los resultados obtenidos después de la incubación de los componentes oligonucleotídicos en presencia, o ausencia, de ATP y otros nucleótidos. Se observó un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo en presencia de ATP, y dATP, pero no en presencia de GTP o CTP. Adicionalmente, no se observó ningún aumento de la fluorescencia en ausencia de cualquier diana (solo control de agua).

Figura 22: Detección de emparejamientos erróneos de una sola base utilizando MNAzimas: Se representa un ejemplo de uso de MNAzimas para la detección de los emparejamientos erróneos de una sola base. Panel (i) ilustra las secuencias de los componentes oligonucleotídicos que se usaron para la detección de los emparejamientos erróneos de una sola base en la secuencia diana del exón 5 de RPLPO. El oligonucleótido ilustrado comprende dos partzimas (A5 y B6), que se basan en el diseño 7 de de MNAzima (p. ej., Ejemplo 20), y un sustrato informador. La tercera base (X) en el brazo sensor de la partzima B se empareja o se empareja erróneamente con la secuencia diana. Cuando X = G la partzima y la diana están totalmente emparejadas. Cuando X = C existe un emparejamiento erróneo entre el brazo sensor y la diana RPLPO. Panel (ii) muestra los resultados obtenidos después de la amplificación mediante PCR y la detección en tiempo real en reacciones que contienen una partzima B que está completamente emparejadas o está emparejada erróneamente, con respecto a la diana RPLPO.

Figura 23: Estrategia con MNAzima y resultados para la detección de SNP: El método utiliza un brazo sensor de partzima B truncado que está completamente emparejado con una versión de SNP, y un oligonucleótido estabilizador que facilita el ensamblaje de la MNAzima en presencia de la diana completamente emparejada. El requerimiento de una complementariedad estricta para el brazo sensor de la partzima B y el ácido nucleico diana permite la discriminación de secuencias estrechamente relacionadas. Panel (i): Brazo sensor de 5 bases más oligonucleótido estabilizador completamente emparejados; Panel (ii): Brazo sensor de 5 base más oligonucleótido estabilizador emparejados erróneamente; Panel (iii): Sin control de estabilizador; Panel (iv): Sin control de diana; Panel (v): Resultados de la detección de SNP por MNAzima con diana completamente emparejada, diana emparejada erróneamente, sin control de estabilizador y sin control de diana.

Figura 24: Adaptación de la detección con MNAzima para producir una reacción de cambio de color: El método utiliza partículas de oro a nanoescala con oligonucleótidos adjuntos, que, cuando se conectan mediante oligonucleótidos formadores de puente, forman un agregado de color azul (panel i). Los oligonucleótidos formadores de puente incorporan una secuencia sustrato. En presencia de la diana (Panel II), la MNAzima ensambla y escinde la secuencia sustrato, liberando partículas de oro individuales, y produciendo un cambio de color de azul a rojo, que es visible a simple vista.

Figura 25: Ejemplo de una cascada de MNAzima utilizando partzimas fijadas: Las MNAzimas se pueden utilizar para iniciar cascadas de amplificación de señales como se ilustra en este diagrama. La reacción contiene los siguientes elementos: (i) partzimas para MNAzima 1 que están libres en disolución, (ii) un facilitador del ensamblaje para las MNAzimas 2 y 3 (que tienen los mismos brazos sensores) que o bien está libre en disolución (como se ilustra) o bien fijado a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1; (iii) partzimas para la MNAzima 2 que están fijadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1. Sub 1 puede ser escindido o bien por la MNAzima 1 (en presencia de una diana) o bien por la MNAzima 3 (en presencia de un facilitador del ensamblaje), y la escisión da como resultado la liberación de las partzimas para la MNAzima 2 en disolución; (iv) partzimas para la MNAzima 3 que están fijadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 2. Sub 2 puede ser escindido por la MNAzima 2 (en presencia de facilitador del ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partzimas para la MNAzima 3 en disolución; (v) Sub 2-FQ, que tiene la misma secuencia que Sub 2, pero está libre en disolución y está doblemente marcado con un fluoróforo (F) y un extintor (Q). Sub 2-FQ puede ser escindido por la MNAzima 2 para generar una señal fluorescente. En presencia de la diana, la MNAzima 1 activa se forma a partir de las partzimas que están libres en disolución. La MNAzima 1 escinde sus Sub 1 liberando así las partzimas para la MNAzima 2. Una vez libres, estas partzimas hibridan con el facilitador del ensamblaje y forman la MNAzima 2, que escinde 2 Sub-FQ libre (generando una señal fluorescente) o Sub 2 fijado (liberando las partzimas para la MNAzima 3). Puesto que la MNAzima 3 comparte los mismos brazos para el sustrato que la MNAzima 1, ésta también puede escindir Sub1 fijado, liberando de este modo más partzimas para la MNAzima 2. Esto da como resultado una cascada de generación enzimática de

los componentes (partzimas) para más enzimas (MNAzimas) y una cascada de amplificación de la señal concomitante.

Definiciones

5 Algunos de los términos que se utilizan en la presente memoria tendrán los significados que se indican a continuación.

El término "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente exclusivamente". Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprenden" y "comprende", tienen los significados variados correspondientemente.

10 Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a un polímero de hebra sencilla o doble de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas, o análogos, derivados, variantes, fragmentos o combinaciones de los mismos, incluyendo, pero no limitados a ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNm, ARNt, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre y primicroARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosomal, y derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos. A modo de ejemplo no limitante, la fuente de un ácido nucleico se puede seleccionar del grupo que comprende una fuente sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de las mismas.

20 Los términos "oligonucleótido" y "cebador" indican típicamente un segmento de ADN o una molécula de ácido nucleico que contiene ADN, o ARN o una molécula que contiene ARN, o una combinación de las mismas. Los ejemplos de los oligonucleótidos incluyen dianas de ácido nucleico; sustratos, por ejemplo, aquellos que pueden ser modificados por una MNAzima; cebadores tales como los utilizados para la amplificación de dianas *in vitro* mediante métodos tales como PCR, y componentes de MNAzimas. Los facilitadores del ensamblaje de MNAzimas, en ciertas realizaciones, pueden comprender oligonucleótidos como se define en la presente memoria. Las partzimas utilizadas en la presente memoria también pueden comprender oligonucleótidos.

25 Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" incluyen la referencia a cualquier secuencia especificada así como a la secuencia complementaria de la misma, a menos que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos pueden comprender al menos una adición o sustitución, incluyendo, pero sin limitarse al grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometiltiouridina, dihidrouridina, 2'-O-metilpseudouridina, beta-D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosa, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosa, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, beta-D-manosilmetiluridina, 5-metoxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurin-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurin-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico de ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, beta-D-arabinosiluridina, beta-D-arabinosiltimidina.

40 Los términos "molécula de ácido nucleico catalítica", "ácido nucleico catalítico", "enzima de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico catalítica" se utilizan en la presente memoria indistintamente y significarán una molécula de ADN o molécula que contiene ADN (también conocida en la técnica como "enzima de ADN", "desoxirribozima" o "ADNzima") o ARN o una molécula que contiene ARN (también conocido en la técnica como una "enzima de ARN" o "ribozima") o una combinación de las mismas, que es una molécula híbrida ADN-ARN, que puede reconocer un sustrato y catalizar una modificación del sustrato. Los residuos de nucleótidos de los ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir las bases A, C, G, T y U, así como derivados y análogos de las mismas.

45 El término "derivado" cuando se utiliza en relación con un ácido nucleico o un nucleótido de la presente invención incluye cualquier ácido nucleico o nucleótido equivalentes funcionalmente, incluyendo cualquier molécula de fusión producida íntegramente (por ejemplo, por medios recombinantes) o añadida después de la síntesis (por ejemplo, por medios químicos). Tales fusiones pueden comprender oligonucleótidos de la invención con ARN o ADN añadidos al mismo o conjugados con un polipéptido (p. ej., puromicina u otro polipéptido), una molécula pequeña (p. ej., psoraleno) o un anticuerpo.

55 El término "análogo" cuando se utiliza en relación con un ácido nucleico o un nucleótido incluye un compuesto que tiene una estructura física que está relacionada con una molécula de ADN o ARN o un residuo, y puede ser capaz de formar un enlace de hidrógeno con un residuo de ADN o ARN o un análogo del mismo (es decir, es capaz de hibridar con un residuo de ADN o ARN o un análogo del mismo para formar un par de bases), pero tal unión no es tan necesaria para que dicho compuesto esté incluido dentro del término "análogo". Tales análogos pueden poseer diferentes propiedades químicas y biológicas para el residuo ribonucleotídico o desoxirribonucleotídico con los 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-

imidazoldesoxiuridina, 3-(aminopropinil)-7-desaza-dATP, ARN 2'-O-metilado, protección terminal con 2'-O-metilo (Warashina et al., 1999; Cairns et al., 2003; Schubert et al., 2004; Sidorov et al., 2004). Otros análogos son compatibles con la actividad catalítica de la ADNzimas. La alteración de una secuencia de ácido nucleico catalítico, por ejemplo mediante sustitución de una base por otra, mediante sustitución de un análogo por una base, o alteración del componente azúcar o de la cadena principal de fosfodiéster, puede ser sencilla para el experto en la materia. Por ejemplo, las alteraciones se pueden realizar durante la síntesis, o mediante modificación de las bases específicas después de la síntesis. El ensayo empíricos 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, sobre la actividad catalítica. Los análogos de las bases A, C, G, T y U son conocidos en la técnica, y en la Tabla 2 se enumera un subconjunto.

Tabla 2: Ejemplos de análogos de nucleótidos útiles en la presente memoria

Abreviatura	Nombre
ac4c	4-acetilcitidina
chm5u	5-(carboxihidroxiometil)uridina
Cm	2'-O-metilcitidina
Cmm5s2u	5-carboximetilaminometiltiouridina
D	Dihidrouridina
Fm	2'-O-metilpseudouridina
Galq	beta, D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metilguanosina
I	Inosina
i6a	N6-isopenteniladenosina
m1a	1-metiladenosina
M1F	1-metilpseudouridina
M1G	1-metilguanosina
M1I	1-metilinosina
m22g	2,2-dimetilguanosina
m2a	2-metiladenosina
M2G	2-metilguanosina
m3c	3-metilcitidina
M5C	5-metilcitidina
M6A	N6-metiladenosina
M7G	7-metilguanosina

ES 2 431 076 T3

Abreviatura	Nombre
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-metiltiopurin-6-ilcarbamoil)treonina
Mt6a	N-((9-beta-ribofuranosilpurin-6-il)-N-metil-carbamoil)treonina
Mv	Éster metílico de ácido uridina-5-oxiacético
o5u	Ácido uridin-5-oxiacético (v)
Osyw	Wibutoxosina
P	Pseudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocitidina
S2T	5-metil-2-tiouridina
S2U	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metiluridina
T6A	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurin-6-il)carbamoil)treonina
Tm	2'-O-metil-5-metiluridina
Um	2'-O-metiluridina
Yw	Wibutosina
X	3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, (ACP3)u
Arau	beta D-arabinosiluridina
Arat	beta D-arabinosiltimidina

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

éste no tiene que ser necesariamente el caso. No se necesite necesariamente que los fragmentos de un ácido nucleico codifiquen polipéptidos que conserven la actividad biológica. En vez de eso, un fragmento de ácido nucleico puede ser útil, por ejemplo, como sonda de hibridación u oligonucleótido para PCR. El fragmento puede derivar de un ácido nucleico de la invención o, alternativamente, puede ser sintetizado por algunos otros medios, por ejemplo síntesis química.

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

El término "alto rigor" según se utiliza en la presente memoria se refiere a las condiciones en las que dos ácidos nucleicos pueden hibridar, y puede incluir, por ejemplo, la concentración de sales y/o detergentes en una disolución, la temperatura de una disolución que se utiliza durante la hibridación de los dos ácidos nucleicos y el período de tiempo de la hibridación. En consecuencia, el término "alto rigor" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a las condiciones en una disolución que conducen a la hibridación de dos ácidos nucleicos solo cuando tales ácidos nucleicos comparten un alto grado de complementariedad. El grado de complementariedad puede incluir, pero no limitarse a, un intervalo de aproximadamente 50% a 99%. Por lo tanto, las condiciones de "alto rigor" pueden implicar, pero no se limitan a, el uso de una temperatura variable y un tampón que comprende diferentes concentraciones de detergentes, sales, y cationes divalentes.

Los términos "molécula facilitadora del ensamblaje", "facilitador del ensamblaje", "molécula facilitadora del ensamblaje de la MNAzima", "facilitador" y "facilitador del ensamblaje de la MNAzima" según se utiliza en la presente memoria se refieren a entidades que pueden facilitar el autoensamblaje de las partzimas componentes para formar una MNAzima catalíticamente activa. En realizaciones preferidas se requiere un facilitador del ensamblaje para el autoensamblaje de una MNAzima. Un facilitador del ensamblaje en algunas realizaciones comprende una diana tal como un ácido nucleico o un analito distinto de un ácido nucleico. Las moléculas facilitadoras del ensamblaje pueden comprender una o más regiones o moléculas que pueden emparejarse con, o unirse a, una o más "partzimas" oligonucleotídicas, que constituyen los componentes o porciones de una "MNAzima". No se requiere que el facilitador del ensamblaje interactúe con, se empareje con, o se una a cada partzima componente u oligonucleótido siempre que interactúe, se empareje, o se una a al menos una de las partzimas componentes de una MNAzima. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que las moléculas facilitadoras del ensamblaje de la MNAzima incluyan la gama más amplia de constituyentes que puedan facilitar el autoensamblaje de una MNAzima. En algunas realizaciones, un facilitador del ensamblaje puede comprender un ácido nucleico. En otras realizaciones, un facilitador del ensamblaje puede comprender cualquier célula o cualquier porción de la misma, por ejemplo, cualquier célula eucariótica o procariótica, virus, prión, levadura u hongo, o cualquier otra molécula, por ejemplo, incluyendo, pero no limitada a una proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico. En otras realizaciones, un facilitador del ensamblaje puede comprender un virus, prión, levadura u hongo, o cualquier otra molécula, por ejemplo, incluyendo pero no limitada a glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos.

El término "diana", según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier entidad, constituyente o analito natural o sintético, que se pretende detectar, identificar o cuantificar por medio de una o varias MNAzimas concretas. Por lo tanto, las dianas abarcan la gama más amplia de entidades, constituyentes o analitos detectables para los que son deseables métodos de detección, identificación y/o cuantificación sensibles. En algunas realizaciones, una diana comprende un facilitador del ensamblaje. Algunas dianas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos. También se contemplan otras diana para uso en la presente memoria.

Los términos "sustrato", "molécula sustrato" y "sustrato químico" según se utilizan en la presente memoria incluyen cualquier molécula que sea susceptible de ser reconocida, y actuar sobre ella o ser modificada químicamente por una molécula catalítica. En realizaciones concretas, un sustrato puede ser reconocido y modificado por una enzima. En otras realizaciones, un sustrato puede ser reconocido y modificado por una molécula de ácido nucleico catalítica. La modificación química de un sustrato puede medirse por la aparición, o el aumento de un producto de la reacción de modificación, o por la desaparición, o disminución, de un sustrato de la reacción o reacciones de modificación. Una molécula catalítica concreta puede reconocer una o más moléculas de sustrato diferentes siempre que cada molécula de sustrato tenga al menos una estructura mínima que sea reconocible para la actividad catalítica de la molécula catalítica.

Un "sustrato informador", "sonda informadora" o "sustrato de sonda informadora", según se utilizan en la presente

memoria son un sustrato que está particularmente adaptado para facilitar la medición de la desaparición de un sustrato o la aparición de un producto en relación con una reacción catalizada. Los sustratos informadores pueden estar libres en disolución o unidos (o "fijados"), por ejemplo, a una superficie, o a otra molécula. Un sustrato informador puede marcarse mediante cualquiera de una gran variedad de medios incluyendo, por ejemplo, fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como extintores), marcas radiactivas, marcaje con biotina (por ejemplo, biotilación) o marcas quimioluminiscentes. Los sustratos informadores para los ácidos nucleicos catalíticos también pueden incluir enzimas proteicas o de ácido nucleico, por ejemplo, ancladas covalentemente a sus extremos.

Según se utiliza en la presente memoria, los sustratos "genéricos" o "universales" son sustratos, por ejemplo sustratos informadores, que son reconocidos por y sobre los que se actúa catalíticamente mediante una pluralidad de MNAzimas, cada una de los cuales puede reconocer una diana diferente. El uso de tales sustratos facilita el desarrollo de análisis separados para la detección, identificación o cuantificación de una amplia variedad de dianas utilizando MNAzimas relacionadas estructuralmente, todas las cuales reconocen un sustrato universal. Estos sustratos universales pueden ser marcados cada uno de forma independiente con una o más marcas. En realizaciones preferidas, se utilizan marcas 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 dianas utilizando MNAzimas.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "partzima", "partzima componente" y "oligonucleótido componente" se refieren a un oligonucleótido que contiene ADN o contienen ARN o que contiene ADN-ARN, dos o más de los cuales, solo en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de la MNAzima, pueden formar juntas una "MNAzima". En ciertas 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 de la MNAzima que cataliza una modificación química; un dominio de "brazo sensor", que se puede asociar con y/o unirse a un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una diana), y un dominio del "brazo para el sustrato", que se puede asociar con y/o unirse a un sustrato. Se puede observar una representación de estas regiones o dominios, por ejemplo, en la Figura 1. Una partzima puede comprender una o más moléculas. Las partzimas pueden comprender al menos un componente adicional, incluyendo pero no limitado a, un aptámero, denominado en la presente memoria como "apta-partzima". Una partzima también puede incluir un sustrato, como se puede observar, por ejemplo, en la Figura 25.

El término "MNAzima" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a dos o más secuencias de oligonucleótidos (p. ej., partzimas) que, solo en presencia de una molécula facilitadora del ensamblaje de una MNAzima (por ejemplo, una diana), forman una enzima de ácido nucleico activa que es capaz de modificar catalíticamente un sustrato. Una MNAzima ilustrativa que comprende la partzima A y la partzima B se representa en la Figura 1. Con referencia a la Figura 1, las partzimas de ADN A y B se unen cada una a una diana (p. ej., a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick con una diana de ácido nucleico). La MNAzima solo se forma cuando los brazos sensores de las partzimas A y B hibridan adyacentes entre sí sobre la diana. Los brazos para el sustrato de la MNAzima establecen contacto con el sustrato informador, cuya escisión está catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima, formada por la interacción de los dominios catalíticos de las partzimas A y B. La MNAzima escinde el sustrato entre un par colorante de un fluoróforo y un extintor, generando de ese modo la señal. La escisión de una quimera de ADN/ARN (sustrato informador) se ilustra en el dibujo. Los términos "enzima de ácido nucleico de múltiples componentes" y "MNAzima" se utilizan indistintamente en la presente memoria y comprenden estructuras bipartitas, compuestas de dos moléculas, o estructuras tripartitas, compuestas de tres moléculas de ácido nucleico, u otras estructuras multipartitas, por ejemplo las formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico. Una MNAzima también puede comprender un oligonucleótido estabilizador que proporciona la estabilidad de la MNAzima mediante la interacción con un facilitador del ensamblaje o sustrato. Resulta evidente que la formación de una MNAzima requiere el ensamblaje de al menos los componentes de las partzimas con el facilitador del ensamblaje, así como la unión de un sustrato, para que la actividad catalítica sea detectable, y que la ausencia de cualquiera de estos componentes de como resultado la carencia de actividad catalítica.

Según se utiliza 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 una estructura de nivel superior del aptámero, tal como, un dominio de unión tridimensional o bolsillo. Los aptámeros pueden por lo tanto unirse a una proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos, o cualquier otra entidad. Los aptámeros preferidos en la presente memoria pueden comprender oligómeros de ADN o ARN de cadena sencilla cortos que pueden aislarse a partir de bibliotecas complejas de ácidos nucleicos sintéticos por medio de un procedimiento iterativo de adsorción, recuperación y reamplificación. Por lo tanto, los aptámeros pueden generarse contra casi cualquier diana, que van de moléculas pequeñas tales como aminoácidos o antibióticos, a estructuras de proteínas y ácidos nucleicos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cascada" se refiere a cualquier sucesión de procesos u operaciones que se producen en fases sucesivas, en donde la aparición de cada fase es típicamente dependiente de la aparición de una fase precedente. Por lo tanto, una cascada puede incluir, pero no se limita a, una cascada

enzimática o cualquier otra cascada de transducción de señales. En algunas realizaciones, una cascada puede comprender la amplificación de una señal que resulta de la actividad catalítica de una MNAzima. En realizaciones preferidas, tal cascada de amplificación puede implicar la amplificación repetida y por lo tanto cíclica de una señal, en donde la actividad catalítica de una primera MNAzima deja disponible una molécula requerida para la actividad catalítica de una segunda MNAzima, que a su vez deja disponible una molécula requerida para la actividad catalítica de la primera MNAzima. En algunas realizaciones, la molécula requerida puede comprender una partzima, una enzima, un facilitador del ensamblaje, un sustrato, una diana, una porción o fragmento de los mismos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una cascada puede implicar por lo tanto la producción de un efecto acumulativo, y por lo tanto detectar una diana de baja abundancia mediante la generación de una señal a un nivel al cual se puede detectar. En otras realizaciones, se pueden emplear más de dos fases catalíticas. La cascada puede ser lineal. En una realización preferida, la cascada puede ser exponencial.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "inhibidor" o "inhibidor de ensamblaje" incluyen, pero no se limitan a, cualquier proteína, polipéptido, péptido o ácido nucleico, ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácidos péptidonucleicos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos, o cualquier otra entidad o molécula que interactúa con uno o más componentes de una MNAzima como se define en la presente memoria, o que interactúa con un sustrato o facilitador del ensamblaje, con el fin de evitar el ensamblaje de una MNAzima. Un "inhibidor" o "inhibidor del ensamblaje" no necesitan estar en proximidad física con una MNAzima, pero, a modo de ejemplo no limitante, pueden unirse de forma competitiva una porción componente de una MNAzima, sustrato o facilitador del ensamblaje, impidiendo de ese modo que tal porción componente este disponible para el ensamblaje de la MNAzima. Semejante unión pueden incluir, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor que sea complementario a un oligonucleótido que comprende una porción componente de una MNAzima.

Las siguientes abreviaturas se utilizan en la presente memoria y en toda la memoria descriptiva:

MNAzima: Enzima de ácido nucleico de múltiples componentes, o enzima de ácido nucleico multipartita;

ADNzima: Enzima de ácido desoxirribonucleico;

ARNzima: Enzima de ácido ribonucleico, o ribozima;

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa;

SDA: Amplificación por desplazamiento de la hebra;

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucles;

RCA: Amplificación por círculo rodante;

TMA: Amplificación mediada por transcripción;

3SR: Replicación de secuencia autosostenida;

NASBA: Amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico;

dH₂O: Agua destilada desionizada;

LNA: Ácido nucleico bloqueado;

PNA: Ácido peptidonucleico;

ADNb: Análisis de ADN ramificado;

FCS: Espectroscopia de correlación de fluorescencia;

TSA: Amplificación de la señal de tiramida;

An: Analito o diana;

F: Fluoróforo;

Q: Extintor;

miR: MicroARN;

N = A, C, T, G, o cualquier análogo de los mismos;

N' = Cualquier nucleótido complementario a N, o capaz de emparejar sus bases con N;

(N)_x: Cualquier número de N;

(N')_x: Cualquier número de N';

W: A o T;

5 *K*: A, G, o AA;

rN: Cualquier base ribonucleotídica;

(RN)_x: Cualquier número de RN;

rR: A o G;

rY: C o U;

10 *M*: A o C;

H: A, C, o T;

D: G, A o T;

JOE ó *6 JOE*: 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína;

FAM o *6-FAM*: 6-carboxifluoresceína.

15 *BHQ1*: Extintor Black Hole 1

BHQ2: Extintor Black Hole 2

M-MLV RT (H-): Transcriptasa Inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney,

RNasa H Minus

ARNsh: ARN de horquilla corta

20 *ARNsi*: ARN de interferencia pequeño

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARNsno: ARN nucleolar pequeño

ARNst: ARN temporal pequeño

25 *ARNsm*: ARN modulador pequeño

pre-MicroARN: microARN precursor

pri-MicroARN: microARN primario

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

30 Se ha de entender, en primer lugar, que las figuras y ejemplos proporcionados en la presente memoria son para ilustrar, y no para limitar la invención y sus diversas realizaciones.

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

1. Composiciones - MNAzimas

40 Las enzimas de ácidos nucleicos de múltiples componentes [del inglés Multi-component Nucleic Acid enzymes] (también denominadas en la presente memoria igualmente enzimas de ácido nucleico multipartitas [del inglés multipartite nucleic acid enzymes] "MNAzimas") son susceptibles de autoensamblaje a partir de dos o más

componentes oligonucleotídicos, también denominados en la presente memoria partzimas. Los oligonucleótidos partzima se auto-ensamblan en presencia de un facilitador del autoensamblaje de la MNAzima para formar una MNAzima. Las MNAzimas son por lo tanto enzimas de ácidos nucleicos catalíticamente activas. En algunas realizaciones, se puede detectar la presencia de una MNAzima, y es indicativa de la presencia de una diana, debido a que la MNAzima forma solo en presencia de la diana, en donde la diana comprende el facilitador del ensamblaje. Se proporcionan en la presente memoria una amplia variedad de análisis basados en los principios básicos esbozados anteriormente. También se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden oligonucleótidos capaces de formar MNAzimas, y MNAzimas de diversas secuencias. En algunas realizaciones, al menos uno de los componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje o el sustrato también pueden incluir/comprender un aptámero que es capaz de unirse a una diana.

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

Según se proporciona en la presente memoria, las MNAzimas pueden contener una o más sustituciones, tales como análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones del azúcar o de la cadena principal de fosfato, diversas deleciones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier combinación de éstas, bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales modificaciones, sustituciones, deleciones, inserciones, etc. se pueden realizar en el brazo sensor y/o de sustrato y/o en las porciones del núcleo catalítico, como se demuestra en la presente memoria, de manera que la molécula conserve la actividad catalítica. Las sustituciones y modificaciones de los brazos que se unen al sustrato o al facilitador del ensamblaje pueden ser bien toleradas y, de hecho, son la base para permitir la adaptación de las moléculas a diferentes sustratos/facilitadores del ensamblaje. Por ejemplo, la modificación de los brazos sensores permitirá la adaptación a diferentes facilitadores del ensamblaje, mientras que la modificación de los brazos para el sustrato permitirá la adaptación a diferentes sustratos.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la invención prevé MNAzimas con actividad catalítica que se componen de desoxirribonucleótidos o que derivan de tales moléculas mediante ciertas modificaciones/sustituciones etc. Como regla general, el remplazo de la molécula completa, por ejemplo, por ribonucleótidos, volverá inactiva la molécula debido a que depende para su actividad de ciertos desoxirribonucleótidos clave. De una manera correspondiente, algunos ribonucleótidos de una ribozima pueden ser sustituidos por desoxirribonucleótidos, pero el remplazo de la molécula completa, por ejemplo, por desoxirribonucleótidos, volverá la molécula inactiva.

El experto en la técnica apreciarán que las MNAzimas comprenden desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o incluso ambos. Se prefieren actualmente aquellas MNAzimas que comprenden al menos uno y más preferiblemente todos los oligonucleótidos componentes desoxirribonucleotídicos. También se prefieren aquellas MNAzimas que comprenden al menos una base desoxirribonucleotídica, o su análogo, en el núcleo catalítico de la MNAzima. Son incluso más preferidas aquellas realizaciones en las que se requiere tal base para la actividad catalítica.

El experto en la técnica también apreciarán que las ADNzimas multipartitas tienen ventajas sobre las ribozimas multipartitas, por ejemplo con respecto a la estabilidad y la facilidad de uso. Por lo tanto, las MNAzimas de múltiples componentes proporcionadas en la presente memoria pueden proporcionar una alternativa actualmente preferida a las ribozimas de múltiples componentes, que también se proporcionan de acuerdo con diversas realizaciones. Asimismo se apreciará que en ciertas realizaciones, las MNAzimas ofrecen ventajas sobre las enzimas de ácido nucleico uni-moleculares, por ejemplo, ADNzimas, que solo pueden reconocer un sustrato, mientras que un sola MNAzima puede reconocer dos moléculas, a saber, un facilitador del ensamblaje (por ejemplo, una diana) y un sustrato. Por ejemplo, estas propiedades de las MNAzimas las hacen adaptables por ejemplo, para la detección de dianas, incluyendo la detección *in situ*, *in vivo* o *in vitro*.

2. Métodos que utilizan MNAzimas para detectar, identificar o cuantificar dianas

La presente invención proporciona diversos métodos que emplean el uso de una o más MNAzimas para la detección, identificación o cuantificación de al menos una diana. En una realización, el primer y segundo componentes oligonucleotídicos se auto-ensamblan solo cuando entran en contacto con una muestra que contiene un facilitador del ensamblaje, indicando de ese modo dicho autoensamblaje de la MNAzima catalíticamente activa la

presencia del facilitador del ensamblaje, en donde el facilitador del ensamblaje es la diana. En otras realizaciones, tales como por ejemplo las que implican un aptámero, el facilitador del ensamblaje puede no ser la diana, y por lo tanto puede comprender solo un elemento requerido para el autoensamblaje de la MNAzima.

5 Varias de las diversas realizaciones de la invención se pueden entender mejor por medio de representaciones gráficas. Por lo tanto, con referencia a las figuras, y de acuerdo con las composiciones y métodos de la presente memoria, generalmente se proporcionan métodos basados en MNAzimas que permiten la detección de al menos una diana utilizando solo enzimas de ácidos nucleicos (por ejemplo, Figuras 1, 3, 4, 7 - 13, 20, 21, 24, 25) sin necesidad de enzimas proteicas tales como polimerasas. Aunque el uso de enzimas proteicas junto con MNAzimas no está excluido en la presente memoria, y en ciertas realizaciones en la presente memoria es admisible, o incluso preferida la inclusión de enzimas proteicas, las condiciones de reacción para los métodos que no requieren enzimas proteicas son generalmente menos restrictivas y más fácilmente optimizadas, por ejemplo, para la eficacia de la escisión por la MNAzima. La falta de requerimientos para las enzimas de proteínas también disminuye generalmente el coste de los reactivos.

15 Como se proporciona adicionalmente en la presente memoria, algunos métodos de empleo de MNAzimas para la detección de dianas no requieren termociclación y/o desnaturalización de una diana. Los métodos isotérmicos son más flexibles que los métodos que requieren termociclación y también pueden permitir la diferenciación entre dianas que comprenden ácido nucleico de hebra sencilla y de doble hebra. Adicionalmente, la falta de necesidad de termociclación puede hacer los métodos más fáciles y menos costosos. Se proporcionan de acuerdo con los métodos de la presente memoria métodos simples, rápidos, rentables, isotérmicos y procedimentalmente flexibles para la detección de dianas de interés en una muestra, que puede ser sintética o natural.

20 Algunos de los ejemplos proporcionados en la presente memoria demuestran la detección de una diana de ácido nucleico por medio del ensamblaje específico de la diana de una MNAzima que conduce a la escisión mediada por MNAzima de, por ejemplo, un sustrato informador fluorescente. Por otra parte, debido a la naturaleza de la molécula de MNAzima, las reacciones pueden llevarse a cabo a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, sujetas solo a los requerimientos para el ensamblaje de la MNAzima y la modificación catalítica (p. ej., escisión) del sustrato utilizado.

25 Un ejemplo básico de una estructura de MNAzima se representa en la Figura 1. La estructura que se muestra comprende la partzima A y partzima B que han emparejado las bases con una molécula facilitadora del ensamblaje de la MNAzima, mostrada aquí simplemente como Diana. Las partzimas A y B mediante la interacción con la Diana, han permitido que el núcleo catalítico entre en estrecha proximidad y por lo tanto se forme. Los brazos para el sustrato de la MNAzima han interactuado y han emparejado las bases con un sustrato, aquí Sustrato Informador. De este modo, la MNAzima se ha auto-ensamblado y este proceso es facilitado por la presencia de la molécula Diana facilitadora del ensamblaje de la MNAzima. En ausencia de la Diana, no se formará MNAzima. La modificación (en este caso, escisión) del sustrato es catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima en el Sitio de Escisión de la MNAzima dentro del sustrato indicado por la flecha vertical. El sustrato en esta realización concreta de la invención comprende una porción detectable que tiene una señal detectable, por ejemplo fluoróforo F, y una porción extintora que tiene un efecto de extintor de la señal detectable F a través de la acción de extintor Q. Tras la escisión en el Sitio de Escisión de la MNAzima, existe un aumento sustancial de la señal detectable, aquí fluorescencia, que se detecta o cuantifica fácilmente.

30 Se puede entender que la Figura 1, representa adicionalmente un ejemplo de un método básico de utilización de MNAzimas para detectar una diana, que en algunas realizaciones comprende un facilitador del ensamblaje. La estrategia 1 (véase la Figura 2) utiliza MNAzimas adaptadas para la detección de las dianas, que incluyen ADN, ARN y proteínas. El sustrato informador puede estar o bien libre en disolución (Figura 1) o bien unido a un soporte (Figura 3). La señal puede ser generada por diversos medios tales como la separación de los pares de colorante del fluoróforo F y extintor Q (Figuras 1 y 3).

35 Más específicamente, la partzima A y la partzima B se muestran en la Figura 1, comprendiendo cada una una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor. En presencia de una diana, las porciones del brazo sensor de partzima A y la partzima B pueden comenzar a hibridar, y a emparejar las bases con porciones complementarias de la diana, por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN. Al contactar con la diana de esta manera, la MNAzima se auto-ensambla formando un núcleo catalítico que puede modificar un sustrato que está unido por los brazos para el sustrato. Preferiblemente, la presencia de la MNAzima se detecta a través de la detección o la medición de su actividad catalítica. Los brazos para el sustrato de la MNAzima ensamblada de este modo pueden establecer contacto con un sustrato, por ejemplo, el sustrato informador mostrado en la Figura 1, a través de la interacción de las secuencias complementarias de los brazos para el sustrato y el sustrato. Una vez que el sustrato ha establecido contacto de esta manera con los brazos para el sustrato, el núcleo catalítico puede promover la modificación (p. ej., escisión) del sustrato, que a su vez puede ser medida o detectada, directa o indirectamente.

40 Con referencia adicional a las figuras, la Figura 2 proporciona una visión general sencilla de diversas aplicaciones ilustrativas de un análisis con MNAzima. La Estrategia 1 ilustra una aplicación básica del análisis con MNAzima como se ha descrito anteriormente. Un MNAzima compuesta de dos oligonucleótidos separados con secuencias de

reconocimiento tanto para una diana como para un sustrato se forma cuando los oligonucleótidos reconocen y se unen a una diana. El sustrato, p. ej., sustrato informador, es modificado por la acción catalítica de la MNAzima y causa la generación de una señal detectable, ya sea directamente (Estrategia 1), durante o después de la amplificación de la diana (Estrategia 2) o a través de una cascada de señales (Estrategia 3). En algunas realizaciones, tanto la diana como amplificación de la señal se producen simultáneamente.

Un experto en la técnica reconocerá que las MNAzimas se pueden utilizar en estrategias para la detección, identificación o cuantificación de facilitadores del ensamblaje que cubren una amplia gama de áreas de aplicación. Estas áreas incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones médicas, veterinarias, agrícolas, de tecnología de los alimentos, de formación de imágenes y de bioterrorismo.

También será fácilmente evidente para un experto en la técnica que las MNAzimas se pueden utilizar para detectar, identificar y/o cuantificar dianas en disolución. Por ejemplo, las estrategias que implican la detección, identificación y/o cuantificación de las dianas individuales utilizando un único sustrato son aplicables a tal detección. En algunas realizaciones esto puede implicar el uso de un sustrato genérico. también se pueden detectar múltiples dianas, en disolución utilizando MNAzimas múltiples que modifican una serie de sustratos genéricos, dando como resultado la modificación de cada sustrato una señal claramente detectable p. ej., diferente fluorescencia.

3. Métodos de utilización de MNAzimas múltiples

El experto en la técnica reconocerá que los diversos análisis proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar generalmente para detectar una única diana por reacción o análisis, o para detectar múltiples dianas en una sola reacción o análisis. Cuando se detectan dianas múltiples, se pueden utilizar una o más MNAzimas dependiendo del análisis y lo que se vaya a detectar. Por ejemplo, una sola MNAzima puede ser suficiente cuando se detectan estructuras relacionadas múltiples, por ejemplo, un grupo de secuencias que comparten una secuencia crítica (reconocida por la MNAzima) y variando solo por ejemplo, en la longitud, o en una secuencia fuera de la secuencia crítica. Se podría detectar cualquier secuencia con la secuencia crítica. Las MNAzimas múltiples serían útiles cuando se detecten secuencias relacionadas que difieran en tan poco como un solo nucleótido o incluso cuando se estén detectando dianas enormemente diferentes, y es deseable conocer la presencia o ausencia de cada uno. Del mismo modo, en algunas realizaciones, será suficiente un único sustrato, mientras que en otras se requiere un único sustrato para detectar cada una de las diversas dianas. En algunos casos, para multiplexar el método se requiere el uso de una señal detectable única o distinta para cada sustrato para facilitar el diseño del método. Una señal detectable única o distinta para cada sustrato puede no ser necesaria cuando los sustratos se fijan a uno o varios soportes y se puede distinguir en virtud de su localización sobre el soporte o los soportes. Estas características de diseño serán fácilmente comprendidas por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, los métodos permiten la detección de una variedad de tipos diferentes de dianas en una reacción, p. ej., una diana de ácido nucleico y una proteína.

4. Métodos de utilización de la amplificación de la diana

El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que los métodos descritos en la presente memoria pueden implicar la amplificación de una diana antes, durante o después de la actividad catalítica de la MNAzima. Tal amplificación de la diana encuentra particular aplicación en realizaciones de la presente invención en las que la cantidad de la diana que se desea detectar, identificar o cuantificar es de tal cuantía que proporciona una señal que de otro modo podrían no ser detectable. Tal amplificación puede comprender una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación basada en una secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

La Estrategia 2 (Figura 2) ilustra el uso de una MNAzima adaptada para controlar la acumulación de amplicones durante, o después de, la amplificación *in vitro* de dianas de ácido nucleico. Los mecanismos para la amplificación *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica. Estos incluyen mecanismos mediados por una ADN polimerasa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.202; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.195; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.000.159; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.965.188; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.176.995) (Saiki et al, 1985; Chehab et al, 1987), amplificación por desplazamiento de la hebra ("SDA") (Walker et al, 1992), amplificación por círculo rodante ("RCA") (Lizardi et al, 1998), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y amplificación isotérmica mediada por bucle ("LAMP") (Notomi et al, 2000; Nagamine et al, 2002). Otros mecanismos de amplificación de la diana están mediados por una ARN polimerasa, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción ("TMA") (Jonas et al., 1993), replicación de secuencia autosostenida ("3SR") (Fahy et al., 1991) y amplificación basada en la replicación de una secuencia de ácido nucleico ("NASBA") (Compton, 1991).

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

Con referencia adicional a la estrategia 2 como se ilustra en la Figura 2, en uno de sus diversos aspectos, la invención proporciona métodos de utilización de MNAzimas junto con métodos de amplificación de la diana, que incluyen, por ejemplo, las PCR, RT-PCR, SDA, RCA, LAMP, TMA, 3SR y NASBA anteriormente mencionadas. Los Ejemplos 4, 5, 6, y 9 demuestran la detección de amplicones de PCR. En los Ejemplos 4, 5, 6, y 9, el análisis del criterio de valoración después de la PCR facilitó la determinación rápida de la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos diana. Los ejemplos 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, y 20 ilustran el control en tiempo real de la amplificación mediante PCR, permitiendo de este modo la cuantificación del ácido nucleico diana. La acumulación de amplicones producidos mediante PCR utilizando razones de cebadores asimétricos o simétricos se puede controlar utilizando MNAzimas.

Como se puede observar en la Figura 2 (estrategia 2) un ácido nucleico diana se amplifica de acuerdo con un procedimiento para la amplificación de ese ácido nucleico (es decir, ADN o ARN). Preferiblemente, se utilizan métodos convencionales de amplificación *in vitro*. Los amplicones generados durante la amplificación sirven como dianas para una MNAzima, de este modo la actividad MNAzima es indicativa de la presencia de la diana. El experto en la técnica apreciarán que semejante control se puede llevar a cabo en un único recipiente bajo condiciones que permiten tanto la amplificación como el ensamblaje y la actividad catalítica de la MNAzima, o el se puede llevar a cabo el análisis con MNAzima después de, o en momentos puntuales a lo largo de, la amplificación, eliminando las muestras al final o durante el curso de las reacciones de amplificación.

También se debe apreciar que los métodos o protocolos que combinan la amplificación de la diana con una actividad del ácido nucleico catalítica pueden requerir condiciones de reacción específicas. Preferiblemente, las condiciones de reacción son compatibles tanto con la actividad de la polimerasa (para la amplificación), como para la modificación catalítica del ácido nucleico de un sustrato (para la detección). Los protocolos para la determinación de las condiciones para la actividad catalítica y la actividad de la polimerasa concurrentes a altas temperaturas, tal como durante la PCR, se han descrito para las ADNzimas (Impey et al., 2000). La influencia de factores que incluyen la longitud del brazo de la ADNzima, el tampón, la temperatura, la concentración de iones divalentes y los efectos de los aditivos fue demostrada en esta publicación. Las ADNzimas son adecuadas para su uso combinado con estrategias de amplificación *in vitro*. Por ejemplo, éstas no son desnaturalizadas irreversiblemente por la exposición a altas temperaturas durante la amplificación.

5. Métodos de utilización de soportes insolubles y sólidos

También debe entenderse que, generalmente, los métodos, ya sea multiplexados o no, son aplicables en disolución, o combinados con un soporte insoluble o soporte sólido sobre el cual están unidos, anclados o fijados uno o más de sustrato, la enzima o porción de la misma, el facilitador del ensamblaje de la MNAzima y/o la diana. Una vez más las características de tales sistemas de análisis serán comprendidas generalmente por el experto en la técnica proporcionada con los métodos y variaciones ilustrados en la presente memoria y en los ejemplos de trabajo.

Con referencia a la Figura 3, Panel (i), se representa un método ilustrativo para detectar dianas utilizando una MNAzima y un sustrato anclado a un soporte. En esta realización, el sustrato es preferiblemente un sustrato como se muestra con una porción detectable que comprende una señal detectable, por ejemplo, un fluoróforo, y una porción extintora que disminuye o elimina la señal detectable mientras que la porción detectable y la porción extintora del sustrato permanecen en estrecha proximidad, por ejemplo, hasta que el sustrato es modificado p. ej., mediante escisión. El sustrato es anclado a un soporte. Preferiblemente, el soporte es un material insoluble, o una matriz que retiene el sustrato y evita que se mueva libremente en la mayor parte de la mezcla de reacción. Tales soportes son conocidos en la técnica para inmovilizar o localizar sustratos, incluyendo dianas de ácido nucleico. El experto en la técnica apreciarán que el soporte se puede seleccionar entre una amplia variedad de matrices, polímeros, y similares, en una variedad de formas, incluyendo cuentas convenientes para su uso en microanálisis, así como otros materiales compatibles con las condiciones de reacción. En ciertas realizaciones preferidas, el soporte puede ser un material plástico, tal como cuentas u obleas de plástico, o el del pocillo o tubo en donde se lleva a cabo un análisis concreto.

El anclaje del sustrato al soporte está diseñado de tal manera que tras la modificación, por ejemplo, mediante escisión, del sustrato por la MNAzima, o la porción detectable o la porción extintora, pero no ambas, permanece anclada al soporte, mientras que la otra es liberada para moverse en la mayor parte de la mezcla de reacción, lejos de la porción que queda anclada. De este modo, en un ejemplo de escisión, la señal detectable aumenta enormemente a medida que la porción extintora y la porción detectable se separan después de la escisión. En la realización mostrada en la Figura 3, Panel (i), la porción detectable que contiene el fluoróforo permanece anclada después de la escisión. Esto tiene la ventaja de permitir la localización de la señal sobre el soporte, pero en ciertos casos, el fluoróforo o los fluoróforos pueden ser liberados en la disolución. En una realización adicional en la que, por ejemplo, se produce la ligación, el extintor puede ser ligado a un fluoróforo disminuyendo de este modo la señal detectable.

Con referencia a la Figura 3, Panel (ii), se muestra un método multiplexado que comprende múltiples componentes de MNAzima para elaborar múltiples MNAzimas (se muestran dos) específicas para diferentes dianas. Esta realización incluye una estructura que comprende un sustrato en una posición concreta conocida, p. ej., un "chip", donde múltiples posiciones están disponibles para unirse numerosos sustratos, p. ej., Sustrato 1, Sustrato 2. La

porción detectable de cada sustrato se puede rastrear hasta su posición y se fija en esa localización. Para cada MNAzima, p. ej., MNAzima 1, MNAzima 2, si la diana, p. ej., Diana 1, Diana 2, está presente, por ejemplo, una disolución de ensayo, la MNAzima correspondiente a y específica para esa diana se auto-ensamblará y será capaz de catalizar la escisión de su sustrato correspondiente, dando como resultado la producción de una señal en esa localización. La posición de la señal detectable identificará de ese modo qué MNAzima ha escindido su sustrato, y por lo tanto que diana o dianas están presentes en la disolución de ensayo. En esta realización, la modificación del sustrato da como resultado una señal identificable en virtud de su localización. El sustrato no necesita un mecanismo de detección que puede ser identificado de forma independiente, p. ej., un fluoróforo diferente, aunque los expertos en la técnica reconocerán que tal reflexión está dentro del alcance de la presente invención.

Las realizaciones de la presente invención que incluyen un soporte insoluble en la forma de un "chip", también conocido como una matriz o micromatriz, comprenden típicamente una pluralidad de sustratos acoplados, fijados o anclados de otro modo al chip. En realizaciones concretas, los sustratos comprenden un ácido nucleico. Se puede colocar una pluralidad de ácidos nucleicos en el chip mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante una pipeta, impresión de chorro de tinta, impresión por contacto o fotolitografía. El chip puede estar compuesto de al menos un elemento, comprendiendo cada elemento al menos un ácido nucleico. El al menos un elemento puede estar compuesto de una pluralidad de ácidos nucleicos de la misma secuencia. El número de elementos que comprenden un chip puede ser cualquier número, y cuando una pluralidad de elementos se coloca en un chip, los elementos pueden estar separados a una distancia uniforme o variable, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los elementos se pueden colocar al azar, determinándose a continuación la localización respectiva de cada elemento. El tamaño y la forma de los elementos dependerán de la aplicación concreta de la presente invención, y se pueden combinar en un solo chip elementos de diferente tamaño y forma. La superficie del chip puede ser sustancialmente plana o puede tener características tales como depresiones o protuberancias, y los elementos pueden estar situados o en las depresiones o en las protuberancias. Tales depresiones pueden proporcionar un reservorio para las disoluciones en las que están inmersos los elementos, o tales protuberancias pueden facilitar el secado de los elementos. Por ejemplo, los elementos pueden ser colocados en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. En algunas realizaciones, el chip puede incluir identificadores únicos tales como distintivos, etiquetas de radiofrecuencia, dispositivos integrados, tales como microprocesadores, códigos de barras u otras marcas con el fin de identificar cada uno de los elementos. Los identificadores únicos pueden comprender adicional o alternativamente, las depresiones o protuberancias en la superficie de la matriz. Por otra parte, los identificadores únicos pueden proporcionar la orientación o identificación correctas del chip. Los identificadores únicos pueden ser leídos directamente por medio de un dispositivo de captura de datos o por medio de un escáner o detector óptico.

6. Sistemas de sustratos informadores usados en los métodos

También se proporcionan de acuerdo con la presente invención sistemas sustrato informadores genéricos, que permiten el desarrollo de un análisis rápido que permite cambios de diseño fáciles para crear nuevas MNAzimas que reconocen diferentes dianas. Como se comenta en la presente memoria, la porción del brazo para el sustrato y la porción del núcleo catalítico de las partzimas pueden permanecer inalteradas, con cambios solo para la porción del brazo sensor de una o más partzimas requeridas para las nuevas dianas. Se proporcionan secuencias sustrato genéricas y por lo tanto se puede incorporar el mismo sustrato en análisis para muchas dianas diferentes. Adicionalmente, se puede incorporar el mismo sustrato en los métodos en diversas realizaciones en la presente memoria, incluyendo análisis en los que el sustrato está libre en disolución o está fijado o anclado a un soporte. Se puede utilizar una serie de sustratos genéricos en una reacción múltiple que permite la detección simultánea de múltiples dianas.

Las estrategias con MNAzima que utilizan sustratos genéricos ofrecen una gran ventaja sobre tecnologías tales como TaqMan® o Beacons que requieren el diseño y el uso de sondas específicas para cada nueva diana.

7. Sustratos utilizados en los métodos

Como se describe con más detalle a continuación, las MNAzimas tienen la propiedad ventajosa en ciertas realizaciones de ser capaces de utilizar un sustrato universal o genérico. Tal sustrato se muestra en la Figura 1 en una configuración preferida actualmente en donde el sustrato comprende tanto una porción detectable como una porción extintora. La porción extintora se adapta para disminuir o eliminar una señal detectable de la porción detectable del sustrato hasta que el sustrato es escindido por la MNAzima. Por ejemplo, la porción extintora puede comprender "Black Hole Quencher 1" (BHQ1) o "Black Hole Quencher 2" (BHQ2).

De este modo, la MNAzima escinde el sustrato entre la porción detectable y la porción extintora permitiendo que las dos porciones se separen en disolución, permitiendo de este modo que la señal detectable aparezca o aumente a medida que la porción extintora se distancia, o se elimina eficazmente del entorno local de la porción detectable.

El uso del sustrato genérico o universal es activado a través del diseño de las partzimas componentes de la MNAzima. Mediante la alteración de solo los brazos sensores de las partzimas, pero dejando los brazos para el sustrato inalterados, se puede diseñar una gran variedad de MNAzimas específicas para cada una de una pluralidad de dianas, todas las cuales utilizan un sustrato universal para la detección. El experto en la técnica apreciarán las

ventajas que esto ofrece en términos de eliminación de la necesidad de sustratos personalizados o únicos para cada diana. Cada nueva diana requiere solo uno o más cambios en una o más de las porciones del brazo sensor; la porción del brazo para el sustrato y la porción del núcleo catalítico pueden permanecer constantes. Por lo tanto, se puede utilizar un único sustrato informador para una única diana utilizando una MNAzima, y múltiples dianas en una serie de análisis que utilizan MNAzimas alteradas. Una pluralidad de sustratos informadores permite el multiplexado para detectar múltiples dianas en un único análisis utilizando múltiples MNAzimas, una para cada diana. Tales métodos multiplexados de utilización de las MNAzimas se llevan a cabo fácilmente en disolución (Figura 18) o con el anclaje a un sistema de soporte (Figura 3). Se contempla en la presente memoria que los análisis multiplexados pueden realizarse por lo tanto en sistemas que implican el anclaje de uno o más del sustrato, o las partzimas de la MNAzima o el facilitador del ensamblaje, o actividades enzimáticas adicionales, a un soporte tal como se describe en la presente memoria.

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

Los sustratos pueden ser modificados por una MNAzima proporcionando de ese modo un efecto detectable. En el proceso de detección, la modificación del sustrato por una MNAzima puede implicar, por ejemplo, la escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida. Como consecuencia de la modificación del sustrato por una MNAzima, se genera un efecto detectable y la magnitud del efecto puede por lo tanto ser indicativo de la cantidad de diana que se pretende medir. El efecto detectable puede ser detectado por una variedad de métodos, incluyendo espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, procedimientos electrónicos, espectroscopia de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

Varios grupos han informado de 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 una de las cuales tiene una secuencia oligonucleotídica de ADN distinta unida a su superficie. Las partículas de oro se pueden agregar a continuación mediante la adición de un "oligonucleótido puente", que tiene complementariedad con las secuencias que se unen a las partículas de oro. La agregación de partículas da como resultado un cambio concomitante en el color de rojo a azul (Mirkin *et al.*, 1996). Un trabajo más reciente ha mostrado que la inclusión de una secuencia sustrato de ADNzima dentro del oligonucleótido puente puede proporcionar un mecanismo revertir la agregación de las partículas de oro (Liu y Lu, 2004). La activación de las ADNzimas, y la posterior escisión del sustrato/oligonucleótido puente, dio como resultado la disociación de las partículas de oro y un cambio de color de azul a rojo.

Se ideó un simple detector de plomo basado en el concepto anterior que funcionaba mediante la explotación de la dependencia de una ADNzima específica del plomo para su actividad catalítica. La ADNzima fue diseñada para escindir un oligonucleótido puente utilizado para agregar partículas de oro (Liu y Lu, 2004). Del mismo modo, una aptazima que contiene un aptámero específico para la adenosina, y una ADNzima capaz de escindir un oligonucleótido puente solo en presencia de adenosina, permitieron la detección de la adenosina en un formato colorimétrico.

8. Optimización de los métodos

El experto en la técnica entenderán fácilmente que los métodos descritos en la presente memoria pueden ser optimizados utilizando una variedad de parámetros experimentales con el fin de optimizar la detección, identificación y/o cuantificación de una diana. Los parámetros experimentales concretos que se optimizan, y el nivel de esa optimización, dependerán del método concreto que se esté empleando y de la diana concreta que se esté tratado de detectar, identificar y/o cuantificar. Tales parámetros incluyen, pero no se limitan a, tiempo, temperatura, concentración de sales, detergentes, cationes y otros reactivos, incluyendo, pero no limitados a, dimetilsulfóxido (DMSO), y la longitud, la complementariedad, el contenido de GC y el punto de fusión (T_m) de los ácidos nucleicos .

En algunas realizaciones, por ejemplo, los métodos que implican la detección de la variación de la secuencia y/o la detección de ADN metilado, los parámetros experimentales, que incluyen preferiblemente la temperatura a la que se lleva a cabo el método, se pueden optimizar con el fin de discriminar entre la unión de un ácido nucleico componente de la MNAzima a un ácido nucleico diana que comprende o no una variación de la secuencia o un nucleótido metilado, respectivamente. La temperatura a la que se pueden realizar tales métodos puede estar en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 96°C, aproximadamente 20°C a aproximadamente 75°C, de 20°C a aproximadamente 60°C o de aproximadamente 20 a aproximadamente 55°C.

En una realización preferida, las reacciones optimizadas para la práctica de los métodos de utilización de las MNAzimas se proporcionan en la presente memoria. En tales reacciones optimizadas, la actividad catalítica se

incrementa hasta en 10, 20, o 30% por encima de las reacciones no optimizadas. Las condiciones de reacción más preferidos mejoran la actividad catalítica en al menos 35%, o 40%, y preferiblemente hasta 50% o más. En realizaciones todavía más preferidas, las reacciones optimizadas tienen un aumento de la actividad catalítica de más de 50%, y hasta 66%, 75% o incluso 100%. En realizaciones todavía más preferidas, un método de reacción completamente optimizado ofrecerá 100, 200 o incluso 300% o más de aumento en la actividad catalítica. Otras condiciones de reacción preferidas pueden mejorar la actividad catalítica hasta 1.000% o más respecto a los métodos llevados a cabo con condiciones de reacción no optimizadas. Una condición de reacción altamente preferida para la optimización de los métodos proporcionados en la presente memoria es la inclusión de ciertos cationes divalentes. La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas de ácido nucleico puede ser influenciada de una manera dependiente de la concentración por la concentración de cationes divalentes. Las reacciones optimizadas preferidas se optimizan para uno o más de Ba²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, y Pb²⁺.

9. Métodos que utilizan aptámeros

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo con aptámeros, en donde dicho aptámeros pueden facilitar la detección, identificación y/o cuantificación de dianas, incluyendo dianas distintas de los ácidos nucleicos.

Con referencia a las Figuras 4 y 20, se ilustra un método de utilización de MNAzimas para detectar dianas, incluyendo entidades distintas de ácidos nucleicos. Este método utiliza aptámeros que pueden comprender un ácido nucleico o proteína, polipéptido o péptido o combinación de los mismos que tiene la capacidad de reconocer uno o más ligandos. Los aptámeros pueden unir, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos, o cualquier otra entidad (Lee et al., 2004).

Los aptámeros preferidos en la presente memoria pueden comprender oligómeros de ADN o ARN de hebra sencilla cortos o péptidos que se pueden aislar de bibliotecas complejas de ácidos nucleicos o péptidos sintéticos mediante un proceso iterativo de adsorción, recuperación, y reamplificación. Por lo tanto, los aptámeros pueden generarse casi contra cualquier diana, que van desde moléculas pequeñas tales como aminoácidos o antibióticos, a estructuras de proteínas y ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, los aptámeros incluyen, por ejemplo, moléculas de unión de ácidos nucleicos que se generan preferiblemente por medio de técnicas de evolución y selección. Preferiblemente, los aptámeros pueden comprender moléculas de ADN o ARN, o una combinación de ambas, incluyendo pero no limitadas a, análogos de nucleótidos como por, por ejemplo, la Tabla 2 anterior.

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

Con referencia a la Figura 4 panel (ii), los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para esta estrategia de detección de MNAzima pueden incluir: (a) dos partzimas convencionales; (b) un facilitador del ensamblaje que incorpora un aptámero (secuencia en negrita), así como una secuencia inhibidora complementaria capaz de formar una estructura en horquilla, y (c) un sustrato. En ausencia de un analito diana, el facilitador del ensamblaje adopta una estructura en horquilla que inhibe la capacidad de este componente para dirigir el ensamblaje de MNAzimas activas. En presencia de analito diana, el analito diana se une al dominio del aptámero del facilitador del ensamblaje, perturbando así la estructura en horquilla y permitiendo que el componente dirija el ensamblaje de una MNAzima activa. La MNAzima activa puede modificar a continuación un sustrato causando, por ejemplo, la generación de una señal fluorescente.

Un experto en la técnica apreciará que el aptámero puede incorporarse a cualquiera de los extremos de la molécula o moléculas facilitadoras del ensamblaje. Adicionalmente, se apreciará que podrían incorporarse múltiples aptámeros a uno o más de los componentes oligonucleotídicos de la partzima. El facilitador del ensamblaje en las estrategias ilustradas en la Figura 4 paneles (i) y (ii) puede comprender ADN, ARN, LNA, PNA o una secuencia que contiene uno o más análogos de bases de nucleotídicas. En otras realizaciones, el An diana es un ácido nucleico. En tales realizaciones, una secuencia complementaria al ácido nucleico diana sustituye a la secuencia del aptámero en negrita en la Figura 4.

Con referencia a la Figura 4 panel (iii), los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para esta estrategia de

detección de MNAzima pueden incluir dos apta-partzimas, cada una de las cuales contiene una porción de un aptámero. En ausencia de un analito diana, las MNAzimas activas no se pueden ensamblar. En presencia de analito diana, el analito diana sirve como facilitador del ensamblaje uniendo los componentes oligonucleotídicos dirigiendo de ese modo el ensamblaje de una MNAzima activa. La MNAzima activa puede modificar a continuación un sustrato causando, por ejemplo, la generación de una señal fluorescente.

Una estrategia relacionada, que combina la unión de aptámeros y el ensamblaje de MNAzimas, se ilustra en la Figura 20. En esta estrategia, se incorpora una secuencia de aptámero en el extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual solo se forma una MNAzima activa en presencia del analito diana. Los componentes oligonucleotídicos requeridos para la estrategia de detección de MNAzimas ilustrada incluyen: (a) una partzima convencional; (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 y como a la partzima permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa (en presencia de la diana); (d) un sustrato de sonda informadora, y (e) un 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 la ausencia de una diana (panel de la izquierda), el inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato de sonda informadora. En presencia de una diana (panel de la derecha), la diana se une a la secuencia del aptámero de la apta-partzima, evitando la unión del inhibidor del ensamblaje y permitiendo la unión y la escisión del sustrato de sonda informadora. Como tal, una MNAzima activa solo se puede formar y ocasionar la generación de señal fluorescente en presencia de la diana.

Adicionalmente, un experto en la técnica se apreciará que la estrategia ilustrada en la Figura 20 es similar a la ilustrada en la Figura 4 panel (i), con la diferencia de que la secuencia inhibidora complementaria, que evita la formación de la MNAzima activa, o bien se incorpora al componente partzima oligonucleotido (Figura 4 panel (i)) o bien a una molécula separada (Figura 20). Como tal, la secuencia inhibidora puede ser una molécula separada o se puede incorporar a uno de los componentes que participan en el complejo de la MNAzima.

También será apreciado por un experto en la técnica que se podrían incorporar uno o más aptámeros a cualquiera de los componentes oligonucleotídicos, incluyendo las partzimas, el facilitador del ensamblaje o el sustrato. Adicionalmente el aptámero se podría incorporar a cualquiera de los extremos de uno cualquiera de estos oligonucleotidos.

La invención se puede entender mejor mediante la referencia a los ejemplos 18 y 21, donde la estrategia de aptámero/MNAzima se utiliza para detectar una molécula pequeña (ATP) y una proteína (polimerasa *Taq*), respectivamente.

10. Métodos para la detección, identificación y cuantificación de microARN

El experto en la técnica entenderá que la detección, identificación y/o cuantificación de microARN representa una realización particular de los métodos descritos en la presente memoria. Con referencia a la Figura 5, se ilustra una estrategia para la amplificación de secuencias cortas de ácidos nucleicos (por ejemplo, microARN (MIR)) y la detección de amplicones utilizando MNAzimas.

La detección de secuencias cortas de ácido nucleico tales como microARN (miR) requiere de estrategias adicionales principalmente debido al pequeño tamaño de estas dianas. Los miR son moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Se pueden detectar mediante clonación o análisis de transferencia Northern, pero estos métodos son laboriosos y requieren cantidades más grandes de ARN total que técnicas tales como la RT-PCR. El pequeño tamaño de los miR proporciona una secuencia insuficiente para dar cabida a dos cebadores de PCR de diseño convencional. Adicionalmente, incluso si se lleva a cabo la amplificación de miR, es difícil distinguir los amplicones genuinos de los dímeros de cebadores utilizando el tamaño (comprobado mediante electroforesis), o la fluorescencia a partir de la intercalación de colorantes no específicos, tales como SYBR Green o bromuro de etidio. Esta limitación podría superarse mediante el sondeo de los amplicones de miR con sondas de hibridación internas tales como las sondas TaqMan® o Beacon, sin embargo, de nuevo el pequeño tamaño de los amplicones prohíbe el uso de sondas de diseños convencionales.

Un método RT-PCR con TaqMan® modificado (Chen et al., 2005) para el análisis de miR inicia la transcripción inversa utilizando cebadores 3' que tienen extremos 3' específicos de miR y secuencias no relacionadas adicionales en sus extremos 5', que pueden formar tallos-bucles. El ADNc generado se amplifica utilizando estos cebadores 3' y cebadores 5', que también tienen extremos 3' específicos de miR y secuencias adicionales no relacionadas en sus extremos 5'. La amplificación se controla en tiempo real utilizando sondas TaqMan® que se unen tanto a secuencias de miR como a secuencias no relacionadas introducidas por los cebadores. Sin embargo, debido al diseño del cebador, y al tamaño y el posicionamiento de la sonda TaqMan® existe todavía la probabilidad de que los miR específicos puedan no ser distinguidos de las secuencias estrechamente relacionadas.

Como se muestra en la Figura 5, el método empleado aquí emplea preferiblemente un cebador 3' que se une a un miR en su extremo 3' y tiene una secuencia de extensión, no relacionada con el miR, que puede formar, o no, un tallo-bucle en el extremo 5'. Como representa la Figura 5, la secuencia no relacionada del cebador puede crear una

estructura de bucle (Figura 5, lado izquierdo) o puede crear simplemente una estructura de etiqueta (Figura 5, lado derecho). En cualquier ejemplo, el cebador de miR 3' se extiende en presencia de transcriptasa inversa, seguida de amplificación mediante PCR utilizando cebadores 5' y 3' con la secuencia específica de miR en el extremo 3' con la secuencia de extensión no relacionada en los extremos 5'. Los amplicones se detectan fácilmente por medio de MNazimas, que reconocen y se hibridan con el amplicón incluyendo la región entre los cebadores 5' y 3'. El requerimiento estricto de la complementariedad entre el brazo sensor de la MNazima y el ácido nucleico diana permite la discriminación de secuencias incluso estrechamente relacionadas. El Ejemplo 5 y el Ejemplo 10 en los Ejemplos de más abajo demuestran los resultados del uso de MNazimas para detectar amplicones generados mediante la amplificación de secuencias cortas de ácido nucleico (véase también la estrategia 2 en la Figura 2, más arriba). Adicionalmente, el ejemplo 5 demuestra la capacidad de los métodos que utilizan MNazimas para distinguir entre dos secuencias que tienen solo una diferencia de un único nucleótido. Esto proporciona una gran ventaja ya que, aun cuando el proceso de amplificación no es capaz de discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas, las MNazimas permiten la discriminación entre variaciones de secuencia mínimas en los amplicones resultantes.

11. Métodos que utilizan cascadas

Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos descritos en la presente memoria pueden ser utilizados para llevar a cabo una cascada como se define en la presente memoria. Las realizaciones concretas de la realización de tales métodos como se describe en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a (1) el uso de una MNazima para escindir un sustrato solamente en presencia de una diana, en donde dicho sustrato se prepara a continuación para la participación en un segundo evento tal como la generación de una señal detectable, como se representa en la Figura 6, en donde la escisión de un sustrato prepara una enzima que puede escindir a continuación un anclaje, lo que da como resultado la disociación de una etiqueta fluorescente a partir de un extintor; o (2) el uso de una MNazima para escindir un sustrato solo en presencia de una diana, en donde el sustrato se prepara a continuación para la participación en un segundo evento, en donde la realización de dicho segundo evento a su vez prepara un sustrato adicional para la participación en cualquier número de acontecimientos posteriores, de tal manera que un evento posterior prepara un sustrato para la participación en la realización de un evento anterior, creando de este modo una cascada cíclica, tal como se representa en las Figuras 7 y 25, en donde tales cascadas cíclicas se puede emplear para amplificar una señal, por ejemplo, en aplicaciones en las que la baja abundancia de una diana puede no proporcionar de otro modo una señal que sea detectable.

Una cascada de amplificación de efecto detectable puede comprender uno o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzimas proteicas, o una o más enzimas ancladas a un soporte, o cualquier combinación de las mismas.

Con referencia a la Figura 2, la estrategia 3 muestra una visión general de un método de uso de una MNazima para amplificar una señal a través del uso de una cascada de señales. Esto se comenta con más detalle con referencia a las Figuras 6, 7 y 25.

La Figura 6 representa un método ilustrativo de una detección con MNazima de la diana acoplada con amplificación de la señal mediada por enzima. Como se discutió anteriormente, la invención proporciona métodos para el uso de detección con MNazima en donde se amplifica una diana así como los métodos en donde se amplifica una señal generada. En algunas realizaciones, la combinación de la tecnología de MNazima con las estrategias de amplificación de señales proporciona una alternativa a los análisis con MNazima combinados con amplificación de la diana, aunque en algunos casos se pueden utilizar juntas tanto la amplificación de la diana como la amplificación de la señal. Los métodos preferidos para amplificar las señales implican mecanismos en cascada, que, como apreciará el experto en la técnica a menudo están implicados en la amplificación de señales en los sistemas biológicos.

Varios ejemplos de las cascadas de amplificación, que utilizan ácidos nucleicos catalíticos, son conocidos en la técnica y se contemplan para uso en la presente memoria. Las cascadas de ligación (Paul y Joyce, 2004) utilizan una primera ribozima (A) que liga dos oligonucleótidos que contienen ARN para formar una segunda ribozima (B). La ribozima (B) a continuación liga dos oligonucleótidos que contienen ARN distintos para formar una nueva primera ribozima (A), lo que desencadena una reacción en cascada.

Una segunda cascada de amplificación adecuada para uso en la presente memoria utiliza moléculas de ADNzima/sustrato circularizada (Levy y Ellington, 2003). Un ADNzima (A) es inactiva cuando es circular, pero se activa mediante linealización por una segunda ADNzima (B), que escinde la ADNzima circular (A). La ADNzima lineal activa (A) y escinde a continuación las moléculas de ADNzima circular (B) linealizándolas y activándolas de ese modo. Las dos ADNzimas capaces de escindir/linealizar cada una de las otras da como resultado una cascada de actividad de ácido nucleico catalítico.

Los expertos en la técnica entenderán que están disponibles otros enfoques - que combinan por ejemplo, el uso de ADNzimas con la versatilidad de los aptámeros y/o con el poder catalítico de las enzimas proteicas tradicionales (véase, p. ej. Zhang et al., 2005). El método de Zhang da como resultado la liberación de una enzima proteica que puede, a su vez, catalizar la formación de moléculas detectables generando y amplificando de este modo la señal. El enfoque de Zhang permite la detección sensible, pero es costoso, ya que requiere moléculas altamente

personalizadas para cada análisis. Los métodos para el acoplamiento de péptidos a los ácidos nucleicos son conocidos en la técnica (véase, p. ej. Cheng et al., 1993), puesto que son métodos para anclar ADN a las estructuras de soporte. Por ejemplo, Asher (PCT/US96/02380) describió la inmovilización de una enzima (ribozima) en un soporte insoluble, que después de la liberación, escindía un sustrato iniciando de este modo la amplificación de una señal utilizando dos ribozimas separadas espacialmente.

Otros ejemplos de amplificación de la señal para métodos *in vitro* son conocidos en la técnica, y sin embargo, se pueden crear otras estrategias para amplificar señales utilizando técnicas similares a las que han demostrado tener éxito. Por ejemplo, el análisis de ADN ramificado (ADNb) (Urdea, 1993) amplifica una señal mediante el empleo de una molécula informadora secundaria (por ejemplo, fosfatasa alcalina) anclada a sondas marcadas que median la reacción. La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) emplea la amplificación electrónica de la señal (Eigen y Rigler, 1994). La amplificación de la señal de tiramida (TSA) (Bobrow et al., 1989. Adams, 1992; Raap et al., 1995; Van Gijlswijk et al., 1997), utiliza peroxidasa de rábano picante para convertir la tiramisida a su forma activa, que se une a los residuos de tirosina en las proteínas. Las TSA se utiliza para diversas aplicaciones de inmunoquímica celular. El análisis Invader (Hall et al., 2000) emplea dos oligonucleótidos que se unen a una secuencia diana de una manera que permite la escisión de nucleasa que conduce a más de 1.000 eventos de escisión por molécula diana a lo largo del tiempo, y la reacción de escisión se puede acoplar a un sonda fluorescente. Sin embargo, existen limitaciones para los métodos de amplificación de señales conocidos. Por ejemplo, el análisis de ADNb no es tan sensible como los métodos de amplificación de la diana.

De este modo, con una mayor atención a la Figura 6, se muestra un ejemplo de un método que emplea una enzima liberada por MNAzimas como parte de una estrategia de amplificación de la señal. La señal puede ser generada, p. ej., mediante escisión enzimática de un sustrato entre un radical fluoróforo y un radical extintor, permitiendo de este modo que se genere una señal. Las enzimas contempladas para su uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ADNzimas, MNAzimas, ribozimas, y enzimas proteicas con actividad medible, tales como proteasas, endonucleasas de restricción y otras enzimas hidrolíticas. Las dianas preferidas son secuencias de ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN, humano, animal, vegetal, viral o bacteriano. Otras dianas preferidas pueden incluir, priones, levaduras u hongos, o cualquier otra molécula, por ejemplo, incluyendo pero no limitadas a glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinaciones de los mismos.

Como se puede observar en la Figura 6, una enzima ilustrativa, denominada en la presente memoria "Enzima" está anclada a un primer soporte insoluble, a través de una molécula escindible, preferiblemente un ácido nucleico. Como se muestra en el ejemplo en la Figura 6, la molécula escindible que actúa como anclaje para la enzima "Enzima" es un sustrato de MNAzima genérico o universal. También anclado a un soporte insoluble, que no está en contacto con el primer soporte insoluble, hay un sustrato de "anclaje escindible" para la enzima "Enzima". La "Enzima" es cualquier enzima con una actividad detectable, por ejemplo una MNAzima, ADNzima, ribozima, o enzima proteica como se ha descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, las MNAzimas o las ADNzimas son particularmente útiles. En presencia de los componentes oligonucleotídicos, o partzimas, que se autoensamblan para formar una MNAzima capaz de escindir el sustrato universal o genérico, y en presencia de la diana para la MNAzima, se forma la MNAzima y escinde catalíticamente la "Enzima" del soporte, liberándola de este modo y permitiendo que acceda al sustrato de "anclaje escindible" y se una a él. La escisión de "anclaje escindible" libera el fluoróforo del sustrato anclado. El fluoróforo se detecta y se mide fácilmente.

La separación física de una enzima inmovilizada o anclada a partir de su sustrato, que también está preferiblemente inmovilizado o anclado a un soporte, es referida a veces en la presente memoria como "separación espacial". Una o más enzimas pueden estar "separadas espacialmente" de sus respectivos sustratos, y entre sí. Se puede producir una cascada de amplificación de la señal, concretamente cuando la escisión del sustrato para la primera enzima libera la segunda enzima, que a su vez libera más primera enzima cuando se escinde el sustrato para la segunda enzima (véase la Figura 7).

En realizaciones preferidas, el sustrato para la enzima "Enzima" es un sustrato bifuncional como se ha mostrado, que comprende tanto una porción extintora como una porción detectable. Se prefieren particularmente las realizaciones en donde el sustrato para la enzima "Enzima" es una molécula con una no señal detectable, mientras que el sustrato no es escindido, y cuya señal detectable aumenta en uno a muchos órdenes de magnitud tras la escisión.

Con referencia ahora a la Figura 7, se muestra un ejemplo de un análisis que utiliza MNAzimas y una de amplificación que utiliza dos enzimas "separadas espacialmente". También se puede generar una cascada de amplificación de la señal utilizando tales ADNzimas "separadas espacialmente" como se describió anteriormente. Un evento de escisión con MNAzima inicial escinde un sustrato anclado inmovilizado, liberando de este modo una ADNzima A. La ADNzima A migra a continuación a una segunda secuencia en la que está fijada una segunda ADNzima B. La ADNzima A libera la ADNzima B que, a su vez, libera más ADNzima A. Se inicia una cascada que da como resultado la amplificación de la señal. En diversas realizaciones, la diana pueden ser secuencias de ácidos nucleicos que incluyen, pero sin limitarse a, ADN o ARN humana, viral, bacteriano; o la diana pueden ser proteínas, virus, priones, anticuerpos, células enteras o moléculas pequeñas.

En particular, se puede observar a partir del ejemplo de la Figura 7 que la ADNzima A está anclada a un soporte a través de un primer sustrato de MNAzima universal o sustrato genérico, que también es escindido por la ADNzima B. La ADNzima B está anclada a un soporte insoluble a través de un segundo sustrato genérico que es un sustrato para la ADNzima A. Ambas ADNzimas se mantienen de tal manera que sus respectivos sustratos son inaccesibles para las mismas. En presencia de las partzimas que se autoensamblan para formar una MNAzima que escinde el sustrato universal y en presencia adicional de la diana, se forma la MNAzima y escinde el sustrato de MNAzima universal que retiene la ADNzima A, liberando de este modo la ADNzima A. La ADNzima puede migrar ahora al segundo sustrato genérico. Tras la escisión del segundo sustrato genérico por la ADNzima A, la ADNzima B se libera junto con su señal detectable anclada, mostrada aquí como fluoróforo F. Ahora el fluoróforo F es detectable a medida que se separa de una porción extintora Q retenida. La ADNzima B liberada, ahora capaz de acceder a su sustrato lo hace, escindiéndolo (el primer sustrato genérico) y liberando de este modo ADNzima A adicional, que a su vez libera más ADNzima y señal detectable F. De este modo, se establece una poderosa cascada de amplificación de la señal B, con cantidades exponencialmente crecientes de señal F detectable.

Un ejemplo de una cascada de MNAzima que utiliza partzimas fijadas, se puede entender mejor mediante la referencia a la Figura 25. Las MNAzimas se pueden utilizar para iniciar cascadas de amplificación de la señal como se ilustra en este diagrama. La reacción contiene los siguientes elementos: (i) partzimas para la MNAzima 1 que están libres en disolución, (ii) un facilitador del ensamblaje para las MNAzimas 2 y 3 (que tienen los mismos brazos sensores) que o bien está libre en disolución (como se ilustra) o bien está fijado a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1; (iii) partzimas para la MNAzima 2 que están fijadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 1. Sub 1 puede ser escindido o bien por la MNAzima 1 (en presencia de un analito diana) o bien por la MNAzima 3 (en presencia de un facilitador del ensamblaje), y la escisión da como resultado la liberación de las partzimas para la MNAzima 2 en disolución; (iv) partzimas para la MNAzima 3 que están fijadas a un soporte insoluble por el sustrato, Sub 2. Sub 2 puede ser escindido por la MNAzima 2 (en presencia del facilitador del ensamblaje) y la escisión da como resultado la liberación de las partzimas para la MNAzima 3 en disolución; (v) Sub 2-FQ, que tiene la misma secuencia que Sub 2, pero está libre en disolución y está doblemente marcado con un fluoróforo (F) y un extintor (Q). Sub 2-FQ puede ser escindido por la MNAzima 2 para generar una señal fluorescente.

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

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

La generación de señales mediada por MNAzima permite discriminar entre secuencias de ácidos nucleicos totalmente coincidentes y aquellas que contienen emparejamientos erróneos. Esta capacidad permite utilizar las MNAzimas para la detección, identificación y cuantificación de ácido nucleico metilado.

Las alteraciones en el patrón de metilación se producen con frecuencia en asociación con enfermedades tales como el cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, y trastornos psiquiátricos. La gran mayoría de los protocolos usados actualmente para el análisis de la metilación comienzan con la modificación con bisulfito de ADN genómico. La modificación con bisulfito convierte las citidinas no metiladas, pero no las metiladas, en uridinas. Si el ácido nucleico modificado bisulfito se amplifica a continuación, por ejemplo mediante PCR, las uridinas son remplazadas por timidinas y la citidina metilada es remplazada por citidina. Los amplicones modificados se pueden analizar por diversos métodos que permiten la discriminación de las secuencias que contienen T (en posiciones que originalmente contenían C no metilada) y C (en posiciones que originalmente contenían C metilada).

La capacidad para que las MNAzimas discriminen entre variantes de secuencia estrechamente relacionadas hace esta tecnología muy adecuada para discriminar entre las secuencias modificadas con bisulfito que originalmente eran metiladas o no metiladas. El enfoque se puede entender mejor mediante la referencia al ejemplo 11.

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

El uso de un brazo estabilizador con una partzima que tiene un brazo sensor truncado ha sido empleado para demostrar la capacidad de las MNAzimas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido presentes en los facilitadores del ensamblaje (Ejemplo 22). Bajo las condiciones experimentales usadas en ese ejemplo, una partzima con un brazo sensor truncado (cinco base) era funcional a una temperatura muy por encima de su temperatura de fusión esperada. Los sistemas con brazos estabilizadores, y las partzimas que tienen brazos sensores truncados, son muy sensibles a pequeños cambios en la diana, y son susceptibles de uso a temperaturas muy rigurosas. Esta estrategia de detección se puede extender adicionalmente para discriminar directamente entre dianas, que, o bien

están metiladas o bien no están metiladas en residuos de citosina específicos, sin la necesidad de una modificación con bisulfito previa.

5 La presencia de una o varias 5-metilcitosinas aumenta la temperatura de fusión del ADN en 1,3°C por base metilada, con respecto a las una o más citosinas no metiladas. Cuando las partzimas, un brazo estabilizador, y un sustrato se incuban a una temperatura, que es adecuada para la hibridación y el ensamblaje de una MNAzima activa en presencia de una diana metilada, pero que es demasiado elevada para el ensamblaje de la MNAzima en presencia de una diana no metilada, se generaría una señal solamente en presencia de la diana metilada. Esto proporciona una nueva estrategia para el análisis directo de los patrones de metilación que pueden proporcionar un método para la detección de bases de metilación como marcadores del cáncer y otras enfermedades.

10 Por lo tanto, los expertos en la técnica apreciarán y entender fácilmente se contempla que la optimización de los parámetros experimentales, incluyendo la temperatura como se describe en la presente memoria se encuentra dentro de alcance de los métodos de la presente invención, y que tal optimización encuentra particular aplicación en el funcionamiento de los métodos relativos a la detección de ADN metilado, ya sea directamente o después de la modificación con bisulfito.

15 **13. Métodos para la detección e identificación de variantes de secuencias de ácido nucleico**

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

20 Las variaciones de secuencia susceptibles de detección por los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, adiciones, deleciones, sustituciones, conversiones, duplicaciones, translocaciones, variantes de secuencia por desplazamiento del marco, variantes de secuencia sin sentido, o cualquier combinación de las mismas.

25 Los métodos se pueden aplicar en cualquier situación en la que es deseable para detectar y/o identificar una variación de secuencia de ácido nucleico, incluyendo, pero no limitada a, el diagnóstico de enfermedades o predisposiciones a las mismas, la identificación de polimorfismos, o la evaluación de la fidelidad de la replicación del ácido nucleico. Adicionalmente, también se pueden detectar alteraciones mayores tales como translocaciones asociadas con diversos tipos de cáncer, que dan como resultado transcritos de fusión. Estos ocurren con frecuencia en asociación con la leucemia. Por ejemplo, los transcritos de fusión *PML/RAR α* se asocian con la leucemia promielocítica aguda y los transcritos de fusión *bcr/abl* están asociados con la leucemia granulocítica crónica.

30 La detección de la diana mediada por MNAzima se puede producir a través del reconocimiento de bases de Watson-Crick de los brazos sensores de la partzima y el facilitador del ensamblaje. El requerimiento de complementariedad puede ser explotado para detectar pequeñas variaciones de la secuencia, incluyendo pero no limitadas a, emparejamientos erróneos de una sola base entre el brazo sensor de la partzima y el facilitador del ensamblaje. La capacidad para la discriminación de las variantes de secuencia se puede entender mejor mediante la referencia a los ejemplos 5, 19 y 22.

35 Esos ejemplos demuestran todos la capacidad de las MNAzimas para discriminar entre situaciones en las que el brazo sensor y el facilitador del ensamblaje están totalmente emparejados, y situaciones donde hay al menos un emparejamiento erróneo o polimorfismo de una sola base.

40 La capacidad para discriminar emparejamientos erróneos de una sola base depende de varios factores, incluyendo (a) la rigurosidad de las condiciones de reacción, que puede estar influida por muchos factores incluyendo la temperatura, la concentración de sal, la concentración de cationes, (b) el tipo de emparejamiento erróneo, (c) la posición del emparejamiento erróneo dentro del brazo partzima, y (d) la longitud del brazo de la partzima. Dependiendo de la aplicación, la rigurosidad de la reacción se puede ajustar para que sea o bien intolerante, o bien tolerante, a cierto grado de emparejamiento erróneo entre el brazo sensor y el facilitador del ensamblaje. Las condiciones rigurosas permiten la discriminación de las variantes de secuencia estrechamente relacionadas, tales como una diferencia de un solo nucleótido. Las condiciones menos rigurosas pueden no discriminar entre los facilitadores del ensamblaje con secuencias estrechamente relacionadas. Por lo tanto, esto podría ser explotado para detectar simultáneamente un grupo de secuencias estrechamente relacionadas en una sola reacción con una sola MNAzima.

50 La discriminación de los polimorfismos de un único nucleótido se puede extender mediante el uso de partzimas con los brazos sensores truncados (Figura 23 y Ejemplo 22). Los brazos sensores truncados se pueden estabilizar por medio de un componente estabilizador, que aunque es una molécula separada, puede ser considerado como un segundo componente de la partzima truncada, a la que se une adyacentemente.

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

55 La presente invención incluye métodos para la detección de bacterias, virus o cualquier otro microorganismo, por ejemplo, a través del diseño del brazos sensores de MNAzima que se adaptan para hibridar con cualquier molécula

tal como un ácido nucleico que es único para el microorganismo que se pretende detectar, identificar y/o cuantificar. Adicionalmente o alternativamente, se puede detectar una clase de microorganismo, p. ej., incluyendo, pero no limitado a una bacterias Gram positiva o Gram negativa. Otras variaciones de los métodos que están dentro del alcance de la contemplación del experto en la técnica incluyen, pero se limitan a, el uso de un aptámero adaptado para unirse a una proteína, molécula pequeña, célula, componente celular o producto celular, tal como toxina que es única para el microorganismo que se desea detectar, identificar y/o cuantificar.

Las bacterias y los virus contienen ADN y/o ARN que puede proporcionar un molde para su identificación, detección y/o cuantificación rápida y sensible utilizando la tecnología de la MNAzima. La variación de secuencia entre las especies y cepas bacterianas y virales se puede utilizar para permitir la discriminación sensible entre especies y cepas individuales. Los enfoques con MNAzima múltiplex son particularmente preferidos para la detección y/o la discriminación simultánea de múltiples especies, cepas o productos aislados bacterianos o virales.

Alternativamente, las regiones de similitud de secuencia entre especies y cepas bacterianas o virales se pueden utilizar para identificar la presencia o ausencia de cualquiera de un grupo de especies y cepas individuales en un análisis con una sola MNAzima. Este último enfoque se ilustra en el Ejemplo 15, en donde se utilizó una región conservada encontrada en la secuencia 16S ribosomal bacteriana como base de un análisis para reemplazar el ensayo bacteriano de una tinción de Gram por un ensayo de liberación rápida para determinar la esterilidad y/o contaminación por micoplasma.

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

20 15. Kits

La presente invención 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 invención contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el método. Por ejemplo, en una realización, un kit puede comprender un primer recipiente que contiene al menos un primer y un segundo componentes oligonucleotídicos que comprenden una primera y una segunda partzima, y un segundo recipiente que comprende un sustrato, en donde el autoensamblaje de las primera y segunda partzimas, y el sustrato, en una MNAzima requiere la asociación de un facilitador del ensamblaje presente en una muestra de ensayo. Por consiguiente, en dicha realización, las primera y segunda partzimas, y el sustrato, se pueden aplicar a la muestra de ensayo con el fin de determinar la presencia del facilitador del ensamblaje, en donde el facilitador del ensamblaje comprende la diana.

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

En el contexto de la presente invención, un kit compartimentado incluye cualquier kit en donde los reactivos están contenidos en recipientes separados, y puede incluir pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o de papel. Tales recipientes pueden permitir la transferencia eficaz de reactivos de un compartimento a otro compartimento al tiempo que se evita la contaminación cruzada de las muestras y reactivos, y la adición de agentes o disoluciones de cada recipiente de un compartimento a otro de una manera cuantitativa. Tales kits también pueden incluir un recipiente que aceptará la muestra de ensayo, un recipiente que contiene los reactivos utilizados en el análisis, recipientes que contienen reactivos de lavado y recipientes que contienen un reactivo de detección. Típicamente, un kit de la presente invención también incluirá instrucciones para el uso de los componentes del kit para llevar a cabo los métodos apropiados. Los kits y métodos de la invención se pueden utilizar junto con el equipo y los sistemas de análisis automatizado, p. ej., incluyendo pero no limitados a, máquinas para PCR en tiempo real.

Para su aplicación en la detección, identificación o cuantificación de diferentes dianas, puede ser aplicable un único kit de la invención, o, alternativamente, se pueden requerir diferentes kits, que contienen por ejemplo reactivos específicos para cada diana. Los métodos y kits de la presente invención encuentran aplicación en cualquier circunstancia en la que sea deseable detectar, identificar o cuantificar cualquier entidad.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos, que no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención.

50 EJEMPLOS

En los siguientes ejemplos, se adaptaron diversos diseños de MNAzima, basados en la división del núcleo catalítico de cualquiera de las ADNzimas 10:23 u 08:17, para una variedad de ácidos nucleicos y sustratos diana (Tabla 3). Estos sistemas de sustrato diana se han sometido a ensayo en una variedad de condiciones de reacción y han demostrado su solidez.

Los ejemplos de los diseños de MNAzimas y partzimas específicas utilizadas en los siguientes ejemplos se enumeran en la Tabla 3. Las partzimas se nombran de manera que el nombre (p. ej., R04A1/1) incorpora la

referencia al dominio diana (p. ej., RO4 para el exón 4 de RPLPO), el dominio requerido para la actividad catalítica de la MNAzima (p. ej., A1) y el dominio de sustrato (p. ej., 1 para SubBi-1).

Tabla 3: MNAzimas y sustratos ilustrativos. Partzimas específicas utilizadas en los ejemplos de trabajo

Diseños de MNAzima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
1 (8:17)	A1: B1	RO4A1/1: RO4B1/1 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
2 (8:17)	A1: B2	RO4A1/1: RO4B2/1 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
3 (8:17)	A1: B3	RO4A1/1: RO4B3/1 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (9,10)
4 (8:17)	A2: B3	RO4A2/1: RO4B3/1 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 y 4 (10,14)
		miR20A2/1: miR20B3/1 MiR-20 SubBi-1-FB (1)	2, 5 y 6 (11,12,15,16)
		AtpA2/1: Atp B3/1 ATP y dATP SubBi-1-FB (1)	18
		TaqA2/1: AtpB3/1 Polimerasa Taq SubBi-1-FB (1)	21
		miR143 A2/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
		miR143 A2/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12

ES 2 431 076 T3

Diseños de MNAzima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
		miR143 A2H/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
		miR143 A2H/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
5 (10:23)	A3: B4	RO5A3/2: RO5B4/2 exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)
6 (10:23)	A4: B5	RO5A4/2: RO5B5/2 exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-3-FB (3)	8 (17)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-3-Q6B2 (3)	13
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-3-JB (3)	9 (19)
		RO5A4/4-P: RO5B5/4-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-4 JB (4)	14
		RO5A4/2-P: RO5B5 (16)/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO5A4/2-P: RO5B5/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2 (2)	24

ES 2 431 076 T3

Diseños de MNazima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
		miR20A4/2: miR20B5/2 miR-20 SubBi-2-FB (2)	9 (19)
		PCR7aA4/2-P: PCR7aB5/2-P Let-7 bis SubBi-2-FB (2)	10
		BaA4/2-P: BaB5/2-P B-actina SubBi-2-JB (2)	13
		BaA4/7-P: BaB5/7-P B-actina SubBi-7-FB (7)	14
		BCRA4/6-P: BCRB5/6-P BCR SubBi-6-TRB2 (6)	13 y 14
		HPRTA4/7-P: HPRTB5/7-P HPRT SubBi-7-FB (7)	13
		HPRTA4/2-P: HPRTB5/2-P HPRT SubBi-2-A350B (2)	14
		RO4A4/3-P: RO4B5/3-P exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-3-Q6B2 (3)	14
		RP4A4/3-5b: RO4B5/3-3b exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-3-FB (3)	24
		NefA4/6-P: NefB5/6-P VIH-1 Nef SubBi-6-TRB2 (6)	16

ES 2 431 076 T3

Diseños de MNAzima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
		XdA4/2-P: XdB5/2-P Xd SubBi-2-FB (2)	22 (23)
7 (10:23)	A5: B6	p16A53-P: p16B6/3-P p16 SubBi-3-FB (3)	11
		16S1A5/2-P: 16S1B6/2-P Bacteriano ribosomal 16 S SubBi-2-FB (2)	15
		ROA5/2 (22)-P: RO5B6/2 (11G)-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2 (22)-P: RO5B6/2 (11C)-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2 (22)-P: RO5B6 (16)/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO4A5/2: RO4B6/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-G14A: RO4B6/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-A12T: RO4B6/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-A11T: RO4B6/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17

ES 2 431 076 T3

Diseños de MNAzima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
		RO4A5/2-A9T: RO4B6/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2: RO4B6/2-C7A exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2: RO4B6/2-T4C exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5 (18)/2-P: RO4B6 (19)/2-P exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5 (18)/2-RA9-P: RO4B6 (19)/2-P exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5 (18)/2-RG14-P: RO4B6 (19)/2-P exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4rA5 (18)/2: RO4B6 (19)/2-P exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4A5 (18)/2-P: RO4rB6 (19)/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4rA5 (18)/2: RO4rB6 (19)/2 exón 4 de RPLPO (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
8 (10:23)	A6: B7	RO5A6 (22)/2-P: RO5B7 (16)/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20

Diseños de MNAzima (núcleo catalítico)	Partzimas A y B	Sustratos diana de Partzimas específicas	Ejemplos (Figuras)
9 (10:23)	A7: B8	RO5A7 (22)/2-P: RO5B8 (16)/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
10 (10:23)	A8: B9	RO5A8 (22)/2-P: RO5B9 (16)/2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
11 (10:23)	A9: B10	RO5A9 (22)/2-P: RO5B10 (16) 2-P exón 5 de RPLPO (RO5) SubBi-2-FB (2)	20

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

1.1. Oligonucleótidos de la partzima

5 Se sometieron a ensayo cuatro diseños para MNAzimas (Figuras 8-10) basados en la ADNzima 08:17 se. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias del brazo sensor (unión a la diana) designadas por "N" pueden ser remplazadas por secuencias específicas de la diana para cualquier diana de ácido nucleico conocida (Figuras 8-10). Las secuencias del brazo para el sustrato, que se unen al sustrato informador, pueden ser genéricas y utilizarse para muchas dianas. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias sustrato designadas por "N" en las Figuras 8-10 se pueden remplazar por secuencias químéricas de ADN, ARN o ADN/ARN y aquellas designadas por r se pueden remplazar por otra y/o un número diferente de secuencias de ribonucleótidos.

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

SEC ID NO: 1: Partzima A1 RO4A1/1:

GCTGGTCATCCAGCACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 2: Partzima A2 R04A2/1:

20 **GCTGGTCATCCAGCAGCGGTCGAAATAGTGAGT**

SEC ID NO: 3: Partzima B1 RO4B1/1:

*CATCTCTTCTCCGTCGAA***GTGTTGACAATGGC**

SEC ID NO: 4: Partzima B2 RO4B2/1:

*CATCTCTTCTCCG***GTGTTGACAATGGC**

25 SEC ID NO: 5: Partzima B3 R04B3/1:

*CATCTCTTCTCCGAGC***TTGTTGACAATGGC**

1.2. Sustrato informador

30 La actividad de la MNAzima se controla mediante la escisión de un sustrato informador de ácido nucleico doblemente marcado. La secuencia sustrato es una secuencia químérica que contiene bases tanto de ARN como de ADN que se ha utilizado previamente como un sustrato de ADNzima 08:17 (Li et al., 2000). En el ejemplo actual, el sustrato informador se designa SubBi-1-FB y tiene marcas internas, es decir, 6-carboxifluoresceína ("6-FAM")

anclada a un nucleótido 5' con respecto a la base de ARN, y un radical Black Hole Quencher Negro 1 ("BHQ1") anclado a un nucleótido 3' con respecto a la base de ARN. La escisión de SubBi-1-FB por las MNAzimas se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia marcada de SubBi-1-FB es la siguiente, de 5' a 3', indicando las bases subrayadas la posición de los radicales 6-FAM y BHQ1. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 6: SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATT

1.3 Secuencia de MNAzima de control

El control de la hibridación (MNAzima inactiva) se inactivó mediante la mutación de una sola base en el oligonucleótido A1 que es esencial para la formación del núcleo catalítico. Aunque tanto el sustrato informador como las secuencias diana todavía se pueden unir a las MNAzimas, el sustrato no puede ser escindido debido a la modificación en el núcleo catalítico de la MNAzima. La unión del sustrato informador a las moléculas de partzima podría en sí misma generar una medición de la fluorescencia debido al cambio conformacional del sustrato informador después de la hibridación. Se incluyó un control que utiliza una molécula de partzima A1 mutada (RO4A1mut) y se denominó Control de Hibridación. La secuencia de MNAzima mutada se ilustra a continuación y la posición de la base de G que se cambió por T está subrayada.

SEC ID NO: 7: Partzima A mutante

RO4A1mut/1: GCTGGTCATCCAGCACGGTCIAAATAGTGAGT

1.4. Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido, DianaRO4/1, que tiene la misma secuencia que una sección del exón 4 del gen de RPLPO humano. La secuencia de DianaRO4/1 es la siguiente, escrita de 5' a 3'.

SEC ID NO: 8 DianaRO4/1:

GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

Para garantizar que una señal no puede ser detectada cuando se encuentra presente una secuencia diana incorrecta se determinó el efecto "fuera de diana" mediante el uso de 3 mg de ADN lambda (Promega) o un oligonucleótido de control negativo sintético de una secuencia no relacionada (DianaRO4/1mut).

SEC ID NO: 9 DianaRO4/1mut:

CGACCATTAGGTCGTCCACAAGCTGTTACCG

1.5. Componentes de la reacción

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

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

Diseño	Reacción con MNAzima	Partzimas		Objetivo	Figura
		A	B		
1	Diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B1/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mM	Figura 8
	Sin diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B1/1 1 mM	H ₂ O	
2	Diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B2/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mM	
	Sin diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B2/1 1 mM	H ₂ O	
3	Diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mM	Figura 9
	Sin diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	H ₂ O	
	Fuera de diana 1	RO4A1/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mMmut	
	Fuera de diana 2	RO4A1/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	3 mu g ADN Lambda	
	Control de hibridación	RO4A1mut/1 1 mM	1 mM Ro4B3/1	DianaRO4/1 1 mM	
	Solo Partzima A	RO4A1/1 1 mM	-	DianaRO4/1 1 mM	
3	Diana	RO4A1/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mM	Figura 10
	Sin diana	RO4A1/1	RO4B3/1 1 mM	H ₂ O	
4	Diana	RO4A2/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	DianaRO4/1 1 mM	Figura 10
	Sin diana	RO4A2/1 1 mM	RO4B3/1 1 mM	H ₂ O	
Todo	Fondo	-	-	-	-

5 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante un experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe que varían entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

1.6. Resultados: Detección de la escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

10 El diseño de las MNAzimas 1 y 2 mostró poca evidencia de escisión dependiente de la diana del sustrato informador en las condiciones de este experimento (Figura 8). La fluorescencia fue similar para las reacciones con y sin, oligonucleótido RPLPO diana. La adición del oligonucleótido RPLPO diana dio como resultado un aumento de la fluorescencia para el diseño 3 (Figura 9 y 10) y el diseño 4 (Figura 10). Esto es consistente con la formación de MNAzimas activas en presencia de ácido nucleico diana lo que da como resultado la escisión del sustrato informador entre el par colorantes de fluoróforo y extintor causando un aumento en la fluorescencia. La fluorescencia de los
15 controles sin diana fue menor que en las reacciones que contenían diana y ninguna de las reacciones de control mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo (Figuras 8-10). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de una MNAzima catalíticamente activa que escinde a continuación el sustrato informador. La eficacia de escisión del diseño 4 fue mayor que la del diseño 3 para el sistema RPLPO (Figura 10).

Las reacciones de control fuera de diana, de hibridación, solo de Partzima A y solo de Partzima B se muestran para

el diseño 3 (Figura 9). Los niveles de fluorescencia de estos controles fueron o bien inferiores o bien similares a los de las reacciones sin diana. Ninguna de las reacciones de control mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo. Estos resultados demuestran adicionalmente que la escisión del sustrato informador es dependiente de la presencia de los oligonucleótidos tanto de la Partzima A como de la Partzima B que se requieren para el ensamblaje de una MNAzima activa, así como la secuencia de ácido nucleico diana.

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

2.1. Oligonucleótidos de Partzima

La detección utilizando MNAzimas también se puede emplear para el análisis de miR. En este ejemplo, la MNAzima solo se forma cuando la secuencia de miR correcta está presente. Esta MNAzima puede distinguir entre secuencias miR relacionadas p. ej. hsa-miR-20 y hsa-miR-93.

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

SEC ID NO: 10: Partzima A2:

miR20A2/1:**TACCTGCACTAC**CGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 11: Partzima B3:

miR20B3/1:*CATCTCTTCT*CCGAGCT**AAGCACTTTA**

2.2. Sustrato informador

La actividad de la MNAzima se controla mediante la escisión de un sustrato informador de ácido nucleico doblemente marcado. El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical 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 controlaron a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID NO: 6: SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATT

2.3. Diana

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

SEQ ID NO: 12: DianaD-20:

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

2.4. Secuencias de control

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

SEQ ID NO: 13: DianaD-17-5p:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

SEQ ID NO: 14: DianaD-93:

AAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG

SEQ ID NO: 15: DianaD-106a:

AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGC

SEQ ID NO: 16: DianaD-106b:

TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT

2.5. Condiciones de reacción

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

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

Reacción con MNAzima	Molde	Partzima A	Partzima B
Diana	D-20 1 mM	miR20A2/1 1 mM	miR20B3/1 1 mM
No diana	H ₂ O		
Fuera de Diana17-5p	D-17-5p 1 mM		
Fuera de DianaD-93	D-93 1 mM		
Fuera de DianaD-106a	D-106a 1 mM		
Fuera de DianaD-106b	D-106b 1 mM		
Solo Partzima A	D-20 1 mM	miR20A2/1 1 mM	-
Solo Partzima B	D-20 1 mM	-	miR20B3/1 1 mM

15 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe éste que varía entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en cada pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

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

2.6. Resultados: Detección de la escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

20 Los oligonucleótidos de las partzimas A y B de la MNAzima se ensamblan para formar una MNAzima catalíticamente activa para escindir el sustrato informador solamente en presencia de la secuencia diana. En este ejemplo, los controles fuera de diana tienen tan solo dos bases emparejadas erróneamente con los brazos sensores (secuencia de unión de miR-20 diana). D-17-5 "fuera de diana" tiene dos bases emparejadas erróneamente, de las cuales solo una existe en la región más discriminatoria situada en el medio de la secuencia de miR-20. La reacción de escisión
 25 que contenía la secuencia diana D-20 produjo un aumento de 26 veces en la señal en comparación con el control sin diana (Figura 11 (iii)). Esto se compara con los controles fuera de diana, D-17-5p y D-106a, que producen un aumento de 3,5 veces en la señal en comparación con el control sin diana, y D-93 y D-106b que no producen aumento de la señal en comparación con el control sin diana (Figura 11 (iii)). De este modo, la diferenciación de D-20 a partir de secuencias relacionadas demuestra la capacidad del sistema de MNAzimas para discriminar
 30 secuencias que difieren por solo unas pocas bases. Estudios anteriores utilizando ADNzimas uni-moleculares han demostrado que las ADNzimas tienen la capacidad para distinguir mutaciones de una sola base (Impey et al., 2000). Las MNAzimas también permiten la discriminación de cambios de una sola base (véase el ejemplo 5 a continuación).

Los controles "Solo con partzima A" y "solo con partzima B" tuvieron una fluorescencia similar a la de la fluorescencia de fondo (datos no mostrados).

35 El uso de enzimas proteicas requiere de otros reactivos en la reacción para estar en concentraciones que sean

5 óptimas para la actividad de enzimas proteicas. Por ejemplo, la concentración del cofactor de iones metálicos que ayuda a una ADNzima en la escisión del sustrato informador se mantiene a un mínimo en los protocolos que utilizan enzimas de tipo polimerasas. La detección directa utilizando MNAzimas no requiere ninguna enzima proteica y por lo tanto las condiciones de reacción se puede optimizar para la rápida escisión del sustrato. En estas reacciones, el cofactor iónico metálico p. ej., Mg^{2+} se puede aumentar para optimizar la velocidad catalítica de la MNAzima. La Figura 12 muestra cómo la concentración de $MgCl_2$ puede ser aumentada a niveles que normalmente no pueden ser tolerados en los protocolos de detección de dianas. A $MgCl_2$ elevada (100 mM) la eficiencia catalítica de la MNAzima es mayor. Por otra parte, cuando se detectaba DianaD-20 un aumento en $MgCl_2$ no afectaba a la especificidad de la reacción, ya que la DianaD-20 es aún claramente distinguible de las secuencias relacionadas DianaD-17-5p, DianaD-106a, DianaD-93, y Diana106b.

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

3.1. Oligonucleótidos Partzimas

15 Los diseños 5 y 6 para las MNAzimas, basados en la ADNzima 10:23, se sometieron a ensayo para determinar su actividad catalítica (Figura 13). Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias del brazo sensor (unión a la diana) designadas por "N" puede ser remplazadas por secuencias específicas de la diana para cualquier diana de ácido nucleico conocida. Las secuencias del brazo para el sustrato, que se unen al sustrato informador, pueden ser genéricas y utilizarse para muchas dianas. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias sustrato designadas por "N" en la Figura 13 pueden ser reemplazadas por secuencias quiméricas de ADN, ARN o ADN/ARN.

20 En los experimentos realizados para medir la actividad catalítica de las MNAzimas para RPLPO descritas en la Figura 13, las partzimas oligonucleotídicas A y B se diseñaron para dirigirse a exón 5 del gen de RPLPO. Las secuencias de las partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3', donde las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las secuencias que no están ni subrayadas, ni en negrita, ni en cursiva en el SEQ ID NO: 17 y el SEQ ID NO: 18 forman preferiblemente una estructura de tallo tal como la representada en la Figura 13 (véase, p. ej., Diseño 5).

SEC ID NO: 17 partzima A3 RO5A3/2:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCCGCACACGAGAGGAAACCTT

SEC ID NO: 18 partzima B4 RO5B4/2:

TGCCAGGGAGGCTAGCT**GCGGTGGAGACGGATTACACCTTC**

30 SEC ID NO: 19 partzima A4 RO5A4/2:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID NO: 20 partzima B5 RO5B5/2:

TGCCAGGGAGGCTAGCT**GCGGTGGAGACGGATTACACCTTC**

3.2. Sustrato informador

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

40 SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCg_uCCCTGGGCA

3.3 Secuencias diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido sintético DianaRO5/1 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. Esta secuencia diana tiene la misma secuencia que una sección del gen de RPLPO, exón 5.

45 SEC ID NO: 22 DianaRO5/1:

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

3.4. Componentes de la reacción

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de la señal fluorescente causado por la escisión del

5 sustrato informador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 mL. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 55°C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia de cada reacción se leyó cada 7 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones de la Tabla 6 contenían SubBi-2-FB 1 mM, Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) y MgCl₂ 25 mM.

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

Diseño	Partzima A (1 mM)	Partzima B (1 M)	Reacción con MNAzima	Diana
5	RO5A3/2	RO5B4/2	Diana	RO5/1 1 mM
			Sin diana	H ₂ O
6	RO5A4/2	RO5B5/2	Diana	RO5/1 1 mM
			Sin diana	H ₂ O

10 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe que éste varía entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

3.5. Resultados: Detección y escisión del sustrato

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

20 Ejemplo 4: Detección de amplicones a partir de la Amplificación mediante PCR in vitro de una secuencia de ácido nucleico utilizando MNAzimas

4.1. Oligonucleótidos de partzimas

25 Las MNAzimas también se pueden utilizar para detectar amplicones a partir de secuencias de ácido nucleico amplificadas *in vitro*. Para este ejemplo, la detección de los amplicados se realiza en forma de un proceso de dos etapas, pero también se puede realizar en una sola reacción. En este caso, los oligonucleótidos usados para detectar los amplicones se basaron en el diseño de 4 utilizando los oligonucleótidos RO4A2/1 y RO4B3/1 (Figura 10), que detecta el gen de RPLPO humano. Los oligonucleótidos de las partzimas A y B se enumeran a continuación. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases de *cursiva* hibridan con el sustrato.

30 SEC ID NO: 2 Partzima A2 RO4A2/1:

GCTGGTCATCCAGCAGCGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 5 Partzima B3 RO4B3/1:

CATCTCTTCTCGAGCGTGTTCGACAATGGC

4.2. Sustrato informador

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

SEC ID NO: 6 SubBi-2-FB:

40 ACTCACTATaGGAAGAGATG

4.3. Cebadores para la amplificación del gen de RPLPO humano mediante PCR

La secuencia diana para este ejemplo se generó mediante amplificación mediante PCR *in vitro* de la secuencia de el exón 4 del gen de RPLPO de ADN genómico humano extraído de la línea celular K562 (Promega), utilizando los cebadores de PCR enumerados a continuación.

5 SEC ID NO: 23 Cebador 5RO4/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

SEC ID NO: 24 Cebador 3RO4/2:

GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

4.4. Oligonucleótido diana de control

10 Se sintetizó un oligonucleótido y se utilizó como control positivo para la secuencia de RPLPO. El oligonucleótido de control no se amplificó mediante PCR en estos experimentos.

SEC ID NO: 8 DianaRO4/1:

GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

4.5. Componentes de reacción: amplificación mediante PCR del gen de RPLPO

15 La amplificación mediante PCR del gen de RPLPO se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 55°C durante 30 segundos. Todas las reacciones contenían 5RO4/3 40 nM y 3RO4/2 200 nM, MgCl₂ 3 mM, dNTP 200 mM cada uno, 1 x Immobuffer (Bioline) y 1 unidad de Immolasa (Bioline) con o sin 500 ng de ADN genómico humano K562 (Promega).

4.6. Componentes de Reacción: Detección de la secuencia diana

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

30 **Tabla 7: Componentes de reacción para la detección de amplicones de ADN de RPLPO después de la PCR in vitro. Los sistemas de MNAzima utilizaron el Diseño 4 (RO4A2/1: RO4B3/1)**

Reacción con MNAzima para RPLPO	Diana
Oligo diana (RPLPO de Control Positivo)	10 ¹² copias de Oligo DianaRO4/1
Producto PCR RPLPO diana (Ensayo)	5 ml de producto de PCR de RPLPO (equivalente a 100 ng de ADN genómico)
Sin diana (RPLPO Control Negativo)	5 ml de H ₂ O
ADN genómico no amplificado (Control Negativo)	5 ml que contienen 500 ng de ADN genómico

35 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe que éste varía entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

4.7. Resultados: Detección de la escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

El diseño 4 de MNAzima para la detección de RPLPO, exón 4, mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del

tiempo cuando la secuencia de RPLPO diana se amplificó a partir de ADN genómico humano mediante PCR (Figura 14). El aumento de la fluorescencia observado para los amplicones de RPLPO fue similar al observado para 10^{12} copias de los oligonucleótidos DianaRO4/1 control positivo. La fluorescencia de los controles sin diana fue menor que la de las reacciones que contenían diana y ninguna de las reacciones de control negativo mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contienen la diana se debe a un ensamblaje dependiente de la diana de una MNAzima catalíticamente activa que escinde a continuación el sustrato informador.

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

5.1. Oligonucleótidos de Partzimas

Se pueden utilizar MNAzimas para detectar amplicones de secuencias de ácido nucleicos amplificados *in vitro*. En este ejemplo se llevan a cabo la amplificación y detección en un proceso de tres etapas (Figura 5), pero la transcripción inversa, la amplificación mediante PCR y la detección también podrían ser realizadas simultáneamente en un único tubo de reacción. Para este ejemplo los oligonucleótidos empleados para detectar los amplicones utilizaron los oligonucleótidos de las partzimas A y B para miR, diseño 4 (Figura 11), que se diseñan para detectar hsa-miR-20. Los oligonucleótidos de las partzima de la MNAzima se enumeran más abajo de manera que las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID NO: 10 Partzima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 11 Partzima B3 miR20B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA

5.2. Sustrato informador

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

SEC ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGAIT

5.3. Cebadores de PCR para la amplificación de secuencias diana de oligonucleótidos D-20 de 22 unidades

La secuencia diana para este ejemplo se generó mediante amplificación *in vitro* del oligonucleótido20-D utilizando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación

SEC ID NO: 25 Cebador 5miR20/1:

ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEC ID NO: 26 Cebador 3miR20/L1:

CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

SEC ID NO: 27 Cebador 3miR20/P1:

CGAATGACGTACCTGCAC

5.4. Secuencias diana y controles

La secuencia de ADN (DianaD-20) con homología para miR-20 se utilizó como molde para la demostración de la amplificación y detección de una secuencia corta utilizando PCR y MNAzimas.

SEC ID NO: 12 DianaD-20:

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

Además, para garantizar que cualquiera de las secuencias "fuera de diana" estrechamente relacionadas amplificadas erróneamente no podrían ser detectadas con el sistema de miR-20, también se sometió a ensayo el oligonucleótido de ADN diana de control DianaD-17-5 con el sistema oligonucleotídico de partzimas A y B para miR-

20.

SEC ID NO: 13 DianaD-17-5p:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

5.5 Componentes de reacción: amplificación de la secuencia diana

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

5.6. Componentes de Reacción: Detección de secuencia diana

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

Tabla 8: Componentes de reacción para la detección de secuencias cortas de ácidos nucleicos (20-25 unidades) amplificadas in vitro. El sistema de MNAzima utilizó el Diseño 4 (miR20A2/1: miR20B3/1).

Reacción con MNAzima	Diana
Oligonucleótido Diana miR-20 (Control Positivo miR20)	10 ¹² Copias de DianaD-20 en 5 ml (no amplificada)
Producto PCR Diana miR-20 (Ensayo)	Producto de PCR D-20 (5 ml de de 25 ml de reacción) (Equivalente a 2 x 10 ⁷ copias de DianaD-20 amplificadas mediante PCR)
Oligonucleótido Diana miR-20 (Control no amplificado D-20)	10 ⁸ Copias de DianaD-20 en 5 ml (no amplificada)
Sin diana (Control negativo miR20)	5 ml H ₂ O
Fuera de diana (Control fuera de diana para miR20)	producto de PCR D-17-5p (5 ml de 25 ml de reacción) (equivalente a 2 x 10 ⁷ copias de DianaD-17-5p amplificada mediante PCR)

25 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

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

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

30 La fluorescencia del control sin diana fue menor que en las reacciones que contenían diana y ninguna de las reacciones de control negativo mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen la diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escinden el sustrato informador.

35 El control fuera de diana (D-17-5p) en este ejemplo también se amplificó con los cebadores miR-20, ya que solo tiene un emparejamiento erróneo en la posición terminal dentro de las regiones que hibridan con los cebadores miR-

20. La amplificación tanto de la DianaD-20 como de la DianaD-17-5p se confirmó mediante electroforesis. Puesto que ambos amplicones incorporan las secuencias cebadoras en sus extremos, ahora solo se diferencian en una sola base en el centro de los amplicones. La MNAzima discriminó satisfactoriamente entre los amplicones para D-20 y D-17-5p. Esta discriminación es el resultado de la diferencia de un único nucleótido en los amplicones para D-20 y D-17-5p en la región que se encuentra entre los cebadores como se ilustra en la Figura 15 (ii). La MNAzima requiere que las cuatro bases entre los cebadores estén presentes (lo que permite la discriminación entre dímeros de cebadores y amplicones auténticos) y esas cuatro bases deben ser exactas, sin tolerar sustituciones. Este ejemplo ilustra la capacidad de las MNAzimas para discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas, incluyendo aquellas que difieren solo en un polimorfismo de un único nucleótido.

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

6.1. Oligonucleótidos de Partzimas

15 Las MNAzimas se pueden utilizar para detectar amplicones de secuencias de ácido nucleico amplificadas *in vitro*. En este ejemplo, la amplificación y detección se realizan en un proceso de dos etapas (Figura 5) en donde la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR se producen en un primer tubo, seguido de la detección mediada por MNAzima en un segundo tubo. Para este ejemplo los oligonucleótidos usados para detectar los amplicones fueron de diseño 4, oligonucleótidos de partzimas A y B para miR (Figura 11), que están diseñados para detectar hsa-miR-20. Los oligonucleótidos de las partzimas de la MNAzima se enumeran más abajo de manera que las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID NO: 10 Partzima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 11 Partzima B3 miR20B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA

25 **6.2. Sustrato informador**

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

30 SEC ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATT

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

La secuencia diana para este ejemplo se generó mediante amplificación *in vitro* de ARN total de timo humano (Ambion) utilizando los cebadores oligonucleotídicos para PCR enumerados más abajo.

35 SEC ID NO: 25 Cebador 5miR20/1:

ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEC ID NO: 26 Cebador 3miR20/L1:

CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

6.4. Secuencias diana y controles

40 Se utilizó ARN total de timo humano (Ambion) como molde para la amplificación de miR-20 y los amplicones fueron detectados posteriormente utilizando MNAzimas (sección 6.6).

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

SEC ID NO: 28 DianaR-20:

45 uaaagugcuuauagugcaggua

6.5. Componentes de Reacción: Amplificación de la secuencia diana

La transcripción inversa y amplificación mediante PCR de la secuencia diana se llevaron a cabo en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 40°C durante 30 minutos, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 30°C durante 30 segundos (con un aumento de 2°C de temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 50°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 3miR20/L1 40 nM y 5miR20/1 200 nM, MgCl₂ 3 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 30 unidades de Transcriptasa Inversa MMLV (-H) (Promega), 1x Immobuffer (Bioline) y 0,5 unidades de Immolasa (Bioline) y o bien a) 1 mg del ARN total, b) sin diana (dH₂O) o c) 10¹⁴ copias (5 M) de oligonucleótido DianaR-20.

6.6. Componentes de Reacción: Detección de la secuencia diana

La detección de la secuencia diana se midió mediante un aumento de la señal fluorescente causado mediante la escisión del sustrato informador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 mL. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 40°C en un termociclador SmartCycler® System (Cepheid). La fluorescencia de cada reacción se leyó cada 30 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones de la Tabla 9 contenían la mezcla a granel de SubBi-1-FB 1 mM, partzima A 1 mM, partzima B1 mM, Tris HCl 50 mM (pH 9,0 a 25°C), MgCl₂ 25 mM y la diana (como se indica en la Tabla 9).

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

Reacción con MNAzima	Diana
Oligonucleótido de ARN de la Diana miR-20 (Control Positivo miR-20)	Producto de PCR de la DianaR-20 (5 ml de una reacción de 25 ml) (equivalente a 2 x 10 ¹³ copias de oligonucleótido DianaR-20 amplificado)
ARN total Diana miR-20 - (Ensayo)	Producto de la PCR (5 mL de una reacción de 25 ml) (equivalente a 200 ng de ARN total amplificado)
Sin ARN diana (Control negativo miR20)	Producto de PCR (5 mL de una reacción de 25 ml) de la reacción de "control sin diana" que contiene dH ₂ O.
ARN total no amplificado (Control negativo miR20)	El ARN total (1 mg) en un volumen total de 5 ml

Se midió el nivel de fluorescencia del fondo para cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir la comparación entre los pocillos.

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

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

La fluorescencia del control sin diana de ARN fue menor que en las reacciones que contenían diana de ARN, y ninguna de las reacciones de control negativo mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contienen diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana amplificada por PCR de las MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escinden el sustrato informador. Si bien este experimento se realizó en dos etapas (transcripción inversa/PCR continuación, detección del criterio de valoración de la MNAzima), todas las etapas podrían ser realizadas al mismo tiempo en un solo tubo de reacción permitiendo que la reacción se controle en tiempo real.

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

7.1. Cascadas de amplificación de señales iniciadas por MNAzimas

Es posible bajar el límite de detección de ácidos nucleicos mediante el acoplamiento de la detección de la MNAzima a una reacción en cascada de amplificación de señales, como se ilustra en la Figura 7. Las MNAzimas también permiten un mecanismo desencadenante altamente específico para la iniciación de una cascada.

7.2. Cascadas de ADNzimas separadas espacialmente

Las ADNzimas se pueden fijar a un soporte utilizando una variedad de métodos, que incluyen el anclaje a obleas de plástico recubiertas con estreptavidina que permiten el anclaje de ADNzimas marcadas con biotina. Las secuencias utilizadas para el anclaje también pueden servir como sustratos de MNAzima/ADNzima genéricos. Las dianas (p. ej.,
 5 secuencias de ácidos nucleicos) se pueden detectar después de la hibridación a secuencias de partzimas que permiten la formación de MNAzimas activas. Las MNAzimas a continuación pueden escindir sustratos genéricos fijados liberando así la ADNzima A. La ADNzima A puede migrar después a una segunda secuencia genérica sobre una segunda superficie sólida en la que está fijada la ADNzima B. La ADNzima A puede escindir la segunda
 10 secuencia genérica liberando de este modo la ADNzima B. La escisión de este sustrato entre los pares de colorantes de fluoróforo/extintor puede dar como resultado un aumento de fluorescencia. La ADNzima B liberada puede a su vez escindir más del primer sustrato liberando de este modo más ADNzima A e iniciando una cascada de señales que da como resultado la amplificación de la señal (Figura 7).

En este ejemplo se describe un mecanismo para generar una cascada de señales utilizando ADNzimas separadas espacialmente, sin embargo, existen otros métodos que también permitirían la amplificación de la señal utilizando
 15 ácidos nucleicos catalíticos. El experto en la técnica apreciará que cualquiera de tales métodos debe ser completamente funcional con la presente, a condición de que por algunos medios de unión o separación física, un sustrato se mantenga "inaccesible" para una enzima que actúe sobre él. Otros ejemplos de amplificación de señales de ácidos nucleicos, que se podría acoplar a reacciones iniciadas por MNAzimas incluyen, pero no se limitan a, las cascadas de ligación (Paul y Joyce, 2004) y cascadas de ADNzimas circulares (Levy y Ellington, 2003), cada una de
 20 las cuales implica el principio base de mantener una "separación" de una enzima respecto a su sustrato, después de lo cual cuando la enzima y el sustrato se ponen en contacto de manera que se produce actividad catalítica, se ocasiona directa o indirectamente una señal amplificada, o cascadas de señales.

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

8.1. Oligonucleótidos de Partzimas

Las MNAzimas se pueden utilizar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real utilizando métodos de amplificación de la diana *in vitro* tales como la PCR. Adicionalmente, el control en tiempo real permite
 25 cuantificar la cantidad de diana presente inicialmente en la reacción. En este ejemplo la amplificación y la detección se realizan en un proceso de una sola etapa, en donde la amplificación mediante PCR y detección mediada por MNAzima se producen simultáneamente en un solo tubo. Los oligonucleótidos de Partzimas A y B utilizaron el diseño 6 con brazos sensores complementarios al exón 5 del gen de RPLPO humano (Figura 17 (i)). Los oligonucleótidos de la partzima se enumeran a continuación indicando "-P" la fosforilación 3' del oligonucleótido.

SEC ID NO: 29 Partzima A4 RO5A4/3-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID NO: 30 Partzima B5 RO5B5/3-P:

35 **CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P**

8.2. Sustrato informador

El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-3 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-3-FB se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3'. La
 40 escisión de SubBi-3-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

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

La secuencia diana para este ejemplo se generó mediante amplificación *in vitro* de ADN genómico humano utilizando los cebadores de PCR oligonucleotídicos indicados a continuación.

SEC ID NO: 32 Cebador 5R05/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID NO: 33 Cebador 3R05/1:

50 CAAAGGCAGATGGATCAG

8.4. Secuencia diana

El ADN genómico humano extraído de la línea celular K562 (Promega) se utilizó como molde para la amplificación del gen de RPLPO.

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

5 La amplificación y la cuantificación en tiempo real de la secuencia diana se llevaron a cabo en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 50°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5RO5/1 40 nM y 3RO5/1 200 nM, RO5A4/3-P 200 nM y RO5B5/3-P 200 nM, SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 1 x ROX de referencia (Invitrogen), 1x Immobuffer (Bioline), 0,25 unidades de Immolasa (Bioline) y o bien molde de ADN genómico (20.000 pg, 4000 pg, 800 pg, 160 pg, 32 pg y 6.4 pg) o sin diana (dH₂O).

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

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

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

25 Si bien este experimento utilizó proporciones de cebadores asimétricas, experimentos posteriores utilizando PCR en tiempo real (datos no mostrados) demostraron que la detección con MNAzima también era compatible con la PCR utilizando proporciones de cebadores simétricas.

Ejemplo 9: Reacción múltiplex utilizando MNAzimas múltiples dirigidas a varias dianas al mismo tiempo.

9.1. Oligonucleótidos de partzimas

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

SEC ID NO: 29 Partzima A4 RO5A4/3-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID NO: 30 Partzima B5 RO5B5/3-P:

40 **CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P**

SEC ID NO: 34 Partzima A4 miR20A4/2:

TACCTGCACTACAACGAGAGGAAACCTT

SEC ID NO: 35 Partzima B5 miR20B5/2:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTTAAGCACTTTA

45 **9.2. Sustratos informadores**

Los dos sustratos informadores utilizados en este ejemplo fueron SubBi-2 y SubBi-3 con las secuencias, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. SubBi-3 se marcó en el extremo con un radical 6-JOE en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-JB.

La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM) y la escisión de SubBi-3-JB se controló a 548 nm (longitud de onda de emisión de JOE) con excitación a 520 nm (longitud de onda de excitación de JOE). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

- 5 SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:
 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
 SEC ID NO: 36 SubBi-3-JB:
 CAGACAACCGuCACCAACCG

9.3. Secuencias diana

- 10 Las secuencias diana para este ejemplo fueron los oligonucleótidos sintéticos DianaRO5/1 y DianaD-20, con las secuencias 5' a 3', de más abajo. La secuencia de DianaRO5/1 tiene la misma secuencia que una sección del gen de RPLPO, exón 5 y la secuencia de DianaD-20 es un homólogo de ADN del ARN hsa-miR-20.

 SEC ID NO: 22 DianaRO5/1:
 GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

- 15 SEC ID NO: 12 DianaD-20:
 TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

9.4. Condiciones de reacción

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

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

Tipo de Reacción	Partzimas A (1 mM)	Partzimas B (1 M)	Diana
Singleplex D-20	miR20A4/2	miR20B5/2	DianaD-20 1 mM
			Sin diana (H ₂ O)
Singleplex RPLPO	RO5A4/3-P	RO5B5/3-P	DianaRO5/1 1 mM
			Sin diana (H ₂ O)
múltiplex D-20 y RPLPO	miR20A4/2 y RO5A4/3-P	miR20B5/2 y RO5B5/3-P	DianaD-20 1 mM y DianaRO5/1 1 mM
			Sin diana (H ₂ O)

- 30 Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe que éste varía entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en ese pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

9.5. Resultados: Detección y escisión del sustrato

Las reacciones Singleplex que contienen diana D-20 o RPLPO mostraron un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo en comparación con el control sin diana (Figura 19 (i)). Esto demuestra que las partzimas se ensamblan para formar una MNAzima catalíticamente activa y escinden el sustrato informador solo en presencia de la secuencia

diana. Los controles "sin diana" (dH₂O) no aumentaron en la fluorescencia indicando que no se producía escisión en ausencia de la diana. La reacción múltiple para la detección simultánea de RPLPO y D-20 (Figura 19 (ii)) produjo resultados similares para cada diana a los observados en las reacciones singleplex para cada diana. No se observó aumento de la fluorescencia en la reacción de control "sin diana". Estos resultados demuestran la detección simultánea de múltiples dianas en una sola reacción sin pérdida de especificidad.

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

10.1. Oligonucleótidos de partzimas

Las MNAzimas se pueden utilizar para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real utilizando métodos de amplificación de dianas *in vitro*, tales como RT-PCR. Adicionalmente, en control en tiempo real permite cuantificar la cantidad de diana presente inicialmente en la reacción. En este ejemplo, la amplificación y la detección se llevan a cabo en un proceso de dos etapas, en donde la primera etapa implica la producción de ADNc mediante transcripción inversa, y a continuación, la amplificación mediante PCR y la detección del ADNc mediada por MNAzima se producen simultáneamente en la segunda etapa. Los oligonucleótidos de las partzimas A y B utilizaron el diseño 6 con brazos sensores complementarios al microARN humanos hsa-let-7a. Los oligonucleótidos de las partzimas se enumeran a continuación indicando "-P" la fosforilación 3' del oligonucleótido. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en *negrita* hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato.

SEC ID NO: 37 Partzima A4 PCR7aA4/2-P:

GACCGTGAGGTAGTAACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 38 Partzima B5 PCR7aB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGGTTGTATAGTTGTC-P

10.2 Sustrato informador

El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 nm (longitud de onda de excitación de FAM). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

10.3. Secuencias diana

La curva patrón para este ejemplo se generó mediante una RT-PCR de dos etapas de un oligonucleótido de ARN sintético R-let7a, que tiene la secuencia homóloga a la especie hsa-let-7a de ARN. La secuencia de R-1et7a, escrita de 5' a 3', es la siguiente.

SEC ID NO: 39 R-1et7a:

ugagguaguagguuaguuu

Las muestras de ARN total de células humanas de colon (Ambion), células leucémicas K562, células de cáncer cervical HeLa (Ambion) y células del bazo (Clontech) se amplificaron y se analizaron para determinar la abundancia de hsa-let-7a.

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

Los siguientes cebadores se utilizaron para la amplificación de hsa-let-7a. El cebador 31et7a se utilizó para la transcripción inversa y los cebadores 51et7a y 3PCR7a se utilizaron para la amplificación mediante PCR.

SEC ID NO: 40 Cebador 31et7a:

AGCGAAGCTGAGACAACTATACAA

SEC ID NO: 41 Cebador 51et7a:

CGACGTGACCGTGAGGTAG

SEC ID NO: 42 Cebador 3PCR7a:

CATGGCACAAGCGAAGCTGA

10.5. Componentes de la reacción: transcripción inversa de la secuencia diana

5 La transcripción inversa de la secuencia diana se realizó en un volumen total de reacción de 25 ml. Las reacciones se incubaron en un Ciclador Térmico 2720 (Applied Biosystems) durante 20 minutos a 20°C, seguido de 20 minutos a 30°C y después 20 minutos a 40°C. Las reacciones contenían 31et7a 10 nM, MgCl₂ 5 mM, dNTP cada uno 300 mM, 20 unidades de Rnasina (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 100 unidades de M-MLV RT(H-) y 5 ml de o bien de R-let7a (6 x 10¹¹ copias) o bien ARN total humanos de colon normal (0,1 mg), K562 (0,1 mg), HeLa (0,2 mg) o en el bazo (0,2 mg). Una reacción de control contenía todos los reactivos como anteriormente, pero carecía de diana de ARN en lugar de contener 5 ml de dH₂O solamente.

10 10.6. Componentes de Reacción: amplificación y cuantificación de la secuencia diana

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

20 10.7. Resultados: amplificación de diana y escisión de sustrato informador SubBi-2-FB

25 La MNAzima para la detección y la cuantificación en tiempo real de hsa-let-7a mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue ADNc generado a partir de oligonucleótidos de ARN sintético o ARN total humano. No se detectó ninguna señal para la reacción de control sin diana (Tabla 11). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en reacciones que contienen diana se debía al ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escindían el sustrato informador. Se generó una curva patrón trazando el log de las concentraciones iniciales de ARN contra el ciclo umbral, dando como resultado un gráfico lineal con un coeficiente de correlación de 0,999. También se amplificaron cuatro muestras de ARN total humano y se estimó la cantidad de hsa-let-7a en cada una mediante la extrapolación de la curva patrón (Tabla 11).

30

(Continúa en página siguiente)

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

Muestra	Umbral (Ct) Promedio de Duplicados	Número de Copia Conocido Patrón (S) o Estimado (E)	Comentarios
Patrón 1	19,4	5×10^8 (S)	Curva patrón (promedio de reacciones por duplicado) $R^2 = 0,999$ Pendiente = -3,829 Eficacia = 83%
Patrón 2	23,1	5×10^7 (S)	
patrón 3	26,9	5×10^6 (S)	
patrón 4	30,9	5×10^5 (S)	
patrón 5	34,7	5×10^4 (S)	
Sin control de diana de ARN	Sin señal	0	Sin señal
ARN de Colon	20	4×10^8 (E)	hsa-let-7 ^a detectado y cuantificado en todas las muestras de ensayo
ARN de K562	31	$3,5 \times 10^5$ (E)	
ARN de HeLa	22	1.3×10^8 (E)	
ARN de bazo	22	$7,6 \times 10^7$ (E)	

5 Este ejemplo demuestra la capacidad de las MNAzimas para detectar y cuantificar amplicones generados por amplificación mediante RT-PCR de especies de microARN humanos. Los microARN son difíciles de amplificar y detectar debido a su pequeño tamaño de alrededor de 22 bases. Las MNAzimas son adecuados para esta aplicación.

Ejemplo 11: Uso de MNAzimas para detectar la metilación de ADN

11.1. Oligonucleótidos de partzimas

10 En el ejemplo 19 se muestra que la PCR en tiempo real y generación de señal mediada por la MNAzima permiten la discriminación entre las secuencias de ácido nucleico completamente coincidentes y las que contienen emparejamientos erróneos con C frente a C. Esta capacidad permite utilizar las MNAzimas para el análisis del estado de metilación de las células. Las alteraciones en el patrón de metilación se producen con frecuencia en asociación con el cáncer. La mayoría de los protocolos para el análisis de metilación comienzan con una modificación con bisulfito del ADN genómico que convierte las citidinas no metiladas, pero no las metiladas, en uridinas. La amplificación mediante PCR del ADN modificado reemplaza a continuación las uridinas por timidinas y se pueden utilizar varios métodos para distinguir las secuencias que contienen T (originalmente C no metilada) y C (originalmente C metilada). En el siguiente ejemplo, se utilizó una MNAzima para determinar el estado de metilación de dobletes CpG específicos en la región promotora del gen de p16 en ADN modificado con bisulfito.

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

SEC ID NO: 43 Partzima A5 p16A5/3-P:

GCCCCGCCTCCAACTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID NO: 44 Partzima B6 p16B6/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCAACGCCCGCACCTC-P

5 11.2. Sustrato informador

El sustrato informador utilizado en este ejemplo fue SubBi-3. En el ejemplo actual, SubBi-3 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5', un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-FB. La escisión de SubBi-3-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia de SubBi-3-FB se muestra a continuación (5' a 3'); las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

11.3. Cebadores de PCR para la amplificación de p16 modificado con bisulfito

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

SEC ID NO: 45 Cebador 5p16:

GTTGGTTACGGTCGCGGTTTC

SEC ID NO: 46 Cebador 3p16:

CCGACCGTAACTATTCGATACG

11.4. Secuencias diana y controles.

El ADN genómico humano extraído de la línea celular K562 se utilizó como ADN genómico de control negativo que contenía un promotor del gen p16 no metilado. Se utilizó ADN genómico metilado CpG universal (Chemicon) como control para un promotor del gen p16 metilado. El ADN genómico fue modificado con bisulfito durante la noche utilizando el kit MethyEasy (Human Genetic Signatures), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN metilado y el ADN no metilado se diluyeron seriadamente a continuación para producir las muestras que contenían proporciones variables de ADN metilado en el promotor del gen p16 a saber, 100%, 20%, 4%, 0,8%, 0,16% y 0,032%. Se utilizó dH₂O libre de nucleasa en lugar de ADN genómico como control sin diana.

30 11.5. Componentes de Reacción: amplificación y cuantificación de secuencias diana

Se llevaron a cabo la amplificación y la cuantificación en tiempo real de la secuencia diana en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se realizaron en un Stratagene Mx3005P QPCR System. Los parámetros de ciclación fueron 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 56°C durante 30 segundos, y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 52°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5p16 200 nM y 3p16 40 nM, p16A5/3-P 200 nM y p16B6/3-P 200 nM, SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 7,5 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 1x Immobuffer (Bioline), 1 unidad de Immolasa (Bioline) y o bien 150 ng de ADN genómico modificado con bisulfito (que contiene 100%, 20%, 4%, 0,8%, 0,16% o 0,032% de ADN metilado) o bien dH₂O sola (reacción de control sin diana). Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

11.6. Resultados: Detección de la metilación por medio de una MNAzima

La MNAzima específica de la metilación mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la muestra diana contenía de 100% a 0,16% de ADN metilado (Tabla 12). En contraste, cuando la muestra diana contenía 0,032% y 0% de ADN metilado, la reacción mostró un bajo nivel de fluorescencia, similar al observado en el control sin diana, y la fluorescencia no aumentó a lo largo del tiempo. A medida que el porcentaje de diana metilada disminuía, el Ct de la reacción aumentaba y se trazó una curva patrón con un valor R² de 0,996. Los resultados experimentales se resumen en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12. Uso de MNAzimas para detectar la metilación del ADN en muestras de ADN genómico modificado con bisulfito.

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

5 Los cebadores específicos de p16 metilado y la MNAzima fueron capaces de discriminar entre un diana metilada y una no metilada en las condiciones utilizadas en este ejemplo. Adicionalmente, el sistema permitió la detección de la diana metilada al 0,16% en un fondo de diana no metilada. La eficacia de 100% en una reacción de PCR implica una duplicación en cada ciclo. La eficacia observada en este experimento de 133% indica que hay tanto amplificación de la diana (mediante PCR) como detección de amplicones amplificados por la actividad catalítica de la MNAzima.

10 **Ejemplo 12: MNAzimas que se ensamblan a partir partzimas que tienen brazos sensores que forman estructuras en horquilla.**

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

12.1. Oligonucleótidos de Partzimas

15 La detección utilizando MNAzimas también se puede realizar cuando la región del brazo sensor de la partzima A, o la partzima B, o tanto la partzima A como la B, está seguida por una secuencia de horquilla arbitraria. En los siguientes experimentos, las partzimas A y B se diseñaron para dirigirse a la secuencia de un microARN humano, hsa-miR-143. Las secuencias de los oligonucleótidos de la partzima A y la partzima B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, bases en **negrita** hibridan con la diana, las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato y las bases que
20 están en texto sin formato forman la horquilla.

SEC ID NO: 142 Partzima A2 miR143 A2/1:

TGAGCTACAGTCGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 143 Partzima B3 miR143 B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GCTT**CATCTCA

25 SEC ID NO: 144 Partzima A2 miR143 A2H/1:

GGCACTAACGTGCCT**GAGCTACAGT**CGGTCGAAATAGTGAGT

SEC ID NO: 145 Partzima B3 miR143 B3H/1:

CATCTCTTCTCCGAGC**GCTT**CATCTCACGACGATAACGTCCG

12.2. Sustrato informador

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

SEC ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATT

12.3. Diana

La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido de ADN, DianaD-143, que tiene una secuencia homóloga al microARN humano, hsa-miR-143. La secuencia de DianaD-143 fue la siguiente, escrita de 5' a 3'.

SEC ID NO: 146 DianaD-143:

TGAGATGAAGCACTGTAGCTCA

12.4 Condiciones de reacción

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

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

Tipo de Reacción	Partzima A miR143 (0,8 mM)	Partzima B miR143 (0,8 M)	Reacción de MNAzima	Molde (DianaD-143)
Ninguna partzima tenía una horquilla	A2/1	B3/1	Diana	0,1 mM
			Sin diana	Ninguno (Solo H ₂ O)
Una partzima contenía una horquilla	A2H/1	B3/1	Diana	0,1 mM
	A2/1	B3H/1	Diana	0,1 mM
Ambas partzimas contenían una horquilla	A2H/1	B3H/1	Diana	0,1 mM
			Sin diana	Ninguno (Solo H ₂ O)

Cada pocillo de reacción en el termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante el experimento se sometió a ensayo primero para determinar su nivel de fluorescencia de fondo, ya que se sabe que éste varía entre los pocillos. Esto se midió mediante la lectura de la fluorescencia de la mezcla a granel sola. A continuación, este valor se restó de todas las otras reacciones realizadas en cada pocillo para permitir comparaciones entre pocillos.

12.5. Resultados: Detección de la escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

Las diversas combinaciones de diseños de la partzimas A y B fueron todas capaces de ensamblarse en MNAzimas activas. Éstas escindieron el sustrato informador, como se evidencia por un aumento en la fluorescencia, solo en presencia de la secuencia diana. En este ejemplo, los brazos sensores de las partzimas se habían extendido con una secuencia que formaba una horquilla. Las reacciones, que contenían una partzima con una horquilla (o bien la partzima A o bien la partzima B), o en las que ambas partzimas (A y B) contenían horquillas, produjeron señales

fluorescentes similares a la observada cuando se utilizaron partzimas que carecían de horquillas. No se observó un aumento de la señal en ninguna de las reacciones de control que carecen de diana.

El diseño de partzimas que contenían horquillas proporciona una estrategia adecuada para la detección de secuencias cortas tales como microARN. El oligonucleótido de ADN detectado en este experimento tenía de solo 22 bases. Esta secuencia se detectó utilizando partzimas, que o bien contienen o bien no contienen horquillas. El diseño en horquilla proporciona una estructura más estable y proporciona una mayor flexibilidad en el diseño de partzimas que se sabe que son compatibles con el ensamblaje de MNAzimas y la actividad catalítica.

Ejemplo 13: Uso de MNAzimas para la cuantificación simultánea de cuatro secuencias de ácidos nucleicos por medio de RT-PCR en tiempo real

13.1. Oligonucleótidos de partzimas para un análisis de RT-PCR cuádruplex

Se pueden amplificar simultáneamente múltiples dianas en tiempo real utilizando métodos de amplificación de dianas *in vitro*, tales como RT-PCR. Adicionalmente, la amplificación de las dianas puede controlarse simultáneamente en tiempo real en una reacción multiplexada que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima tiene brazos de sensores específicos para una diana y brazos para el sustrato específicos para un miembro único de una serie de sustratos genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un fluoróforo diferente (Figura 18). En este ejemplo, se diseñaron MNAzimas para detectar cuatro dianas diferentes, a saber, BCR humana, RPLPO, β -actina y transcritos de HPRT. Se apreciará que cualquier número de dianas se puede utilizar de acuerdo con el método. Las secuencias de las partzimas A y B para cada diana se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID NO: 51 Partzima A4 BaA4/2-P:

AGATCAAGATCATTGCTCCACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 52 Partzima B5 BaB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTTCCTGAGCGCAAGTACTC-P

SEC ID NO: 29 Partzima A4 R05A4/3-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID NO: 30 Partzima B5 R05B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID NO: 55 Partzima A4 BCRA4/6-P:

AGTTCAAATCTGTACTGCACCACAACGAGAGGCGTGAT-P

SEC ID NO: 56 Partzima B5 BCRB5/6-P:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTGGAGGTGGATTCTTTGG-P

SEC ID NO: 57 Partzima A4 HPRTA4/7-P:

ACTGAATAGAAATAGTGATAGATACAACGAGTGCCATGTTAA-P

SEC ID NO: 58 Partzima B5 HPRTBS/7-P:

TATCACAGCCAAGGCTAGCTCCATTCTATGACTGTAGATT-P

13.2. Sustratos informadores

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

SEC ID NO: 59 SubBi-2-JB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

SEC ID NO: 60 SubBi-3-Q6B2:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

5 SEC ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

SEC ID NO: 62 SubBi-7-FB:

TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

13.3. Las secuencias diana y cebadores de PCR para la amplificación de los cuatro amplicones

10 El ARN total humano extraídas de células leucémicas K562 se utilizó como molde para la amplificación *in vitro* de los cuatro transcritos diana. Los amplicones se generaron mediante RT-PCR utilizando los cebadores para PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEQ ID NO: 32 Cebador 5' 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

15 SEC ID NO: 33 Cebador 3' 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

SEC ID NO: 63 Cebador 5' 5Bactin:

CATTGCCGACAGGATGCAGA

SEC ID NO: 64 Cebador 3' 3Bactin:

20 GAGCCGCCGATCCACACG

SEQ ID NO: 65 Cebador 5' 5BCR14:

CACTCAGCCACTGGATTTAA

SEC ID NO: 66 Cebador 3' 3BCR15/6:

GCGCGTCTTTGCTTTATTC

25 SEC ID NO: 67 Cebador 5' 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

SEC ID NO: 68 Cebador 3' 3HPRT/8:

CCTGTTGACTGGTCATTACAA

13.4. Componentes de Reacción: amplificación y cuantificación de secuencias diana

30 La amplificación y la cuantificación en tiempo real de las secuencias diana se realizaron en un volumen de reacción total de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un Mx3005P™ QPCR System (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo), y finalmente 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 54°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 40 nM de cada cebador
 35 5' y 200 nM de cada cebador 3', 200 nM de cada partzima A y 200 nM de cada partzima B, 200 nM de cada sustrato, MgCl₂ 10 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades Rnasina (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-), 1 x Immobuffer (Bioline), 1,5 unidades de Immolasa (Bioline) y o bien molde de ARN total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, 160 pg o 32 pg) o bien sin diana (dH₂O).

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

Tipo de Reacción	Cebadores 5' (40 nM) 3' (200 nM)	Partzima A (200 nm)	Partzima B (200 nM)	Sustrato (200 nM)	Diana
β -actina, RPLPO, BCR, HPRT, múltiplex	5Bactin 3Bactin	BaA4/2-P	BaB5/2-P	SubBi-2-JB	ARN total humano 100 ng 20 ng 4 ng 800 pg 160 pg 32 pg o sin ARN (H ₂ O)
	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/3-P	RO5B5/3-P	SubBi-3-Q6B2	
	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P	BCRB5/6-P	SubBi-6-TRB2	
	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/7-P	HPRTB5/7-P	SubBi-7-FB	

5 13.5. Resultados: amplificación simultánea de cuatro secuencias diana diferentes y detección por medio de la escisión de cuatro sustratos informadores diferentes

Los cuatro MNAzimas utilizadas para la detección y la cuantificación en tiempo real de los transcritos de β -actina, RPLPO, BCR, y HPRT mostraron un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue ARN total humano amplificado mediante RT-PCR (Tabla 15). La fluorescencia del control sin diana de ARN para las cuatro reacciones fue menor que en las reacciones que contenían diana de ARN y no aumentó durante la reacción (Tabla 15). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contenían diana se debió a un ensamblaje dependiente de la diana de las MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escindían el sustrato informador.

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

(Continúa en página siguiente)

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

Molde (ARN total)	Umbral (Ct)			
	β -actina (JOE)	RPLPO (Quasar 670)	BCR (Rojo Texas)	HPRT (FAM)
100 ng	11,2	12,8	17,6	16,2
20 ng	13,8	15,2	19,9	18,5
4 ng	16,7	17,5	22,4	20,9
800 pg	19,1	20,1	25,0	23,5
160 pg	21,5	22,7	27,1	26,0
32 pg	23,8	25,2	29,1	27,7
Control sin ARN	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
Curva patrón	R ² = 0,998	R ² = 1,000	R ² = 0,998	R ² = 0,997
	Pendiente = -3,599	Pendiente = -3,561	Pendiente = -3,320	Pendiente = -3,370
	Eficacia = 90%	Eficacia = 91%	Eficacia = 100%	Eficacia = 98%

5 La reacción de RT-PCR con MNAzima en este ejemplo permitió la detección simultánea y la generación de las curvas patrón para la cuantificación de cuatro dianas en una reacción múltiplex única que incluía cuatro sustratos genéricos. Estos sustratos genéricos son adecuados para controlar otras combinaciones de cuatro dianas en una sola reacción.

Ejemplo 14: Uso de MNAzimas para la cuantificación simultánea de cinco secuencias de ácido nucleico en una RT-PCR múltiplex en tiempo real.

10 **14.1. Oligonucleótidos de partzima para análisis de RT-PCR quintuplex**

Se pueden amplificar simultáneamente múltiples dianas en tiempo real métodos de amplificación de dianas *in vitro*, tales como RT-PCR. Adicionalmente, la amplificación de las dianas puede controlarse simultáneamente en tiempo real en una reacción multiplexada que comprende múltiples MNAzimas únicas. Cada MNAzima tiene brazos sensores específicos para una diana y brazos para el sustrato específicos para un único miembro de una serie de sustratos genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un fluoróforo diferente (Figura 18). En este ejemplo, se diseñaron MNAzimas para detectar cinco dianas diferentes, a saber, secuencias de ARNm de BCR, exón 4 de RPLPO, β -actina, exón 5 de RPLPO y HPRT. Se apreciará que se puede utilizar cualquier número de dianas de acuerdo con el método. Las secuencias de la partzimas A y B se enumeran a continuación de 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en negrita hibridan con la diana y las bases en cursiva hibridan con el sustrato.

SEC ID NO: 69 Partzimas A4 BaA4/7-P:

AGATCAAGATCATTGCTCCACAACGAGTGCCATGTTAA-P

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

TATCACAGCCAAGGCTAGCTTCCTGAGCGCAAGTACTC-P

25 **SEQ ID NO: 71 Partzima A4 R05A4/4-P:**

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGTGCGCCATG-P

SEC ID NO: 72 Partzima B5 R05B5/4-P:

TACTTCTCCCAAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID NO: 55 Partzima A4 BCRA4/6-P:

AGTTCAAATGTGTACTGCACCACAACGAGAGGCGTGAT-P

SEC ID NO: 56 Partzima B5 BCRB5/6-P:

5 **CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTGGAGGTGGATTCCTTTGG-P**

SEC ID NO: 75 Partzima A4 HPRTA4/2-P:

ACTGAATAGAAATAGTGATAGATACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 76 Partzima B5-HPRTB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCATTCCTATGACTGTAGATT-P

10 SEC ID NO: 77 Partzima A4 RO4A4/3-P:

GCTGGTCATCCAGCAGACAACGAGGTTGTGCTG-P

SEC ID NO: 78 Partzima B5 RO4B5/3-P:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTTGACAATGGC-P

14.2. Sustratos informadores

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

SEC ID NO: 79 SubBi-2-A350B:

AAGGTTTCTCTCguCCCTGGGCA

SEC ID NO: 60 SubBi-3-Q6B2:

30 CAGCACAACCguCACCAACCG

SEC ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

SEC ID NO: 62 SubBi-7-FB:

TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

35 SEC ID NO: 83 SubBi-4-JB:

CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA

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

40 El ARN total humano extraído de células K562 se utilizó como molde para la amplificación *in vitro* de las cinco dianas. Los amplicones se generaron mediante amplificación *in vitro* utilizando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados a continuación.

SEQ ID NO: 32 Cebador 5' 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID NO: 33 Cebador 3' 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

SEC ID NO: 63 Cebador 5' 5Bactin:

CATTGCCGACAGGATGCAGA

5 SEC ID NO: 64 Cebador 3' 3Bactin:

GAGCCGCCGATCCACACG

SEQ ID NO: 65 Cebador 5' 5BCR14:

CACTCAGCCACTGGATTTAA

SEC ID NO: 66 Cebador 3' 3BCR15/6:

10 GCGCGTCTTTGCTTTATTC

SEQ ID NO: 67 Cebador 5' 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

SEC ID NO: 68 Cebador 3' 3HPRT/8:

CCTGTTGACTGGTCATTACAA

15 SEQ ID NO: 84 Cebador 5' 5RO4/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

SEC ID NO: 85 Cebador 3' 3RO4/2:

GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

14.4. Componentes de Reacción: amplificación y cuantificación de secuencias diana

20 La amplificación y la cuantificación en tiempo real de las secuencias diana se realizó en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un Mx3005P™ QPCR System (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo), y finalmente 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 54°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5Bactin, 5BCR14, 5HPRT/5 40 nM y 25 5RO4/3, 5RO5/1 80 nM y 3Bactin, 3BCR15/6, 3HPRT/8 200 nM y 3RO4/2 y 3RO5/1 400 nM. Hubo 200 nM de cada partzima A y partzima B para β actina, BCR, exón 4 de RPLPO y HPRT y 400 nM de cada partzima A y partzima B para exón 5 de RPLPO. Hubo SubBi-2-A350B, SubBi-3-Q6B2, SubBi-6-TRB2 y SubBi-7-FB 200 nM y de SubBi-4-JB 400 nM. También hubo MgCl₂ 10 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades Rnasina (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-) (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 2 unidades de Immolasa (Bioline) y 5 ml de cualquier molde de 30 ARN total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, o 160 pg) o sin diana (dH₂O).

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

Tipo de Reacción	Cebadores	Partzima A y B	Sustrato	Cantidad de Partzima/sustrato	Cantidad de Cebador 3'/ 5'
β -actina, exón 5 de RPLPO,	5Bactin 3Bactin	BaA4/7-P BaB5/7-P	SubBi-7-FB	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
BCR, HPRT, exón 4 de RPLPO.	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/4-P RO5B5/4-P	SubBi-4-JB	400 nM/400 nM	400 nM/80 nM
	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P BCRB5/6-P	SubBi-6- TRB2	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/2-P HPRTB5/2-P	SubBi-2- A350B	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
	5RO4/3 3RO4/2	RO4A4/3-P RO4B5/3-P	SubBi-3- Q6B2	200 nM/200 nM	400 nM 180 nM

5 14.5. Resultados: amplificación simultánea de cinco secuencias diana diferentes y detección a través de la escisión de cinco sustratos informadores diferentes

Los cinco MNazimas utilizadas para la detección y la cuantificación en tiempo real de secuencias de ARN dentro de exón 4 de RPLPO, BCR, β -actina, exón 5 de RPLPO y HPRT mostraron un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue ARN total humano amplificado mediante RT-PCR (Tabla 17). La fluorescencia del control sin diana de ARN para las cinco reacciones fue menor que la de las reacciones que contenían diana de ARN y no aumentó durante la reacción (Tabla 17). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contenían diana se debió a el ensamblaje dependiente de la diana de de MNazimas catalíticamente activas que a continuación escindieron el sustrato informador.

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

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

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

5 La reacción de RT-PCR MNazima en este ejemplo permitió la detección y la generación simultáneas de curvas patrón para la cuantificación de cinco dianas en una reacción múltiplex única que incluía cinco sustratos genéricos. Estos sustratos genéricos son adecuados para controlar otras combinaciones de cinco dianas en una sola reacción.

Ejemplo 15: Uso de MNazimas para la cuantificación de 16S ribosomal en bacterias

10 Para reemplazar el ensayo bacteriano de una tinción de Gram, las MNazimas se pueden utilizar para un ensayo de liberación rápida para determinar la esterilidad y/o contaminación por micoplasmas en base a secuencias de ácido nucleico conservadas encontradas en especies bacterianas. Se pueden utilizar MNazimas para controlar la amplificación de ácidos nucleicos bacterianos diana en tiempo real utilizando métodos de amplificación de las dianas *in vitro*, tales como RT-PCR. En este ejemplo, se utiliza una región conservada encontrada en secuencia 16S ribosómica bacteriana, en donde la transcripción inversa, amplificación mediante PCR y la detección mediada por MNazima se producen simultáneamente en un tubo.

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

15.1. Oligonucleótidos de partzimas

Los oligonucleótidos de las partzima A y B utilizaron un diseño 7 con los brazos sensores complementarios a una región conservada entre las especies bacterianas. Los oligonucleótidos de partzima se enumeran a continuación indicando "-P" la fosforilación 3' del oligonucleótido. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato

SEC ID NO: 86 Partzima A5 16S1A5/2-P:

GGTTGTCGTCAGCTCGTGTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 87 Partzima B6 16S1B6/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAG-P

15.2. Sustrato informador

El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

15.3. Cebadores de PCR para la amplificación de 16S ribosomal en bacterias

La secuencia diana para este ejemplo se generó mediante amplificación *in vitro* de *Bacillus subtilis* utilizando los cebadores de PCR oligonucleotídicos enumerados más abajo.

SEC ID NO: 88 Cebador 5' 51651-1:

TGGTGTCATGGTTGTCGTC

SEC ID NO: 89 cebador 3' 31681-1:

TTGCGCTCGTTGCGGGA

15.4. Secuencia diana y control

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

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

La amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana se realizó en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un Mx3005P QPCR System (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo), y finalmente 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 55°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 516S1-1 40 nM y 316S1-1 200 nM, 16S1A5/2-P 200 nM y 16S1B6/2-P 200 nM, SubBi-2-FB 200 nM, MgCl₂ 7,5 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 1 unidad de Immolasa (Bioline) y o bien molde de ARN (500 ng, 50 ng, 5 ng o 500 pg) o bien sin diana (dH₂O).

15.6. Resultados: Amplificación de la diana y escisión de sustrato informador SubBi-2-FB

La MNAzima para la detección y la cuantificación en tiempo real de 16S ribosomal bacteriano, mostraron un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue ARN bacteriano amplificado mediante RT-PCR. La fluorescencia del control sin molde fue menor que la de las reacciones que contenían ARN y no aumentó durante la reacción. Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contienen diana se debe al ensamblaje dependiente de la diana de MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escinden el sustrato informador. Se generó una curva patrón trazando el logaritmo de las concentraciones de ARN frente al ciclo umbral dando como resultado un gráfico lineal con un coeficiente de correlación de 0,992.

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

Muestra (pg)	Ciclo umbral (Ct) Promedio de duplicados	Resultados
500000	12,5	Curva Patrón (Promedio de reacciones por duplicado) R ² = 0,992 Pendiente = - 4,461 Eficacia = 68%
50000	16,4	
5000	20,5	
500	26,0	
Control sin diana de ARN	Sin señal	Sin señal

5 Este ejemplo demuestra la capacidad de las MNAzimas para detectar y cuantificar amplicones generados mediante amplificación por RT-PCR de ARN ribosomal 16S bacteriano. Los MNAzimas utilizadas en este ejemplo se dirigen a una región de 16S bacteriano que está conservado 100% entre *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter woffii*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*. Como tal se podrían utilizar una única MNAzima y un sustrato informador para escrutar una muestra para determinar la presencia de cualquiera de las bacterias anteriores. La detección de una señal (p. ej., FAM) sería indicativa de la presencia de una o más de estas especies bacterianas en la muestra.

Ejemplo 16: Uso de MNAzimas para la detección y cuantificación de ARN viral por medio de RT-PCR un solo tubo

15 Se pueden utilizar MNAzimas para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diana en tiempo real utilizando métodos de amplificación de dianas *in vitro*, tales como RT-PCR. Adicionalmente, el control en tiempo real permite cuantificar la cantidad de diana presente inicialmente en la reacción. Este ejemplo ilustra el uso de MNAzima para la detección y cuantificación de ARN viral de VIH. La transcripción inversa, la amplificación mediante PCR y la detección con MNAzima se llevaron a cabo en una reacción en un solo tubo.

16.1. Oligonucleótidos de partzimas

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

SEC ID NO: 90 Partzima A4 NefA4/6-P:

GAAGAGGCCAATAAAGGAGAGACAACGAGAGGCGTGAT-P

25 SEC ID NO: 91 Partzima B5 NefB5/6-P:

*CTGGGAGGAAGGCTAGCT***AACACCAGCTTGT**TACACC-P

16.2. Sustrato informador

30 El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-6 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-6 se marcó en el extremo con un radical Rojo Texas en el extremo 5' y un radical BHQ2 en el extremo 3' y se designó SubBi-6-TRB2. La escisión de SubBi-6-TRB2 se controló a 610 nm (longitud de onda de emisión de Rojo Texas) con excitación a 585 nm (longitud de onda de excitación de Rojo Texas). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

35

16.3 Secuencias diana

La curva patrón en este experimento fue generada mediante amplificación por RT-PCR de ARN viral de VIH-1. Se utilizó in kit QIAGEN Ultrasens virus para VIH-1 para aislar el ARN viral a partir de medio recogido de células CEMT4 humanas infectadas con el VIH-1. Se utilizó agua sin nucleasa (NF) en lugar de ARN viral como control sin diana.

5 **16.4. Cebadores de PCR para la amplificación de transcritos Nef de VIH-1.**

Los siguientes cebadores se utilizaron para la amplificación de transcritos *Nef* de VIH-1. El cebador 3', Nef/3PCR, se utilizó para la transcripción inversa y a continuación, este cebador y el cebador 5' Nef/5PCR facilitaron la amplificación mediante PCR.

SEC ID NO: 92 Cebador Nef/3PCR:

10 CAGGGTCATCCATTCCATGCAG

SEC ID NO: 93 Cebador Nef/SPCR:

GCTAGTACCAGTTGAGCCAG

16.5. Componentes de las reacciones: amplificación y cuantificación de la secuencia diana

15 La amplificación y cuantificación en tiempo real de la secuencia diana se realizaron en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un Mx3005P QPCR System (Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron, 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo), y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 55°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían cebador 3' Nef/3PCR 200 nM y cebador 5' Nef/5PCR 40 nM, partzima NefA4/6-P 200 nM y partzima NefB5/6-P 200 nM, SubBi-6-TRB2 200 nM, MgCl₂ 10 mM, dNTP 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 1x Immobuffer (Bioline), 0,5 unidades de Immolasa (Bioline), 10 unidades de MMLV RT (H-) y 5 ml de o bien molde de ARN total (que contiene 45.000 pg, 4500 pg, 450 pg, 45 pg, 4,5 pg, o 0,45 pg) o bien sin diana (solo agua).

16.6. Resultados: Amplificación de la diana y escisión del sustrato informador SubBi-6-TRB2

25 La MNAzima para la detección y la cuantificación en tiempo real de los transcritos *nef* de VIH-1 mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue el ARN viral de VIH-1 amplificado mediante RT-PCR. No hubo incremento en la señal para la reacción de control que carecía de diana (solo agua). Esto demuestra que el aumento de la fluorescencia producido en las reacciones que contenían diana se debió al ensamblaje dependiente de la diana de MNAzimas catalíticamente activas que a continuación escinden el sustrato informador.

30 Se generó una curva patrón trazando el log de la cantidad de molde de ARN en cada reacción frente al ciclo umbral (Ct) que da como resultado un gráfico lineal. El Ct de cada patrón, junto con el coeficiente de correlación (R²), la pendiente y la eficacia de la reacción se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Resultados de la amplificación y la detección de transcritos Nef de VIH

Muestra	Ciclo umbral (Ct) (Promedio de reacciones por duplicado)	ARN viral de VIH (pg)	Resultados
Patrón 1	5,22	45000	Curva de calibración R ² = 0,996 Pendiente = -4,271 Eficacia = 71,4%
Patrón 2	9,96	4500	
Patrón 3	13,78	450	
Patrón 4	17,22	45	
Patrón 5	22,09	4,5	
Patrón 6	27,15	0,45	
Control sin diana	Sin señal	0	Sin señal

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

Ejemplo 17: Requerimientos de secuencia de la actividad catalítica de las MNAzimas.

17.1. Oligonucleótidos de partzimas

5 El núcleo catalítico de la ADNzima 10:23, como se descubrió originalmente, comprende 15 nucleótidos (Santoro y Joyce, 1997). Estudios posteriores de las bases críticas dentro del núcleo catalítico han demostrado que ciertas sustituciones de bases específicas disminuyen significativamente la actividad catalítica, mientras que otras son bien toleradas (Zaborowska *et al*).

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

SEC ID NO: 94 partzima A5 RO4A5/2:

GGGCTGGTCATCCAGCAG*TACAACGAGAGGAAACCTT*

20 SEC ID NO: 95 partzima A5 RO4A5/2-G14A:

GGGCTGGTCATCCAGCAG*TACAACAAGAGGAAACCTT*

SEC ID NO: 96 partzima A5 RO4A5/2-A9T:

GGGCTGGTCATCCAGCAG*TCAACGAGAGGAAACCTT*

SEQ ID NO: 97 partzima A5 R04A5/2-A12T:

25 **GGGCTGGTCATCCAGCAG***TACATCGAGAGGAAACCTT*

SEC ID NO: 98 partzima A5 RO4A5/2-A11T:

GGGCTGGTCATCCAGCAG*TACTACGAGAGGAAACCTT*

SEC ID NO: 99 partzima B6 RO4B6/2:

*TGCCCAGGGAGGCTAGC***GTGTTTCGACAATGGCAGCA**

30 SEC ID NO: 100 partzima B6 RO4B6/2-C7A:

*TGCCCAGGGAGGCTAG***AGTGTTCGACAATGGCAGCA**

SEC ID NO: 101 partzima B6 RO4B6/2-T4C:

*TGCCCAGGGAGGC***CAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA**

17.2. Sustrato informador

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

40 SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

17.3. Secuencia diana

Se utilizó un oligonucleótido de ADN sintético como molde de diana en este experimento. Las secuencias de la diana se muestra a continuación, 5' a 3'.

SEC ID NO: 102 DianaRO4/2:

ATGCTGCCATTGTGCGAACACCTGCTGGATGACCAGCCCAA

17.4. Condiciones de reacción

5 El análisis de la actividad catalítica de diversos pares partzima se realizó utilizando un termociclador SmartCycler System (Cepheid). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 25 mL. Cada reacción contenía 1 x PCR Buffer II (Applied Biosystems), MgCl₂ 10 mM, SubBi-2FB 0,2 M, DianaRO4/2 2 M y un par de partzimas A y B cada una 2 m. Los pares de partzimas en cada reacción fueron los de la siguiente Tabla 20.

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

Reacción	Partzima A	Partzima B	Número de repeticiones
Partzimas A y B de Control (no mutadas)	RO4A5/2	RO4B6/2	6
Partzima A mutada (G14A) y partzima B de control	RO4A5/2-G14A	RO4B6/2	3
Partzima A mutada (A12T) y partzima B de control	RO4A5/2-A12T	RO4B6/2	3
Partzima A mutada (A11T) y partzima B de control	RO4A5/2-A11T	RO4B6/2	3
Partzima A mutada (A9T) y partzima B de control	RO4A5/2-A9T	RO4B6/2	3
Partzima A de control y partzima B mutada (C7A)	RO4A5/2	RO4B6/2-C7A	3
Partzima A de control y partzima B mutada (T4C)	RO4A5/2	RO4B6/2-T4C	3

10

Las reacciones se incubaron a 54°C durante 20 minutos y los datos de fluorescencia se recogieron a intervalos de 12 segundos. Dado que la fluorescencia de partida puede variar para los pocillos individuales en el termociclador SmartCycler System, el valor de fluorescencia inicial se restó de la fluorescencia en cada momento puntual para cada reacción para permitir la comparación entre reacciones en diferentes pocillos. Los promedios de las reacciones repetidas, que contenían o bien partzima A mutada o bien partzima B mutada, se expresaron a continuación en forma de porcentaje de la fluorescencia para las repeticiones de control.

15

17.5. Resultados: Detección de la escisión del sustrato informador SubBi-2-FB.

La escisión del sustrato por los diversos pares de partzimas se midió por el cambio en la fluorescencia a lo largo del tiempo. Los valores de fluorescencia normalizados para cada reacción se expresaron a continuación en forma de porcentaje de la fluorescencia observada en las reacciones de control en el momento puntual equivalente (Tabla 21).

20

(Continúa en página siguiente)

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

Número de posición en el núcleo catalítico de 5' a 3'	Secuencias del núcleo parcial de partzima (control)		Secuencia 10:23 núcleo (Santoro y Joyce 1997)	Base sustituida (y nombre) en (*) partzima A o B o en (**)ADNzima 10:23	Actividad de escisión (porcentaje de control) para las enzimas de ADN con sustituciones	
	Partzima B	Partzima A			* MNAzimas (54°C durante 10min)	** ADNzima 10:23 (37°C durante 20 minutos)
1	G		G			
2	G		G			
3	C		C			
4	T		T	C	17%	<10%
5	A		A			
6	G		G			
7	C		C	A (C7A)	40%	<80%
8		T	T			
9		A	A	T (A9T)	70%	90%
10		C	C			
11		A	A	T (A11T)	86%	80%
12		A	A	T (A12T)	80%	80%
13		C	C			
14		G	G	A (G14A)	3%	<10%
15		A	A			

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

15 Como tal, la información de las publicaciones acerca de otras sustituciones de secuencias, que son compatibles con la actividad de la ADNzima (por ejemplo ADNzima 10:23 o ADNzimas 8:17), podría predecir la actividad catalítica esperada cuando se introduce la misma variación de secuencia en una de las partzimas. Adicionalmente, un experto en la técnica podría utilizar pruebas empíricas para identificar variantes adicionales de la secuencia del núcleo catalítico parcial de la partzima, que son compatibles con la formación de MNAzima activa.

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

Los aptámeros son moléculas de ADN de hebra sencilla o de ADN evolucionado *in vitro* a partir de grandes reservas de oligonucleótidos de secuencia aleatoria por su capacidad para unirse a dianas con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se han seleccionado por su capacidad para unirse específicamente a muchos tipos de dianas incluyendo proteínas, hidratos de carbono, lípidos, nucleótidos, células completas y virus. En este ejemplo, se incorporó una secuencia de aptámero al extremo de un partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual solamente se formaba una MNAzima activa en presencia de la diana. Existen varias maneras de lograr este objetivo, incluyendo las estrategias esbozadas en la Figura 4 y la estrategia utilizada en el siguiente ejemplo que se ilustra en la Figura 20.

Los oligonucleótidos de ácido nucleico requeridos para la estrategia de detección con MNAzima ilustrados en la Figura 20 incluyen; una partzima convencional;

- a) una apta-partzima que es una partzima con un aptámero incorporado en uno de sus extremos;
- b) 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;
- c) un sustrato sonda informador; y
- d) un oligonucleótido inhibidor que hibrida con la apta-partzima en una región que abarca al menos parte de la secuencia de aptámero y parte del brazo de unión al sustrato de la secuencia de la partzima.

En ausencia de una diana que se una al aptámero (panel de la izquierda en la Figura 20), el oligonucleótido inhibidor se une a la apta-partzima bloqueando de este modo la unión (y escisión) del sustrato sonda informador. En la presencia de una diana que se une al aptámero (panel de la derecha en la Figura 20), la diana se une a la secuencia del aptámero de la apta-partzima, evitando la unión del oligonucleótido inhibidor y permitiendo la unión y escisión del sustrato sonda informador. Como tales, la MNAzimas solo se pueden formar y ocasionar la generación de señal fluorescente en presencia de la diana.

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

18.1. Oligonucleótidos de partzimas, ensamblaje y oligonucleótidos inhibidores

En este ejemplo la secuencia de aptámero de ATP se colocó adyacente al brazo para el sustrato de la apta-partzima A (Figura 20). Los brazos sensores de la apta-partzima A y de la partzima B se diseñaron para unirse a un facilitador del ensamblaje. Las secuencias de la apta-partzima AtpA2/1 y de la partzima Atp B3/1 (Figura 21) se muestran a continuación (5' a 3'). En las siguientes secuencias 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 *cursiva* hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto sin formato de la partzima AtpA2/1 indican secuencias de aptámeros de ADN que se unen al ATP o dATP.

SEC ID NO: 103 Apta-Partzima A2 AtpA2/1:

AACGTACACTGCACGCCGGTCGAAATAGTGAGTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT

SEC ID NO: 104 Partzima B3 AtpB3/1:

*CATCTCTTCT*CCGAGC**GTCTGTACCGTGTAC**

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

SEC ID NO: 105 Facilitador del ensamblaje ATPC/1:

GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

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

SEC ID NO: 106 Inhibidor ATPR/1:

CCAGGTA~~CTCACTATTT~~

18.2. Sustrato informador

La actividad de la MNAzima se controló mediante la 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', de más

abajo. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical 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 controlaron a 520 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGATT

18.3. Dianas

Las moléculas diana para este ejemplo fueron adenosina 5'-trifosfato (ATP) y desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP). La guanosina 5'-trifosfato (GTP) y citosina 5'-trifosfato (CTP) se utilizaron como controles negativos. Todas las moléculas se adquirieron de Bioline. Se usó agua libre de nucleasa como control sin diana.

18.4. Condiciones de reacción

La detección de la diana se midió por un aumento de la señal fluorescente causado por escisión del sustrato informador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 mL. Antes de la inyección de 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 AtpA2/1 200 nM, AtpB3/1 200 nM, AtpC/1 200 nM, AtpR/1 200 nM, SubBi-1-FB 200 nM, MgCl2 25 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5 y cualquiera de ATP, dATP, GTP, CTP 2 mM o sin diana (agua).

18.5. Resultados: Detección y escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

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

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

La bibliografía contiene secuencias para un gran número de aptámeros capaces de detectar muchos tipos de dianas. Estas incluyen proteínas, hidratos de carbono, lípidos, priones, nucleótidos, células completas y virus. Los aptámeros para todos estos tipos de dianas se podrían conectar a partzimas para detectar una gama muy diversa de moléculas. Las condiciones de reacción (tampón, temperatura, concentración de cationes divalentes, etc.), que son compatibles tanto con la unión de las dianas a los aptámeros (o apta-partzimas) como con la escisión de un sustrato informador por una MNAzima, se pueden determinar mediante pruebas empíricas. Adicionalmente, puesto que los aptámeros se desarrollaron *in vitro* bajo condiciones de reacción seleccionadas por el investigador sería posible adaptar la evolución molecular para permitir el desarrollo de aptámeros para cualquier diana deseada que se una en condiciones compatibles con la escisión de la MNAzima. Como las MNAzimas son activas sobre una gama muy amplia de condiciones, un experto en la técnica podría determinar fácilmente las condiciones compatibles con la escisión de la MNAzima.

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

Las MNAzimas se pueden utilizar para detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana en tiempo real utilizando métodos de amplificación de la diana *in vitro* tales como PCR. Las MNAzimas también se pueden utilizar para generar resultados cualitativos, por ejemplo mediante la detección de cambios en las secuencias de ácidos nucleicos. La detección de dianas mediada por MNAzimas se puede producir a través de el reconocimiento de bases de Watson-Crick de los brazos de los sensores y la secuencia diana. En este ejemplo, las MNAzimas se utilizan para detectar un emparejamiento erróneo de una sola base mediante la explotación de este requerimiento para determinar la complementariedad entre el brazo sensor de la partzima y la secuencia de ácido nucleico diana.

19.1. Oligonucleótidos de partzimas

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

10 SEC ID NO: 107 Partzima A5 RO5A5/2 (22)-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 108 Partzima B6 RO5B6/2 (11G)-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGA-P

SEC ID NO: 109 Partzima B6 RO5B6/2 (11C)-P:

15 *TGCCCAGGGAGGCTAGCGT**C**GAGACGGA-P*

19.2. Sustrato informador

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

20

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCgGCCCTGGGCA

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

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

SEC ID NO: 32 Cebador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEC ID NO: 110 Cebador 3RO5/2:

30 AGCAGCCACAAAGGCAGA

19.4. Secuencias diana y controles

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

19.5. Componentes de Reacción: amplificación y detección de la secuencia diana

35 La amplificación y la detección tiempo real de la secuencia diana se llevaron a cabo en un volumen total de reacción de 25 ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 47°C durante 30 segundos. Las reacciones contenían 5RO5/1 40 nM, de 3RO5/2 200 nM, RO5A5/2 (22)-P 200 nM y RO5B6/2 200 nM (11G)-P o RO5B6/2 (11C)-P 200 nM, SubBi-2-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, dNTP 40 200 mM cada uno, 10 unidades de Rnasina (Promega), 1 x ROX de referencia (Invitrogen), 1x Immobuffer (Bioline), 1 unidad de Immolasa (Bioline) y o bien 100 ng de molde de ADN genómico o bien agua NF.

19.6. Resultados: detección de emparejamientos erróneos de una sola base utilizando una MNAzima

45 La MNAzima que comprende el brazo sensor completamente emparejado B mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando la secuencia diana utilizada fue ADN genómico humano amplificado mediante PCR (Figura 22 (ii)). En contraste, la MNAzima que contenía el brazo sensor emparejado erróneamente B mostró un bajo nivel de fluorescencia con la diana genómica, similar al observado en el control sin diana, y la fluorescencia no

aumentó a lo largo del tiempo. Por lo tanto, el emparejamiento erróneo sencillo, a tres bases de la unión de la partzima A y B, fue suficiente para prevenir la formación de la MNAzima activa.

5 Este ejemplo demuestra que las MNAzimas se pueden utilizar para detectar emparejamientos erróneos de una sola base entre la diana y los brazos sensores. Puesto que las MNAzimas son capaces de detectar alteraciones tan pequeñas como cambios de una sola base, sería obvio para un experto en la técnica que las MNAzimas también podrían utilizarse para discriminar secuencias que difieren en pequeñas deleciones o pequeñas inserciones. Además, también se podrían detectar alteraciones más grandes, tales como las translocaciones asociadas con diversos tipos de cáncer, que dan como resultado transcritos de fusión. Estas se producen con frecuencia en asociación con la leucemia, por ejemplo los transcritos de fusión *PML/RAR α* se asocian con la leucemia promielocítica aguda y los transcritos de fusión *bcr/abl* están asociados con la leucemia granulocítica crónica.

10 Si bien este ejemplo demuestra que los emparejamientos erróneos sencillos pueden ser suficientes para evitar el ensamblaje de la MNAzima activa, experimentos adicionales demostraron que no todos los emparejamientos erróneos de una sola base interrumpían completamente el ensamblaje de la MNAzima en todas las condiciones. La capacidad para discriminar los emparejamientos erróneos de una sola base depende de varios factores, incluyendo a) el rigor de las condiciones de reacción, que puede ser influenciado por muchos factores incluyendo temperatura, concentración de sal, concentración de cationes, b) el tipo de emparejamiento erróneo, por ejemplo emparejamientos erróneos G/T frente a C/C, c) la posición del emparejamiento erróneo dentro del brazo de la partzima, y d) la longitud del brazo de la partzima.

15 Se pueden utilizar estrategias adicionales para incrementar la capacidad de la MNAzima para detectar polimorfismos de una sola base. Estas incluyen, por ejemplo, el uso de un brazo sensor de la partzima truncado como se demuestra en el ejemplo 22.

Ejemplo 20: Ensayo de la actividad de la MNAzima a partir de una serie de pares de partzimas que contienen secuencias del núcleo catalítico parciales variantes derivadas del núcleo catalítico de 10:23

25 Se pueden elaborar enzimas de ácido nucleico de múltiples componentes (MNAzimas) que incorporan secuencias parciales de una variedad de ADNzimas evolucionadas *in vitro*. Se han mostrado MNAzimas activas, basadas en secuencias parciales de las ADNzimas 8:17 y 10:23. Adicionalmente, se ha demostrado que varios diseños de partzima alternativos basados en las ADNzimas 8:17 y 10:23 tienen (Ejemplos 1, 3, Figuras 9, 10 y 13), o carecen de (Ejemplo 1, Figura 8), actividad. En este ejemplo se amplían adicionalmente estos estudios y se identifican secuencias de partzimas tanto activas como inactivas sobre la base de las secuencias de núcleo catalítico parcial de la ADNzima 10:23. Adicionalmente, el ejemplo proporciona un protocolo general para las etapas necesarias para identificar el lugar o lugares óptimos para dividir una secuencia de núcleo catalítico de tal manera que, cuando las secuencias de núcleo catalítico parciales se incorporen a las partzimas, se generen MNAzimas activas funcionales.

20.1. Oligonucleótidos de partzimas

35 El método de este ejemplo se utilizó para investigar qué posiciones dentro de la secuencia del núcleo catalítico de 10:23 eran adecuadas para dividir en secuencias del núcleo catalítico parcial que, tras la incorporación a partzimas, dan como resultado MNAzimas funcionalmente activas. La secuencia de 10:23 se dividió en varios puntos y a continuación, las dos secuencias parciales se incorporaron a una serie de pares de partzimas que se diseñaron para escindir un sustrato en presencia de una diana (gen de RPLPO humano). Los núcleos catalíticos parciales para cada par de partzimas que se sometieron a ensayo se muestran en la Tabla 22 con referencia a la secuencia completa del núcleo catalítico de la ADNzima 10:23 (Santoro y Joyce, 1997).

(Continúa en página siguiente)

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

Posición en Núm.	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		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 se escriben de 5' a 3'. La nomenclatura del diseño de la MNAzima y la partzima es una continuación de la serie en la Tabla 3 y se prolonga en esta tabla para identificar la localización de la división dentro del núcleo. Por ejemplo, el Diseño 6 es una MNAzima derivada de 10:23 con el diseño de partzima A4 y partzima B5 (A4:B5), donde el núcleo se ha dividido entre la T de la posición 8 y la A de la posición 9 (T8-A9).

5 En este experimento la serie de pares de partzimas se sintetizó entera con los brazos sensores diseñados para hibridar con el exón 5 del gen de RPLPO humano, y con los brazos para el sustrato dirigidos hacia el sustrato, SubBi-2. Los pares de partzimas utilizados en este experimento fueron sintetizados por Sigma-Proligo y sus secuencias se enumeran 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 *cursiva* hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación 3' del oligonucleótido'.

Par de partzimas para RPLPO A4:B5

SEQ ID NO: 147 RO5A4/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 112 RO5B5(16)/2-P

15 *TGCCCAGGGAGGCTAGCT*GTGGAGACGGATTACA-P

Par de partzimas para RPLPO A5:B6

SEC ID NO: 107 RO5A5/2(22)-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 114 RO5B6 (16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGATTACA-P

Par de partzimas para RPLPO A6:B7

SEC ID NO: 115 RO5A6(22)/2-P

5 **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT**ACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 116 RO5B7(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTACGTGGAGACGGATTACA-P

Par de partzimas para RPLPO A7:B8

SEC ID NO: 117 RO5A7(22)/2-P

10 **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT**CAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 118 RO5B8(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTAGTGGAGACGGATTACA-P

Par de partzimas para RPLPO A8:B9

SEC ID NO: 119 RO5A8(22)/2-P

15 **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT**CTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 120 RO5B9(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGGTGGAGACGGATTACA-P

Par de partzimas para RPLPO A9:B10

SEC ID NO: 121 RO5A9(22)/2-P

20 **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCT**GCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 122 RO5B10(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGTGGAGACGGATTACA-P

20.2. Sustrato informador

25 El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB

30 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

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

Las secuencias de los cebadores se muestran, 5' a 3', a continuación.

SEC ID NO: 123 Cebador 5' 5RO5/2

GCTACCCAACTGTTGCATC

35 SEC ID NO: 110 Cebador 3' 3RO5/2

AGCAGCCCAAAGGCAGA

20.4. Molde de diana

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

20.5. Condiciones de reacción

La amplificación en tiempo real de la secuencia diana y la detección de la actividad catalítica de los pares de partzimas se llevaron a cabo en una reacción de 25 ml ciclada en un termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Los parámetros de ciclación fueron 95°C durante 7 minutos, 10 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 65°C durante 30 segundos (con una disminución de 1°C en la temperatura por ciclo) y finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 50°C durante 30 segundos. Cada reacción contenía 5RO5/1 0,04 mM y 3RO5/2 0,2 mM, MgCl₂ 10 mM, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada uno 50 mM, 1 x Immobuffer (Bioline), subbi-2-FB 0,2 mM, 1x colorante referencia Rox (Invitrogen), 10 unidades de Rnasina (Progema) y 1 unidad de Polimerasa Immolasa (Bioline) y 100 ng de ADN genómico. Además cada reacción contenía un par de partzimas de partzima A 0,2 M y partzima B 0,2 M (Par de Partzimas para RPLPO A4:B5 o A5:B6 o A6:B7 o A7:B8 o A8:B9 o A9:B10).

20.6. Resultados

Utilizando un método de PCR con MNAzima en tiempo real, se detectó la actividad catalítica de tres de los seis pares de partzimas para RPLPO. Los pares de partzimas A4:B5 y A5:B6 mostraron altos niveles de actividad catalítica, permitiendo la detección de la diana en ≤ 22 ciclos (Tabla 23). El par de partzimas A7:B8 también fue activo, aunque menos activo que A4:B5 y A5:B6. No se detectó actividad catalítica de los pares de partzimas A6:B7, A8:B9 o A9:B10 en las condiciones de este experimento.

Tabla 23: Valores del Ciclo Umbral (Ct) obtenidos diferentes pares de partzimas

División del núcleo (véase la tabla anterior, en este ejemplo)	Ct	Comentarios
A4:B5 (T8-A9)	19,3	Esta combinación de secuencias del núcleo catalítico parcial en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A5:B6 (C7-T8)	21,6	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A6:B7 (A11-A12)	Sin señal en 50 ciclos	Esta combinación de secuencias del núcleo catalítico parcial 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 del núcleo catalítico parcial en estas partzimas es compatible con la formación de MNAzimas activas.
A8:B9 (G6-C7)	Sin señal en 50 ciclos	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partzimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.
A9:B10 (A5-G6)	Sin señal en 50 ciclos	Esta combinación de secuencias de núcleo catalítico parcial en estas partzimas no es compatible con la formación de MNAzimas activas en estas condiciones experimentales.

Los valores de Ct se promedian a partir de reacciones por triplicado, cuando el nivel de fluorescencia umbral se fijó en 0,2 y la fluorescencia de fondo del momento inicial se restó entre los ciclos 1 y 14.

Ejemplo 21: Aplicación de MNAzimas para detectar dianas de proteína.

Como se demuestra en el ejemplo 18, se pueden utilizar MNAzimas para detectar dianas mediante la incorporación de secuencias de aptámeros al extremo de un partzima (apta-partzima). En este ejemplo, se utilizó la misma estrategia de detección con MNAzima (Figura 20) para detectar la proteína polimerasa *Taq* utilizando una secuencia de aptámero de 46 nucleótidos de longitud, que se ha informado que se une a la polimerasa *Taq* con una alta especificidad (Yakimovich, 2003). El facilitador del ensamblaje y oligonucleótido de la partzima B fueron los mismos que los utilizados en el ejemplo 18, donde se detectó ATP utilizando un MNAzima.

21.1. Oligonucleótidos de partzimas, ensamblaje y oligonucleótidos inhibidores

En este ejemplo, se colocó la secuencia del aptámero para la polimerasa *Taq* adyacente al brazo para el sustrato de la apta-partzima A (Figura 20). Los brazos sensores de la apta-partzima A y la partzima B fueron diseñados para que se unieran a un facilitador del ensamblaje. Las secuencias de la apta-partzima TaqA2/1 y la partzima AtpB3/1 se muestran a continuación (5' a 3'). En las siguientes secuencias 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 *cursiva* hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto sin formato de la apta-partzima A2 TaqA2/1 indican secuencias de aptámeros de ADN que se unen a polimerasa *Taq*.

SEC ID NO: 124 Apta-Partzima A2 TaqA2/1:

10 **AACGTACACTGCACGCGGTCGAAATAGTGAGTGCGGTTCGGCTCGGGGCATTC**

TTAGCGTTTTGCCCCGCGCCGACCGC

SEC ID NO: 104 Partzima B3 AtpB3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCGTCTGTACCGTGTAC

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

15 SEC ID NO: 105 Facilitador del ensamblaje AtpC/1:

GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

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

SEC ID NO: 125 Inhibidor TaqR/1:

TGCCCCGAGCCGACCGAACTCACTATTT

20 21.2. Sustrato informador

La actividad de la MNAzima se controló mediante la escisión de un sustrato informador de ácido nucleico doblemente marcado. El sustrato informador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Las bases subrayadas indican la posición de un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical 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 controlaron a 520 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM).

SEC ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACIATaGGAAGAGAIT

30 21.3. Diana

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

21.4. Condiciones de reacción

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

21.5. Resultados: detección y escisión del sustrato informador SubBi-1-FB

En ausencia de polimerasa *Taq* se observó un bajo nivel de fluorescencia que solo aumentó ligeramente a lo largo del tiempo, demostrando que el oligonucleótido inhibidor era capaz de evitar el ensamblaje de una MNAzima activa. 45 En presencia de polimerasa *Taq*, la señal fluorescente fue mayor y aumentó a lo largo del tiempo. Esto indica que el oligonucleótido inhibidor fue desplazado por la polimerasa *Taq* y se formó una MNAzima activa. El ensamblaje de la MNAzima fue dependiente de la diana ya que la señal fluorescente en presencia de polimerasa de Klenow fue similar a la señal en ausencia de polimerasa *Taq*, esto es, en el control del agua "sin diana". Esto coincide con las

observaciones de Yakimovich *et al* (2003) que demostraron que la secuencia del aptámero para la polimerasa *Taq* es específica para la polimerasa *Taq* y no se une a Klenow. Este ejemplo de MNAzima anterior demuestra que las MNAzimas se pueden acoplar a aptámeros para la detección de proteínas específicas.

5 **Ejemplo 22: Detección de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando una partzima truncada y un oligonucleótido estabilizador**

La detección de dianas mediada por MNAzimas puede ocurrir a través del reconocimiento bases de Watson-Crick de los brazos sensores de la partzima y la secuencia diana. En el ejemplo 19, se utilizó este requerimiento de complementariedad para detectar un emparejamiento erróneo de una sola base entre el brazo sensor de la partzima y la secuencia de ácido nucleico diana. En el siguiente ejemplo, se explotó de nuevo el requerimiento de complementariedad para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando una estrategia que utilizaba una partzima con un brazo del sensor truncado, que puede ser estabilizada por un oligonucleótido estabilizador. La estrategia de detección con MNAzima utilizada en este ejemplo se ilustra en la Figura 23 y los oligonucleótidos requeridos se describen a continuación:

- 15 a) una partzima convencional;
- b) una partzima con un brazo del sensor truncado (p. ej., 5 bases) que está diseñada para que coincida totalmente una forma del SNP, pero no con la otra;
- c) un oligonucleótido estabilizador (p. ej, 15 bases), que hibrida con la diana adyacente al brazo sensor truncado de la partzima.
- 20 El estabilizador está diseñado para facilitar el ensamblaje de la MNAzima cuando el brazo sensor de 5 nucleótidos se hibrida con la diana; y
- d) un sustrato de sonda informadora.

22.1. Oligonucleótidos de partzimas y oligonucleótido estabilizador

25 En este ejemplo, el brazo sensor de la partzima B se diseñó para que tuviera solo 5 nucleótidos de longitud y para discriminar un SNP existente en el oligonucleótido diana. El brazo sensor de la partzima B se diseñó para hibridara con la forma "T" del SNP, pero no la forma "C" del SNP. Las secuencias de las partzimas A y B y el oligonucleótido estabilizador se muestran a continuación (5' a 3'). En las siguientes secuencias las bases en negrita hibridan con la diana, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, y bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. "-P" indica la fosforilación 3' del oligonucleótido'.

SEC ID NO: 126 Partzima A4 XdA4/2-P:

30 **ACTGGATGTCCATCTGTCTG**ACAACG*A*GAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 127 Partzima B5 XdB5/2-P:

*T*GCCCAGGGAGGCTAGCT**TATAC**-P

SEC ID NO: 128 Estabilizador XdF/2-P:

CTTCGTGAGGGTGAG-P

35 **22.2. Sustrato informador**

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

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

22.3. Diana

45 Las moléculas diana para este ejemplo fueron oligonucleótidos sintéticos derivados del gen Xd. Una de las dianas correspondía a la forma "T" del SNP (XDC/2(52)) y coincidía plenamente con el brazo sensor de la B partzima. La otra diana correspondía a la forma "C" del SNP y tenía un emparejamiento erróneo para brazo sensor de la partzima B. Los oligonucleótidos sintéticos se solicitaron a Sigma-Prologo y se utilizó agua libre de nucleasa en lugar diana como control "sin diana". Las secuencias de las dos dianas se enumeran a continuación (5' a 3') con el SNP subrayado.

SEC ID NO: 129 Diana XDC/2(52):

TGCCCCCTCACCCCTCACGAAGGIATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

SEC ID NO: 130 Diana (emparejamiento erróneo) XDC/2(1m52):

TGCCCCCTCACCCCTCACGAAGGCATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

5 22.4. Condiciones de reacción

La detección de la secuencia diana se midió por un aumento de la señal fluorescente causado por la escisión del sustrato informador por la MNAzima catalíticamente activa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 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 XdA4/2-P 200 nM, XdB5/2-P 200 nM, 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems) y MgCl₂ 25 mM. Además, la reacción contenía los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 24.

Tabla 24. Reactivos adicionales en las reacciones con MNAzima.

Reacción	Diana	Estabilizador
A	XDC / 2 (52) 200 nM	XdF/2-P200 nM
B	XDC / 2 (1m52) 200 nM:	XdF/2-P200 nM
C	XDC / 2 (52) 200 nM	Sin estabilizador
D	Sin diana	XdF/2-P200 nM

22.5. Resultados: Detección y escisión del sustrato informador SubBi-2-FB

La MNAzima mostró un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando se utilizó el molde con el la plantilla de SNP completamente emparejado (Reacción A: Figura 23). En contraste, cuando el molde tenía un emparejamiento erróneo (contenida un SNP), la señal fluorescente no aumentó a lo largo del tiempo (Reacción B: Figura 23). Del mismo modo, no hubo un aumento en la fluorescencia en ausencia de oligonucleótido diana (Reacción D: Figura 23). Se demostró que la presencia del oligonucleótido estabilizador era esencial para estabilizar el complejo de MNAzima. Una reacción que contenía todos los componentes de la reacción, incluyendo la diana completamente emparejada, pero que carecía del oligonucleótido estabilizador, no dio lugar a ningún aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo (Reacción C: Figura 23). Como tales, las 5 bases del brazo del sensor eran insuficientes para formar un complejo de MNAzima estable, pero la presencia de un oligonucleótido estabilizador pudo compensar la corta longitud del brazo sensor de la partzima (5 bases) y permitir la formación de MNAzima estable en condiciones de temperatura rigurosas (55°C en este ejemplo). El oligonucleótido estabilizador se puede considerar una tercera partzima en este sistema, ya que se requiere para la formación de una MNAzima estable.

Este ejemplo demuestra que las MNAzimas se pueden utilizar para discriminar entre dos dianas que difieren en tan poco como un SNP. Adicionalmente, demuestra la aplicación de partzimas con brazos sensores truncados, y su uso combinado con oligonucleótidos estabilizadores.

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

A diferencia de las ribozimas, no se han encontrado que existan ADNzimas en la naturaleza. Las ADNzimas han evolucionado *in vitro* a partir de grandes bibliotecas de oligonucleótidos. Se ha intentado la sustitución de ciertos desoxirribonucleótidos por ciertos ribonucleótidos en ribozimas conocidas en ciertas condiciones (McCall et al., 1992). Las ribozimas que se han convertido completamente a ADN no tienen actividad debido a las diferencias conformacionales del ARN y el ADN (Perreault et al., 1990). Estos estudios demuestran que las enzimas de ARN no pueden modificarse a enzimas de ADN funcionales por la simple sustitución de ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos. Se realizaron experimentos para investigar la tolerancia de las MNAzimas a la sustitución de ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos.

23.1. Oligonucleótidos de partzimas

En este ejemplo, se sintetizaron varias partzimas en las que uno o más desoxirribonucleótidos fueron reemplazados por ribonucleótidos en las regiones que constituyen el núcleo catalítico parcial. Se sintetizaron partzimas que tenían o bien una sustitución de un único ribonucleótido, o bien que tenían la región del núcleo catalítico parcial completa

reemplazada por ribonucleótidos. Los oligonucleótidos de las partzimas A y B tenían brazos sensores complementarios a una región del exón 4 del gen *RPLPO* humano. Los oligonucleótidos de las partzima se enumeran a continuación, 5' a 3'. En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las bases en minúscula representan bases de ARN que han sustituido a las bases de ADN.

5 SEC ID NO: 131 partzima A (control) RO4A5(18)/2-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 132 partzima B (control) RO4B6 (19)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGC**GTGTT**CGACAATGGCAGCA-P

10 SEC ID NO: 133 Partzima A (ribo-14g): RO4A5(18)/2-RG14-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACgAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 134 Partzima A (ribo-9a): RO4A5(18)/2-RA9-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTaCAACGAGAGGAAACCTT-P

SEC ID NO: 135 Partzima A (ribo x 8): RO4rA5(18)/2

15 **GGGCTGGTCATCCAGCAG**uacaacgaGAGGAAACCTT

SEC ID NO: 136 Partzima B (ribo x 7): RO4rB6(19)/2

TGCCCAGGGAggcuagc**GTCTT**CGACAATGGCAGCA

23.2. Sustrato informador

20 El sustrato informador para este ejemplo fue SubBi-2 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-2 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-2-FB. La escisión de SubBi-2-FB se controló a 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). En la siguiente secuencia las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 21 SubBi-2-FB:

25 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

23.3. Secuencia diana

Un oligonucleótido de ADN sintético se utilizó como molde de diana en este experimento. La secuencia de la diana se muestra a continuación, 5' a 3'.

SEC ID NO: 8 DianaRO4/1

30 GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

23.4. Condiciones de reacción

35 El análisis de la actividad catalítica de los diversos pares de partzimas se llevó a cabo utilizando un termociclador SmartCycler System (Cepheid). Los volúmenes totales de reacción fueron de 25 ml y cada reacción contenía 1 X PCR Buffer II (Applied Biosystems), MgCl₂ 10 mM, SubBi-2-FB 0,2 M, DianaRO4/1 2 M de y un par de partzimas A y B cada una 2 mM. Los pares partzima de cada reacción fueron lo de la Tabla 24.

Tabla 24: Partzimas en diversas reacciones

Reacción	Partzima A	Partzima B	Número de repeticiones
Partzimas de control A y B (solo ADN)	RO4A5(18)/2-P	RO4B6(19)/2-P	4
Partzima A (Ribo - 9a) y partzima B de control	RO4A5(18)/2-RA9-P	RO4B6(19)/2-P	3
Partzima A (Ribo - 14g) y partzima B de control	RO4A5(18)/2-RG14-P	RO4B6(9)/2-P	3
Partzima A (Ribo x 8) y el partzima B de control	RO4rA5(18)/2	RO4B6(9)/2-P	3
Partzima A de Control y Partzima B (Ribo x 7)	RO4A5(18)/2-P	RO4rB6(19)/2	3
Partzima A (Ribo x 8) y Partzima B (Ribo x 7)	RO4rA5(18)/2	RO4rB6(19)/2	3

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

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

10 La escisión catalítica del sustrato por las MNAzimas compuestas por los diversos pares de partzimas se verificó un cambio en la fluorescencia a lo largo del tiempo (Tabla 25).

Tabla 25: Resultados obtenidos utilizando diferentes combinaciones de partzimas.

Reacción	Resultado
Reacción de control con partzimas A y B solo con ADN	Rápido aumento de la fluorescencia, la fluorescencia alcanzó una meseta después de 5 minutos de incubación.
Partzima A (Ribo - 9a) y partzima B de control	Aumento de la fluorescencia, la fluorescencia aún no había llegado a una meseta después de 20 minutos de incubación.
Partzima A (Ribo-14g) y partzima B de control	Rápido incremento en la fluorescencia; la fluorescencia alcanzó una meseta después de 5 minutos de incubación.
Partzima A (Ribo x 8) y partzima B de control	No hay un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo.
Partzima A de control y Partzima B (Ribo x 7)	No hay un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo.
Partzima A (Ribo x 8) y Partzima B (Ribo x 7)	No hay un aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo.

15 El experimento muestra que algunas sustituciones de ribonucleótidos dentro del núcleo catalítico parcial de las partzimas son compatibles con la formación de MNAzimas activas. Si bien la sustitución individual (partzima A (ribo-14g)) tenía una actividad similar a la de todas las partzimas de ADN en estas condiciones, una sustitución individual alternativa (partzima A (ribo9a)), si bien sigue siendo compatible con la formación de MNAzima activa, escindía el sustrato a una velocidad más lenta que el control. La MNAzima no toleró la sustitución de todos los nucleótidos en el dominio de núcleo catalítico parcial de la partzima A y/o la partzima B.

Ejemplo 24: Activación de un MNAzima por la liberación de partzimas fijadas como mecanismo para iniciar una cascada de amplificación de la señal.

24.1. Cascadas de amplificación de la señal mediadas por MNAzimas

5 Se pueden utilizar MNAzimas para iniciar cascadas de amplificación de la señal. Una estrategia para semejante cascada de amplificación de la señal se ilustra en la Figura 25. En la presencia de la diana, la MNAzima 1 activa se forma a partir de partzimas que están libres en disolución. La MNAzima 1 escinde su sustrato fijado, Sub1, liberando de ese modo los componentes de partzimas para la MNAzima 2. Una vez libres, estas partzimas hibridan con el facilitador del ensamblaje y forman la MNAzima 2 que escinde sustrato Sub 2. El Sub 2 doblemente marcado, que está libre en disolución, es escindido por la MNAzima 2 y se genera señal fluorescente. Además, la MNAzima 2 escinde Sub 2 fijado liberando las partzimas, que tienen los mismos brazos sensores que la MNAzima 2 y cuando hibridan con el facilitador del ensamblaje, forman la MNAzima 3. (El facilitador del ensamblaje puede estar fijado o puede estar libre en disolución). Puesto que la MNAzima 3 comparte los mismos brazos para el sustrato que la MNAzima 1, también puede escindir Sub1 fijado, liberando de este modo más componentes de partzima para MNAzima 2. Esto da como resultado una cascada de generación enzimática de los componentes (partzimas) para más enzimas (MNAzimas) y la amplificación de la señal concomitante.

24.2. Activación de MNAzima fijada capaz de escindir el sustrato marcado fluorescentemente

Este ejemplo demuestra la primera etapa de la cascada de amplificación de la señal como se ilustra en la Figura 25. En esta etapa de inicio, la diana se une a las partzimas, que están libres en disolución, y forma la MNAzima activa 1. La MNAzima 1 escinde su sustrato fijado, Sub 1, liberando de ese modo los componentes de partzima para la MNAzima 2. Una vez libres, estas partzimas hibridan con el facilitador del ensamblaje y forman la MNAzima 2. El Sub 2-FQ doblemente marcado (específicamente SubBi-3-FB en este ejemplo), que está libre en disolución, es escindido por una MNAzima 2 y se genera una señal fluorescente.

24.3. Oligonucleótidos de partzimas

25 En las siguientes secuencias las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, las bases en **negrita** hibridan con la diana y las bases en *cursiva* hibridan con el sustrato. Las bases que están tanto en *cursiva* como subrayadas representan las secuencias de sustrato que se acoplan a las partzimas que van a ser fijadas. "-P" indica la fosforilación del oligonucleótido y "(Biotina)" indica la biotilación del oligonucleótido. Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN. Todas las secuencias enumeradas a continuación se escriben de 5' a 3'.

30 Las partzimas de la MNAzima 1 libres en disolución se diseñaron para que se unieran específicamente al exón 5 del gen de RPLPO humano y las partzimas de la MNAzima 2 fijadas se diseñaron para que hibridaran con el facilitador del ensamblaje.

SEC ID NO: 147 Partzima A4 RO5A4/2-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

35 SEC ID NO: 148 Partzima B5 RO5B5/2-P:

TGCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEC ID NO: 138 Sustrato 1 fijado/Partzima A4 RO4A4/3-5B:

(Biotina)AAAAAAAGGTTTCCTCquCCCTGGGCAGCTGGT**CA**TC**CA**GCAGACAACGAGGTTGTGCTG

SEC ID NO: 139 Sustrato 1 fijado/Partzima B5 RO4B5/3-3B:

40 CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTT**CGACAATGGC**AAGTTTCCTCquCCCTGGGCAAAAAA(Biotina)

24.4. Sustrato informador

El sustrato informador (Sub 2; Figura 25) para este ejemplo es SubBi-3 con la secuencia, de 5' a 3', de más abajo. En el ejemplo actual, SubBi-3 se marcó en el extremo con un radical 6-FAM en el extremo 5' y un radical BHQ1 en el extremo 3' y se designó SubBi-3-FB. La escisión de SubBi-3-FB se controló a 516 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación a 492 nm (longitud de onda de excitación de FAM). Las bases en minúscula representan ARN y las bases en mayúscula representan ADN.

SEC ID NO: 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCGuACCAACCG

24.5. Diana sintética y secuencias del facilitador

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

SEC ID NO: 140 Facilitador del ensamblaje RO4/2-3b:

GCCATTGTGCGAACACCTGCTGGATGACCAGC-(Biotina)

5 SEC ID NO: 141 diana sintética RPLPO 5 (RO5):

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

24.6. Fijación de partzimas biotiladas a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina

10 La fijación de partzimas biotiladas y el facilitador del ensamblaje se llevó a cabo a temperatura ambiente en un volumen total de reacción de 100 ml. La mezcla de unión contenía partzima RO4A4/3-5b 200 nM, partzima RO4B5/3-3b 200 nM y facilitador del ensamblaje RO4/2-3b 200 nM en solución Amresco PBS (sin Ca⁺ y Mg⁺). La mezcla de unión (100 ml) se dividió en alícuotas en cada pocillo de la placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Roche Diagnostics). El tiempo unión fue de 30 minutos, seguido de 3 lavados con PBS, cada uno con 15 minutos de incubación antes del lavado.

24.7. Escisión de la MNAzima fijada y detección del sustrato marcado fluorescentemente escindido

15 La escisión del sustrato marcado fluorescentemente, SubBi-3-FB se verifico isotérmicamente a 55°C durante 4 minutos en el fluorómetro Fluostar Optima (BMG LabTech) en un volumen de reacción total de 100 ml. Las reacciones contenían partzima RO5A4/2-P 200 nM, partzima RO5B5/2-P 200 nM, sustrato SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 25 mM, 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems) y diana RO5 sintética 200 nM. Se utilizó agua libre de nucleasa en lugar de diana RO5 sintética para los controles "sin diana". La reacción se inició con la adición del sustrato SubBi-3-FB.

24.8. Resultados: El cambio en el nivel de fluorescencia en presencia de la diana RO5 frente al control "sin diana"

25 Hay un aumento en la fluorescencia en presencia de la diana RO5 en comparación con las reacciones que carecen de destino (control con agua). El cambio en la fluorescencia después de 4 minutos fue de aproximadamente 36.000 unidades en presencia de la diana, en comparación con <1.000 unidades para el control sin diana. Esto demuestra la capacidad de la MNAzima 1 (compuesta por las partzimas RO5A4/2-P y RO5B5/2-P) para escindir el sustrato fijado y liberar las partzimas que componen la MNAzima 2. Además, demuestra que una vez liberadas, las partzimas pueden formar un complejo de MNAzima activo con el facilitador del ensamblaje que es capaz de escindir el sustrato conduciendo a la generación de la señal.

30 Ejemplo 25: Discriminación directa entre citosinas metiladas y citosina en el ADN.

35 El uso de un brazo estabilizador con un partzima que tiene brazos sensores truncados se utilizó para demostrar la capacidad de las MNAzimas para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentes en el facilitador del ensamblaje con la diana (ejemplo 22). En las condiciones experimentales utilizadas en este ejemplo, se utilizó un brazo de sensor de cinco de base como sonda para los SNP a 55°C, muy por encima de su temperatura de fusión esperada. Los sistemas con brazos estabilizadores, y las partzimas que tienen brazos sensores truncados, son muy sensibles a pequeños cambios en la diana. Esta estrategia de detección se puede ampliar adicionalmente para discriminar directamente entre dianas, que, o bien están metiladas o bien no están metiladas en los residuos de citosina específicos, sin la necesidad de una modificación con bisulfito previa (véase el ejemplo 11).

40 La presencia de 5-metilcitosinas aumenta la temperatura de fusión del ADN en 1,3°C por la base metilada, con respecto a las citosinas no metiladas. De este modo, un partzima, por ejemplo, con un brazo sensor de cinco nucleótidos de longitud sería capaz de unirse a una diana que contuviera tres 5-metilcitosinas a una temperatura casi 4°C más alta que aquella a la que se podría unir a una diana no metilada de la misma secuencia.

45 Cuando las partzimas, un brazo estabilizador, y un sustrato se incuban a una temperatura, que es adecuada para la hibridación y la formación de la MNAzima en presencia de una diana metilada, pero que es demasiado alta para la formación de MNAzima en presencia de una diana no metilada, se generaría una señal solo en presencia de la diana metilada.

Esto proporciona una nueva estrategia para el análisis de los patrones de metilación que puede proporcionar un método para la detección de bases metiladas como marcadores del cáncer y otras enfermedades.

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

50 En la Figura 24 se ilustra una estrategia para utilizar MNAzimas en un formato colorimétrico. En este enfoque, se incorporaría un sustrato de MNAzima a un oligonucleótido de puente. El oligonucleótido puente tiene

complementariedad para los oligonucleótidos anclados a partículas de oro. Si no estuviera presente el facilitador del ensamblaje, el oligonucleótido puente permanecería intacto y las partículas de oro se agregarían virando las reacción a color azul. Si estuviera presente un facilitador del ensamblaje, por ejemplo, un ácido nucleico diana, las MNAzimas activas se ensamblarían a continuación, a partir de las partzimas presentes en disolución, y escindirían el sustrato (y por lo tanto el oligonucleótido puente). Esto conduciría a la dispersión de los productos agregados de partículas de oro, lo que a su vez podrían causar en un cambio de color de azul a rojo.

Esta estrategia con MNAzima proporciona un sistema que incorpora varios componentes genéricos, y como tal, proporciona un método que se puede adaptar fácilmente para cualquier nueva diana. Esto proporciona una ventaja sobre otros sistemas que utilizan ADNzimas y partículas de oro que requieren moléculas más complejas. En esta estrategia con MNAzima, el sustrato de la MNAzima y las partículas de oro con oligonucleótidos anclados podrían ser genéricos y utilizarse para el análisis de cualquier diana de ácido nucleico. Los nuevos sistemas analíticos requerirían solamente la síntesis de nuevas partzimas con brazos sensores complementarios a la nueva diana. Por otra parte, se puede utilizar también la reacción colorimétrica junto con los sistemas de MNAzimas sensibles a la activación por ácidos nucleicos, proteínas u otras dianas.

REFERENCIAS

Patentes y Publicaciones de Patente:

Publicación de Patente Internacional Núm. WO 99/45146

Publicación Internacional PICT Núm. IB99/00848

Publicación de Patente Internacional Núm. WO 99/50452

Publicación de Patente Internacional Núm. WO 00/58505

Publicación de Patente Internacional Núm. WO96/27026

Publicación de Patente Internacional Núm. WO 03/089 650

Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.202

Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.195

Patente de los Estados Unidos Núm. 4.000.159

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.176.995

Patente de los Estados Unidos Núm. 4.965.188

Patente de los Estados Unidos Núm. 6.140.055

Patente de los Estados Unidos Núm. 6.201.113

Otras referencias:

Achenbach, J., Nutiu, R. y Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymes. *Analytica Chimica Acta*. 534(1): 41-51.

Adams, J. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*. Oct;40(10): 1457-63.

Bobrow, M., Harris, T., Shaughnessy, K. and Litt, G. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. Doc 20(125(1-2)): 279-85.

Breaker, R. (1997) DNA enzymes. *Nat Biotech*. 15: 427-431.

Breaker, R.R. y Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*. Dec;1(4): 223-9.

Brown, A., Li, J., Pavot, C. y Lu, Y. (2003) A lead-dependent DNAzyme with a two-step mechanism. *Biochem*. Jun 17;42(23): 7152-61.

Cairns, M., King, A. y Sun, L. (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA. *Nucl Acids Res*. 28(3): e9.

Cairns, M., King, A. y Sun, L. (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucl Acids Res*. Jun 1;31(11): 2883-9.

Carmi, N., Shultz, L.A. y Breaker, R.R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol*. 3(12): 1039-46.

- Chehab, F.F., Doherty, M., Cai, S.P., Kan, Y.W., Cooper, S. y Rubin, E.M. (1987) Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias [letter] [published erratum appears in Nature 1987 Oct 22-28;329(6141):678]. *Nature*. 329(6137): 293-4.
- 5 Chen, C., Ridzon, D., Broomer, A., Zhou, H., Barbisn, M., Lao, K. y Livak, K. (2005) MicroRNA quantitation by looped RT-PCR. AACR. poster.
- Cheng, S., Merlino, G.T. y Pastan (1993) A versatile method for coupling of proteins to DNA:synthesis of a2-macroglobin-DNA conjugates. *Nucleic Acid Research*: 11, 659-669.
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 350(6313): 91-2.
- 10 Cruz, R.P., Withers, J.B. y Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme. *Chem Biol. Jan;11(1)*: 57-67.
- Cuenoud, B. y Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*. 375(6532): 611-4.
- Eigen, M. y Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(13): 5740-7.
- 15 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.
- Fahy, E., Kwoh, D. y Gingeras, T. (1991) Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl. Aug;1(1)*: 25-33.
- 20 Hall, J.G., Eis, P.S., Law, S.M., Reynaldo, L.P., Prudent, J.R., Marshall, D.J., Allawi, H.T., Mast, A.L., Dahlberg, J.E., Kwiatkowski, R.W., de Arruda, M., Neri, B.P. y Lyamichev, V.I. (2000) From the Cover: Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(15): 8272-8277.
- Haseloff, J. y Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. Aug 18; 334(6183): 585-91.
- Huizenga, D. y Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 34: 656-665
- 25 Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. y Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science*. 267(5198): 643-7.
- Impey, H., Applegate, T., Houghton, M., Fuery, C., King, J. y Todd, A. (2000) Factors that influence deoxyribozyme cleavage during polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. Nov 15; 286(2): 300-3.
- 30 Jonas, V., Alden, M., Curry, J., Kamisango, K., Knott, C., Lankford, R., Wolfe, J. y Moore, D. (1993) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2410-2416.
- Kossen, K., Vaish., Vasant, J., Pasko, C., Wang, H., Jenison, R., McSiggen, J., Polisky, B. y Seiwert, S. (2004) High-throughput ribozymes-based assays for detection of viral nucleic acids. *Chem Biol*. 11: 807-815
- 35 Kuwabara, T., Warashina, M., Nakayama, A., Ohkawa, J. y Taira, K. (1999) tRNAVal-heterodimeric maxizymes with high potential as geneinactivating agents: Simultaneous cleavage at two sites in HTV-1 tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(5): 1886-1891.
- Kuwabara, T., Warashina, M. y Taira, K. (2000) Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity. *TIBTECH*. Nov (18): 462-468.
- Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A. y Ellington, A.D. (2004) Aptamer Database. *Nucl Acids Res*. 32(90001): D95-100.
- 40 Levy, M. y Ellington, A. (2003) Exponential growth by cross-catalytic cleavage of deoxyribozymogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(11): 6416-21.
- Li, J., Zheng, W., Kwon, A.H. y Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucl Acids Res*. 28(2): 481-488.
- Li, Y. y Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation [letter]. *Nat Struct Biol*. 3(9): 743-7.
- 45 Liu, J. y Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Analytical Chemistry*. 76: 1627-1632.

- Lizardi, P., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. y Ward, D. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* Jul;19(3): 225-32.
- Lohse, P.A. y Szostak, J.W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature.* 381(6581): 442-4.
- 5 McCall, M., Hendry, P. y Jennings, P. (1992) Minimal Sequence Requirements for Ribozyme Activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(13): 5710-5714.
- Mirkin, C., Letsinger, R., Mucic, R. y Storhoff, J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 382: 607-609.
- Nagamine, K., Kuzuhara, Y. y Notomi, T. (2002) Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 290(4): 1195-1198.
- 10 Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. y Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res.* Jun 15;28(12): E63.
- Oshima, K., Kawasaki, H., Soda, Y., Tani, K., Asano, S. y Taira, K. (2003) Maxizymes and Small Hairpin-Type RNAs That Are Driven by a tRNA Promoter Specifically Cleave a Chimeric Gene Associated with Leukemia in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 63(20): 6809-6814.
- 15 Paul, N. y Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems. *Current Opinion in Chemical Biology.* 8(6): 634-639.
- Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. y Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. *Biochemistry.* 30(16): 4020-5.
- 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.
- 20 Perriman, R., Delves, A. y Gerlach, W.L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene.* 113(2): 157-63.
- Raap, A., van de Corput, M., Vervenne, R., van Gijlswijk, R., Tanke, H. y Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet.* Apr;4(4): 529-34.
- 25 Raillard, S.A. y Joyce, G.F. (1996) Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozyme. *Biochemistry.* 35(36): 11693-701.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732): 1350-4.
- 30 Santoro, S. y Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 4262-4266.
- Santoro, S.W. y Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochem.* 37(38): 13330-42.
- Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. y Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozymes. *J Mol Biol.* May 28;339(2): 355-63.
- 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.* Jan;11(1): 7-8.
- 40 Tarasow, T.M., Tarasow, S.L. y Eaton, B.E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature.* 389(6648): 54-7.
- Todd, A.V., Fuery, C.J., Impey, H.L., Applegate, T.L. y Haughton, M.A. (2000) DzyNA-PCR: use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format. *Clin Chem.* May;46(5): 625 -630.
- Urdea, M. (1993) Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem.* 39: 725-726.
- 45 Vaish, N., Vasant, J., Kossen, K., Pasko, C., Andrews, L., McSwiggen, J., Polisky, B. y Seiwert, S. (2003) Zeptomole detection of a viral nucleic acid using a target-activate ribozyme. *RNA.* 9: 1058-1072

van Gijlswijk, R., Zijlmans, H., Wiegant, J., Bobrow, M., Erickson, T., Adler, K., Tanke, H. y Raap, A. (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem. Mar*;45(3): 375-82.

5 Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P. (1992) Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucl Acids Res.* 20(7): 1691-6.

Warashina, M., Kuwabara, T., Nakamatsu, Y. y Taira, K. (1999) Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome. *Chem Biol. Apr*;6(6): 237-50.

Yakimovich, O., Alekseev, Y., Maksimenko, A., Voronina, O. y Lunin, V. (2003) Influence of DNA aptamer structure on the specificity of binding to Taq DNA polymerase. *Biochemistry (Moscow).* 68(2): 228-235.

10 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.

Zhang, S., Scharadin, N., Purohit, P. y Chasin, L. (2005) Aptamer-based multiplexed amplified real-time biochemical detector. *Indiana Biosensor Symposium. Poster.*

También se proporcionan las siguientes realizaciones 1 a 146:

15 1. Una composición que comprende al menos dos o más componentes oligonucleotídicos en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje de la MNAzima para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada uno de dichos al menos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico, y una
20 porción del brazo sensor;

en donde después del autoensamblaje, la porción del brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos sensores de la MNAzima, la porción del brazo para el sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos para el sustrato de la MNAzima, y la porción del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como núcleo catalítico de la
25 MNAzima;

y, en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con dicho facilitador del ensamblaje de la MNAzima para mantener el primer y segundo oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones de los núcleos catalíticos para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de modificar al menos un sustrato, y, en donde dichos brazos para el sustrato de dicha MNAzima establece contacto con un
30 sustrato de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede modificar dicho sustrato.

2. La composición de la realización 1, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje o sustrato están compuestos de ADN o un análogo del mismo.

3. La composición de la realización 1 o 2, en donde dicho conjunto de facilitador es una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar.

35 4. La composición de la realización 3, en donde dicha diana es un ácido nucleico.

5. La composición de la realización 4, en donde dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos.

40 6. La composición de la realización 5, en donde dicho ARN ribosomal 16S es ARN ribosomal.

7. La composición de una cualquiera de las realizaciones 4-6, en donde la fuente del ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de las mismas.

8. La composición de una cualquiera de las realizaciones 4-6, en donde dicho ácido nucleico se amplifica.

45 9. La composición de la realización 8, en donde dicha amplificación comprende una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

10. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-9, que comprende adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico que actúa para estabilizar al menos una de dichas porciones del brazo del sustrato o porciones del brazo sensor.
- 5 11. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde al menos uno de dicho conjunto de facilitador, dichos componentes oligonucleotídicos o sustrato o una combinación de los mismos están compuestos de más de una molécula.
- 10 12. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-11, en donde las porciones de núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico se selecciona del grupo que comprende los SEC ID NO 149 a 153, 155 a 157, 159 y 161, y las porciones del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico se seleccionan del grupo que comprende los SEC ID NO 166 -170 y 172.
13. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-12, que comprende adicionalmente al menos un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima.
- 15 14. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-13, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o el facilitador del ensamblaje o el sustrato o una combinación de los mismos comprenden adicionalmente al menos un aptámero o parte del mismo.
15. La composición de la realización 14, en donde dicho aptámero o una porción del mismo está compuesto de al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.
16. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-15, que comprende adicionalmente al menos un inhibidor de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima.
- 20 17. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-16, en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho facilitador del ensamblaje o dicho sustrato comprenden adicionalmente al menos una porción de la secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla.
- 25 18. La composición de la realización 17, en donde dicha estructura en horquilla inhibe el autoensamblaje de dicha MNAzima.
19. La composición de la realización 18, en donde dicha inhibición del autoensamblaje se elimina tras el contacto de un aptámero con una diana.
- 30 20. La composición de una cualquiera de las realizaciones 14-19, en donde dicho aptámero, o parte del mismo, se une a una diana seleccionada del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porciones o combinaciones de los mismos.
21. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-20, en donde dicho sustrato es un ácido nucleico o una proteína.
- 35 22. La composición de la realización 21, en donde dicho ácido nucleico comprende al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptidonucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido péptidonucleico, o cualquier combinación de los mismos.
23. La composición de la realización 21, en donde dicha proteína comprende al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 24. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-23, en donde dicho sustrato comprende adicionalmente al menos una nanopartícula o micropartícula, o combinación de las mismas.
25. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-24, en donde dichos brazos para el sustrato establecen contacto con dicho sustrato a través de emparejamiento de bases complementarias.
- 45 26. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-25, en donde dicho sustrato está unido a un soporte insoluble o libre en disolución.
27. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-26, en donde dicho sustrato comprende una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o se reduce un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.
- 50 28. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-27, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable.

29. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-28, en donde dicha modificación de dicho sustrato se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces de amida, o cualquier combinación de los mismos.
- 5 30. La composición de la realización 27, 28 o 29, en donde dicho efecto detectable se detecta mediante espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, luz ultravioleta visible o espectroscopía infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 10 31. La composición de una cualquiera de las realizaciones 27-30, en donde se mide dicho efecto detectable y, en donde la magnitud de dicha medición es indicativa de la cantidad de una diana.
32. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-31, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, facilitador o dicho conjunto de dicho sustrato se seleccionan del grupo que comprende ADN, ARN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido peptidonucleico, o una combinación de los mismos.
- 15 33. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-32, en donde dicho facilitador del ensamblaje y dicho sustrato son ácidos nucleicos que son completamente o parcialmente complementarios a al menos parte de dichos primero o segundo componentes oligonucleotídicos.
- 20 34. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-34, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador del ensamblaje o dicho sustrato comprenden al menos una sustitución o adición de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5 - (carboxihidroxi)metiluridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometiltiouridina, dihidrouridina, 2'-O-metilseudouridina, beta D-galactosilqueosina, 2'-O-metilguanosina, inosina, N6-isopenteniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilseudouridina, 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, betaD-manosilmetiluridina, 5-metoxicarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metilpurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, éster metílico de ácido uridin-5-oxiacético, ácido uridin-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, betaD-arabinosiluridina, betaD-arabinosiltimidina.
- 25 35. La composición de una cualquiera de las realizaciones 1-34, que comprende adicionalmente al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, en donde cada uno de dichos al menos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos comprenden una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor;
- 30 en donde tras el autoensamblaje de al menos un tercer componente oligonucleotídico y un cuarto componente oligonucleotídico, la porción del brazo sensor de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman los brazos sensores de dicho al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, el brazo de la porción para el sustrato de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman los brazos para el sustrato de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y la porción del núcleo catalítico de dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional;
- 35 y, en donde los brazos sensores de dicha al menos una MNAzima adicional interactúa con dicho al menos un facilitador del ensamblaje adicional para mantener dicho al menos tercer y dicho al menos cuarto componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional, dicho núcleo catalítico capaz de actuar sobre al menos un sustrato adicional, y, en donde los brazos para el sustrato de dicha al menos una MNAzima adicional establecen contacto con al menos un sustrato adicional de manera que el núcleo catalítico de dicha al menos una MNAzima adicional puede actuar en dicho al menos un sustrato adicional.
- 40 36. La composición de la realización 35, en donde cada uno de los sustratos adicionales son el mismo, diferente o una combinación de los mismos.
- 45 37. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende
- 50 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 55

- (b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente el facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de dicha al menos una MNAzima catalíticamente activa, y
 - (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima; y
- 5 (c) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha al menos una MNAzima, en donde la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicho al menos un facilitador del ensamblaje.
38. El método de la realización 37, en donde el autoensamblaje de la MNAzima requiere el contacto del facilitador del ensamblaje con uno o ambos de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos.
39. El método de la realización 37 o 38 que comprende adicionalmente proporcionar al menos un tercer componente oligonucleotídico que entra en contacto con al menos una porción de cualquiera o ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos para autoensamblar la MNAzima.
- 10 40. El método de la realización 39, en donde dicho tercer componente oligonucleotídico está compuesto de más de molécula.
41. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende
- 15 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
 - (b) proporcionar al menos un primer sustrato, susceptible de ser modificado dicho primer sustrato por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
 - 20 (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:
 - (1) el autoensamblaje de dicha al menos primera MNAzima, y
 - 25 (2) la actividad catalítica de dicha al menos primera MNAzima; y
 - (d) detectar dicho efecto detectable.
42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 37-41, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje o sustrato están compuestos de ADN o un análogo del mismo.
43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 37-41, en donde dicho facilitador del ensamblaje es una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar.
- 30 44. El método de la realización 43, en donde dicha diana es un ácido nucleico.
45. El método de la realización 44, en donde dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, microARN, ARNsi, ARNsh, ARNt, ARNm, ARNsno, ARNst, ARNsm, pre- y pri-microARN, otros ARN no codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones o cualquier combinación de los mismos.
- 35 46. El método de la realización 45, en donde dicho ARN ribosomal es ARN ribosomal 16S.
47. El método de una cualquiera de las realizaciones 44-46, en donde la fuente de ácido nucleico se selecciona del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de las mismas.
- 40 48. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-47 que comprende adicionalmente una etapa de amplificación de ácido nucleico.
49. El método de la realización 48, en donde la etapa de amplificación comprende una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).
- 45

50. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-49, en donde al menos uno de dicho facilitador del ensamblaje, dichos primer o segundo componentes oligonucleotídicos o sustrato o combinación de los mismos están compuestos por de más de una molécula.
- 5 51. El método de la realización 48 que comprende adicionalmente detectar dicho efecto detectable durante o después de dicha amplificación.
52. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-51, en donde dicho efecto detectable es indicativo de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje.
53. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-52, en donde dicho efecto detectable se mide cuantitativamente o cualitativamente.
- 10 54. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-53, en donde dicho sustrato es un ácido nucleico o una proteína.
55. El método de la realización 54, en donde dicho ácido nucleico comprende al menos uno de un ácido nucleico marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido peptidonucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido peptidonucleico, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 56. El método de la realización 54, en donde dicha proteína comprende al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glicoproteína, lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos.
57. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-56, en donde dicho sustrato comprende adicionalmente al menos uno de una nanopartícula o una micropartícula o una combinación de las mismas.
- 20 58. El método de una cualquiera de las realizaciones 54-57, en donde dicho sustrato es un ácido nucleico y, en donde dichos brazos para el sustrato establecen contacto con dicho sustrato a través de un emparejamiento de bases complementarias.
59. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-58, en donde el sustrato comprende una porción detectable y una porción extintora, en donde después de la modificación del sustrato por la MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por la porción detectable.
- 25 60. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-59, en donde dicho sustrato se ancla a un soporte insoluble o está libre en disolución.
61. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-60, en donde dicho efecto detectable es detectado mediante espectroscopia de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, espectroscopia de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 30 62. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-61 que comprende adicionalmente amplificar el efecto detectable mediante el uso de una cascada de amplificación de efecto detectable.
63. El método de la realización 62, en donde la cascada de amplificación de efecto detectable comprende una o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada enzimática de ácido nucleico circular, una cascada enzimática de proteína, o una o más enzimas ancladas a un soporte, o cualquier combinación de las mismas.
- 35 64. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-63, en donde dicha modificación de dicho sustrato se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.
- 40 65. El método de una cualquiera de las realizaciones 37-64 que comprende adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, en donde dicho al menos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y
- 45 en donde al menos está presente en la muestra un sustrato adicional, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado solo por la MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.
66. El método de la realización 76, en donde dicho al menos un efecto detectable adicional es detectable independientemente.
- 50 67. El método de la realización 65 o 66, en donde al menos uno de cada sustrato adicional se anclan a un soporte insoluble de manera que solo una de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanece anclada al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.

68. El método de una cualquiera de las realizaciones 65-67, en donde un sustrato adicional se ancla a al menos un soporte insoluble de manera que se produce un efecto detectable cuando el sustrato es modificado por su respectiva MNAzima.

69. Un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

5 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de dicha diana para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima); y, en donde al menos uno de dicho primero y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprenden adicionalmente al menos una porción del aptámero;

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

(1) la unión de dicha diana a dichas porciones del aptámero y

(2) la actividad catalítica de la MNAzima; y

15 (c) determinar la presencia de la actividad catalítica de la MNAzima, en donde la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

70. El método de la realización 69, en donde dicha diana se va a identificar, detectar o cuantificar.

71. Un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

20 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje y dicha al menos una diana para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima); y, en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un facilitador del ensamblaje comprenden adicionalmente al menos un aptámero o porción del mismo y, en donde dicha diana es capaz de unirse a dicho al menos un aptámero o porción del mismo;

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

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

(1) la unión de dicha diana a dicho al menos un aptámero o porción del mismo y

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

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

(d) determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha MNAzima, en donde la presencia de dicha actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

72. El método de la realización 71, en donde dicho aptámero o una porción del mismo está compuesto de al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.

35 73. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-72 que comprende adicionalmente proporcionar un sustrato que puede ser modificado por dicha MNAzima para proporcionar un efecto detectable.

74. El método de la realización 73, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

40 75. El método de la realización 73, en donde dicho sustrato no es modificado por dichos primero o segundo componentes oligonucleotídicos individualmente o por ambos dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos en ausencia de dicho facilitador del ensamblaje y dicha diana.

76. Un método para detectar la presencia de al menos una diana que comprende

45 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos en los que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje y dicha al menos una primera diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

- (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha al menos primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
- 5 (c), en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un primer facilitador del ensamblaje o dicho al menos un primer sustrato comprenden adicionalmente un aptámero y, en donde dicha diana es capaz de unirse a al menos una porción del dicho aptámero, proporcionar al menos un primer inhibidor que es capaz de inhibir dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa en ausencia de dicha diana;
- 10 (d) poner en contacto dicha componentes oligonucleotídicos, dicho conjunto de facilitador, dicho sustrato y dicho inhibidor con una muestra supuestamente contiene dicha diana en condiciones que permitan:
- (1) la unión de dicha diana a dicho aptámero y
 - (2) la eliminación de dicha inhibición de dicho auto ensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa
 - (3) la actividad catalítica de la MNAzima; y
- (e) determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicha diana.
- 15 77. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-76, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos o facilitador del ensamblaje están compuestos de ADN o un análogo del mismo.
78. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-77, en donde dicho aptámero, o parte del mismo, se une a una diana seleccionada del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos,
- 20 moléculas pequeñas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porciones o combinaciones de los mismos.
79. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-78, en donde al menos uno de dichos componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, el sustrato o el inhibidor se unen a un soporte insoluble.
80. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-79, en donde al menos uno de dichos componentes
- 25 oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, el aptámero o la porción del aptámero comprenden adicionalmente dicho inhibidor.
81. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-80, en donde dicho aptámero o una porción del mismo está compuesto de al menos uno de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína o un derivado o combinación de los mismos.
- 30 82. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-81, en donde al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos, facilitador del ensamblaje o sustrato comprenden adicionalmente una porción de la secuencia autocomplementaria capaz de formar una estructura en horquilla.
83. El método de la realización 82, en donde dicha estructura en horquilla inhibe el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa.
- 35 84. El método de la realización 83, en donde dicha inhibición de la auto ensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa se retira tras el contacto de dicho aptámero o porción del aptámero con la diana.
85. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-84, en donde dicho inhibidor es capaz de unirse al menos uno del grupo que comprende dicho aptámero o una porción del mismo.
86. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-85, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que
- 40 comprende ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, ácidos peptidonucleicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido péptidonucleico, o una combinación de los mismos.
87. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-86, en donde dicho sustrato es un ácido nucleico o una proteína.
88. El método de la realización 87, en donde dicho ácido nucleico comprende al menos uno de un ácido nucleico
- 45 marcado, ARN, ADN, análogo de ácido nucleico, ácido péptidonucleico, ácido nucleico bloqueado, quimera de ácido péptidonucleico, o cualquier combinación de los mismos.
89. El método de la realización 87, en donde dicha proteína comprende al menos uno de un anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína, o cualquier combinación de los mismos.
90. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-89, en donde dicho sustrato comprende adicionalmente al
- 50 menos una nanopartícula o micropartícula o combinación de los mismos.

91. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-90, en donde dicho efecto detectable se mide cuantitativamente o cualitativamente.
92. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-91, en donde dicho efecto detectable se detecta mediante espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
93. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-92, en donde dicho sustrato comprende una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.
94. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-93, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.
95. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-94 que comprende adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, en donde dichos al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje adicional y al menos una diana adicional para formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y en donde al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado por el MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona un efecto detectable adicional;
- y, en donde al menos uno de dichos tercero o cuarto componentes oligonucleotídicos o dicho facilitador del ensamblaje adicional o dicho sustrato adicional comprenden adicionalmente al menos un aptámero adicional que se une dicha al menos una diana adicional;
- en donde al menos una molécula inhibidora adicional entra en contacto con una porción de dicho aptámero adicional, inhibiendo de ese modo dicho autoensamblaje de dicha MNAzima adicional catalíticamente activa en ausencia de dicha diana adicional; y
- en donde dicho al menos un facilitador del ensamblaje adicional entra en contacto con al menos una porción de dichos componentes oligonucleotídicos adicionales.
96. El método de la realización 95, en donde dicho al menos un efecto detectable adicional es detectable independientemente.
97. El método de la realización 95 o 96, en donde cada uno de los sustratos adicionales son el mismo, diferente o una combinación de los mismos.
98. El método de una cualquiera de las realizaciones 95-97, en donde al menos uno de cada sustrato adicional se une a un soporte insoluble de manera que solamente uno de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanecen unidos al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.
99. Un método para detectar la presencia de al menos una variante de secuencia de ácido nucleico que comprende
- (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se auto-ensamblan en presencia de una variante de secuencia de un ácido nucleico para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima) ;
- (b) proporcionar al menos un sustrato, dicho sustrato susceptible de ser modificado por dicho primer MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;
- (c) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicha variante de secuencia bajo condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa, y
- (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima y
- (d) determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicha al menos una variante de la secuencia.
100. El método de la realización 99, en donde la variante de la secuencia se selecciona del grupo que comprende polimorfismos de nucleótido único, múltiples polimorfismos de nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones,

translocaciones, variantes de la secuencia del marco de lectura, variantes de secuencia sin sentido, o cualquier combinación de los mismos.

101. El método de la realización 99 o 100, en donde dicha variante de la secuencia está presente en el ADN o el ARN.
- 5 102. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-101, en donde uno o ambos de dicho primer componente oligonucleotídico y dicho segundo componente oligonucleotídico se componen de más de una molécula.
103. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-102, en donde dicha muestra que contiene dicha variante de secuencia se selecciona del grupo que comprende ADN metilado o no metilado modificado con bisulfito, ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito, al menos un amplicón de ADN metilado o no metilado modificado con bisulfito, al menos un amplicón de ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito o una combinación de los mismos.
- 10 104. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-103, en donde el autoensamblaje de la enzima de ácido nucleico de múltiples componentes requiere el contacto de al menos una porción de cualquiera o ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos con el ácido nucleico que comprende dicha variante de secuencia.
- 15 105. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-104, que comprende adicionalmente una etapa de amplificación del ácido nucleico que contiene dicha variante de secuencia.
106. El procedimiento de la realización 105, en donde la etapa de amplificación comprende una o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).
- 20 107. El procedimiento de la realización 105 o 106 que comprende adicionalmente la determinación de la presencia de dicha variante de la secuencia de ácido nucleico durante o después de dicha amplificación.
108. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-107, en donde dicho efecto detectable se detecta mediante espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, espectroscopia de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 25 109. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-108, en donde dicho sustrato comprende una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.
- 30 110. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-109, en donde dicho sustrato está anclado a un soporte insoluble o libre en disolución.
111. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-110, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.
- 35 112. El método de una cualquiera de las realizaciones 99-111 que comprende adicionalmente
- (a) proporcionar al menos un tercer componente oligonucleotídico y al menos un cuarto componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos una variante de la secuencia de ácido nucleico adicional para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa adicional (MNAzima);
- 40 (b) poner en contacto dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente, al menos, una variante de la secuencia de ácido nucleico adicional en presencia de al menos un sustrato adicional susceptible de ser modificado por dicha al menos una MNAzima adicional, en donde dicha modificación de dicha al menos un sustrato adicional proporciona al menos un efecto detectable adicional en condiciones que permiten:
- 45 (1) el autoensamblaje de al menos un MNAzima, y
- (2) la actividad catalítica de al menos un MNAzima; y
- (c) detectar dicho al menos un efecto detectable adicional, detectando así la presencia de dicha al menos una variante de secuencia adicional.
- 50

113. El método de la realización 112, en donde dicho al menos un efecto detectable adicional es detectable independientemente.
114. El método de la realización 112 o 113, en donde cada uno de los sustratos adicionales son el mismo, diferente o una combinación de los mismos.
- 5 115. El método de una cualquiera de las realizaciones 112-114, en donde al menos uno de cada sustrato adicional está anclado a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable y una porción extintora del sustrato adicional permanece anclada al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.
116. Un método para detectar la presencia de una variante de secuencia de un ácido nucleico que comprende
- 10 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico susceptibles de autoensamblaje en presencia de un ácido nucleico para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 15 (b) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que supuestamente contiene el ácido nucleico, en presencia de al menos un primer sustrato modificable por dicha al menos una primera MNAzima, en donde el sustrato comprende una porción detectable capaz de proporcionar al menos un primer efecto detectable tras la modificación del sustrato por dicha al menos una primera MNAzima en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de la MNAzima y
- 20 (2) la actividad catalítica de la MNAzima y
- (c), en donde la ausencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de una variante de secuencia en dicho ácido nucleico.
117. Un método para detectar la presencia de al menos un ácido nucleico metilado que comprende
- 25 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un ácido nucleico metilado para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- 30 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona al menos un primer efecto detectable;
- (c) poner en contacto los dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que supuestamente contiene el ácido nucleico metilado en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de la MNAzima catalíticamente activa, y
- (2) la actividad catalítica de la MNAzima y
- 35 (d) determinar la presencia de dicho al menos un efecto detectable detectando de este modo la presencia de dicho al menos un ácido nucleico metilado.
118. El método de la realización 117, en donde dichas condiciones comprenden adicionalmente, una temperatura que facilita la hibridación de dicha MNAzima con dicho ácido nucleico metilado pero no con dicho ácido nucleico no metilado.
- 40 119. El método de la realización 117 o 118 que comprende adicionalmente amplificar el efecto detectable mediante el uso de una cascada de amplificación del efecto detectable.
120. El método de la realización 119, en donde la cascada de amplificación del efecto detectable comprende una o más de una cascada de ribozima/ligasa, una cascada de enzima de ácido nucleico circular, una cascada de enzima de proteína, o una o más enzimas ancladas a un soporte o cualquier combinación de las mismas.
- 45 121. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-120, en donde la fuente de dicho ácido nucleico metilado se selecciona del grupo que comprende sintética, de mamífero, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, viral, arqueal o cualquier combinación de las mismas.
122. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-121, en donde el ácido nucleico metilado se selecciona del grupo que comprende ARN metilado o ADN metilado.

123. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-122, en donde el autoensamblaje de la enzima de ácido nucleico de múltiples componentes requiere el contacto del ácido nucleico metilado con uno o ambos del primer y segundo componentes oligonucleotídicos.
- 5 124. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-123 que comprende adicionalmente proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos uno de dicho sustrato o dicho primer o segundo componentes oligonucleotídicos, o una combinación de los mismos anclados a éste.
- 10 125. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-124, en donde dicho efecto detectable es detectado mediante espectroscopía de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de masas, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de polarización de fluorescencia, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, espectroscopía de UV, luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.
- 15 126. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-125, en donde dicho sustrato comprende una porción detectable y una porción extintora, en donde tras la modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima, aumenta o disminuye un efecto detectable proporcionado por dicha porción detectable.
- 20 127. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-126, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.
- 25 128. El método de una cualquiera de las realizaciones 117-127 que comprende adicionalmente proporcionar al menos un tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos, en donde dicho al menos tercer y al menos cuarto componentes oligonucleotídicos son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un ácido nucleico metilado adicional a formar al menos una MNAzima catalíticamente activa adicional, y en donde al menos un sustrato adicional está presente en la muestra, dicho sustrato adicional es susceptible de ser modificado por dicha MNAzima adicional, en donde dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.
- 30 129. El método de la realización 128, en donde dicho al menos un efecto detectable adicional es detectable independientemente.
- 35 130. El método de la realización 128 o 129, en donde cada uno de los sustratos adicionales son el mismo, diferente o una combinación de los mismos.
- 40 131. El método de una cualquiera de las realizaciones 128-130, en donde al menos uno de dicho sustrato adicional está anclado a un soporte insoluble de manera que solamente una de una porción detectable adicional y una porción extintora adicional del sustrato adicional permanece anclada al soporte cuando dicho sustrato adicional es modificado por dicha MNAzima adicional.
- 45 132. Un método para la detección de al menos un facilitador del ensamblaje utilizando una cascada de amplificación que comprende
- 50 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos que comprenden al menos un primer componente oligonucleotídico y al menos un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);
- (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un primer sustrato anclado al mismo, dicho primer sustrato es susceptible de ser modificado por dicha MNAzima, en donde dicho primer sustrato comprende al menos una tercera molécula que comprende al menos una primera enzima catalíticamente activa que se libera tras la modificación de dicho primer sustrato por dicha primera MNAzima;
- (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho facilitador del ensamblaje, en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dicho primer sustrato anclado al mismo en condiciones que permiten:
- (1) el autoensamblaje de dicha MNAzima y
- (2) la actividad catalítica de dicha MNAzima y
- (d) proporcionar un soporte insoluble que tiene al menos un segundo sustrato anclado al mismo, dicho segundo sustrato escindible por dicha primera enzima catalíticamente activa, en donde dicho segundo sustrato comprende al menos una cuarta molécula que comprende al menos un radical detectable que es liberado tras la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima; y
- (e), en donde dicha primera enzima catalíticamente activa modifica una pluralidad de dicho segundo sustrato liberando de este modo una pluralidad de radicales detectables

(f) en la que dichos radicales detectables son detectables después de la modificación de dicho segundo sustrato por dicha primera enzima catalíticamente activa, y;

(g) en donde la detección de dichos radicales detectables es indicativa de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje.

5 133. El método de la realización 132, en donde dichos radicales detectables comprenden adicionalmente una segunda enzima catalíticamente activa adicional capaz de modificar dicho primer sustrato liberando de este modo una enzima catalíticamente activa adicional.

10 134. El método de la realización 133, en donde al menos una de dicha primera o dicha segunda enzima catalíticamente activo se selecciona del grupo que comprende MNAzimas, ADNzimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleasas de restricción, exonucleasas, proteasas, proteinasas, hidrolasas, liticasas, peptidasas, dipeptidasas, esterases, caspasas, catepsinas, desulfhidrasas, amidasas, glucosidasas.

135. El método de una cualquiera de las realizaciones 132-134, en donde dicho facilitador del ensamblaje es una diana que se va a identificar, detectar o cuantificar.

15 136. Un método para la detección de una diana utilizando una cascada de amplificación de la señal mediada por MNAzima que comprende

(a) proporcionar un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico que se autoensamblan en presencia de dicha diana para formar una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

20 (b) proporcionar un soporte insoluble que tiene un primer y un segundo sustratos anclados al mismo, dichos primero y segundo sustratos son susceptibles de ser modificados por dicha primera MNAzima, en donde dichos primer y segundo sustratos comprenden al menos un tercer y un cuarto componente oligonucleotídico, respectivamente, capaces de formar una segunda MNAzima catalíticamente activa, en donde dichos tercer y cuarto componentes oligonucleotídicos son liberados en la modificación de dichos primer y segundo sustratos por dicha primera MNAzima;

25 (c) proporcionar dicho soporte insoluble que tiene un tercer y un cuarto sustratos anclados al mismo, dichos tercer y cuarto sustratos son susceptibles de ser modificados por dicha segunda MNAzima, en donde dichos tercer y cuarto sustratos comprenden al menos un quinto y un sexto componentes oligonucleotídicos respectivamente, capaces de formar una tercera MNAzima catalíticamente activa, en donde dicho quinto y dicho sexto componentes oligonucleotídicos son liberados tras la modificación de dichos tercer y cuarto sustratos por dicha segunda MNAzima, y;

30 (d) proporcionar un facilitador del ensamblaje capaz de facilitar el ensamblaje de dicha segunda y dicha tercera MNAzimas, y;

(e) proporcionar un quinto sustrato que es susceptible de ser modificado por dicha segunda MNAzima para proporcionar un efecto detectable;

35 (f) poner en contacto dichos primero y segundo componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicha diana, en presencia de dicho facilitador del ensamblaje, y en presencia de dicho soporte insoluble que tiene dichos primer, segundo, tercer y cuarto sustratos anclados al mismo en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dichas primera, segunda y tercera, MNAzimas y

40 (2) la actividad catalítica de dichas primera, segunda y tercera, MNAzimas; y

(g), en donde dicha tercera MNAzima modifica dichos primer y segundo sustratos proporcionando de ese modo adicionalmente dicha segunda MNAzima, en donde dicha segunda MNAzima modifica adicionalmente al menos uno de dichos tercero, cuarto y quinto sustratos proporcionando de ese modo adicionalmente dicha tercera MNAzima proporcionando adicionalmente de ese modo dicho efecto detectable, y;

45 (h) en la que la detección de dicho efecto detectable es indicativa de la presencia de dicha diana.

137. El método de la realización 136, en donde dicha diana va que se va a identificar, detectar o cuantificar.

138. El método de la realización 136 o 137, en donde dicho quinto sustrato es el mismo que o diferente de uno cualquiera de dichos primer, segundo, tercer o cuarto sustratos.

50 139. El método de una cualquiera de las realizaciones 132-138, en donde dicha diana se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequeñas, polímeros,

iones metálicos, sales metálicas, priones, ácidos nucleicos o cualquier derivado, porción o combinación de los mismos.

5 140. El método de la realización 139, en donde dicho ácido nucleico se selecciona 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 codificantes, ARN ribosomal, derivados de los mismos, amplicones de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

141. El método de una cualquiera de las realizaciones 136-140, en donde cada uno de dichos primer, segundo, tercer o cuarto sustratos está presente en el mismo soporte sólido o diferentes soportes sólidos o cualquier combinación de los mismos.

10 142. El método de una cualquiera de las realizaciones 136-141, en donde dicha modificación de al menos uno de dichos primer, segundo, tercer o cuarto sustratos proporcionan adicionalmente un efecto detectable.

143. Un método para la elaboración de una pluralidad de enzimas de ácido nucleico de múltiples componentes (MNAzimas) que reconocen cada una al menos un facilitador del ensamblaje y modifican un sustrato, comprendiendo el método:

15 (a) proporcionar una pluralidad de facilitadores del ensamblaje que se van a identificar, detectar o cuantificar,

(b) diseñar dos o más componentes oligonucleotídicos en los que al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada uno de los al menos primer y segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor,

20 en donde tras el autoensamblaje, la porción del brazo sensor del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman los brazos sensores de la MNAzima, la porción del brazo para el sustrato del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman los brazos para el sustrato de la MNAzima, y la porción del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos forman un núcleo catalítico de la MNAzima;

25 y, en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con un facilitador del ensamblaje con el fin de mantener el primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de actuar sobre al menos un sustrato, y, en donde los brazos para el sustrato de la MNAzima establecen contacto con un sustrato de manera que el núcleo catalítico de la MNAzima pueda modificar dicho sustrato;

30 (c) alterar dichos dos o más componentes oligonucleotídicos de manera que la porción del brazo para el sustrato y la porción del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos sean constantes, y la porción del brazo sensor de al menos uno del primer y segundo componentes oligonucleotídicos esté adaptada para reconocer a otro de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje, y

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

144. Un kit para detectar la presencia de una pluralidad de dianas que comprende una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas que corresponden cada una a al menos una pluralidad de dianas, y al menos un sustrato.

40 145. Un kit para ensamblar una pluralidad de MNAzimas que comprende una pluralidad de facilitadores del ensamblaje, una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una pluralidad de MNAzimas cada una correspondiente a cada uno de la pluralidad de facilitadores de ensamblaje, y al menos un sustrato.

45 146. Un kit para la detección de una diana que comprende una pluralidad de componentes oligonucleotídicos diseñados para ensamblar una MNAzima correspondiente a la diana, y un sustrato.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Johnson & Johnson Research Pty Limited

<120> Enzimas de ácido nucleico de múltiples componentes y métodos para su uso

5 <130> P050128EP

<140> 06790343.5

<141> 07-10-2008

10 <160> 172

<170> PatentIn version 3.2

15 <210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligo Sintético

<400> 1

25 gctggtcatc cagcagcgtc gaaatagtga gt 32

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligo Sintético

35 <400> 2

gctggtcatc cagcagcgtt cgaaatagtg agt 33

<210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

45 <223> Oligo Sintético

<400> 3

50 catctcttct ccgtcgaagt gttcgacaat ggc 33

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Oligo Sintético

<400> 4

60 catctcttct ccggtgttcg acaatggc 28

<210> 5

<211> 31

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5 <400> 5
 catctctct ccgagcgtgt tcgacaatgg c 31
 10 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (10)...(10)
 <223> ARN
 <400> 6
 25 actcactata ggaagagatg 20
 <210> 7
 <211> 32
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 35 <400> 7
 gctggtcatc cagcaccggtc taaatagtga gt 32
 40 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 8
 50 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31
 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 60 <400> 9
 cgaccattag gtcgtccaca agctgttacc g 31
 <210> 10
 65 <211> 28
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5 <400> 10
 tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt 28
 10 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 11
 20 catctcttct ccgagctaag cacttta 27
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 30 <400> 12
 taaagtgcct atagtcagg ta 22
 <210> 13
 35 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Oligo Sintético
 <400> 13
 caaagtgcct acagtcagg tagt 24
 45 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 14
 55 aaagtgcctg tcgtgcagg ag 22
 <210> 15
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 65 <400> 15

ES 2 431 076 T3

	aaaagtgctt acagtcgagg tagc	24
5	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Oligo Sintético	
	<400> 16	
15	taaagtgctg acagtcgaga t	21
20	<210> 17 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Oligo Sintético	
	<400> 17	
30	caaacgagtc ctggccttgt cgcacaacg agaggaaacc tt	42
35	<210> 18 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligo Sintético	
	<400> 18	
40	tgcccaggga ggctagctgc ggtggagacg gattacacct tc	42
45	<210> 19 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligo Sintético	
	<400> 19	
50	caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt	40
55	<210> 20 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligo Sintético	
60	<400> 20	
65	tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc	39
	<210> 21 <211> 22 <212> ADN	

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)...(13)
 <223> ARN
 10
 <400> 21
 aaggttcct cguccctggg ca 22
 15
 <210> 22
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 22
 25
 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43
 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 35
 <400> 23
 caagactgga gacaaagtg 19
 40
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45
 <223> Oligo Sintético
 <400> 24
 gcagagtttc ctctgtgata 20
 50
 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 25
 60
 acgtgacgct aaagtgct 18
 <210> 26
 <211> 22
 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 431 076 T3

<220>
 <223> Oligo Sintético
 5 <400> 26
 cgfccgaatg acgtacctgc ac 22
 <210> 27
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo Sintético
 <400> 27
 cgaatgacgt acctgcac 18
 20 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 28
 30 uaaagugcuu auagucagg ua 22
 <210> 29
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (39)...(39)
 <223> Fosforilación
 45 <400> 29
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag gttgtgctg 3 9
 50 <210> 30
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 60 <222> (39)...(39)
 <223> Fosforilación
 <400> 30
 65 cggttggtga ggctagctgt ggagacggat tacacctc 39

ES 2 431 076 T3

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <220>
 10 <221> característica_misc
 <222> (11)...(12)
 <223> ARN

 <400> 31
 15 cagcacaacc guaccaacc g 21

 <210> 32
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 25
 <400> 32

 cattctatca tcaacgggta 20

 <210> 33
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 35
 <400> 33

 40 caaaggcaga tggatcag 18

 <210> 34
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 50
 <400> 34

 tacctgact aacaacgaga ggaacctt 29

 <210> 35
 <211> 28
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 60
 <400> 35

 tgcccaggga ggctagctaa gcacttta 28
 65
 <210> 36

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (11)...(12)
 <223> ARN

<400> 36

15 cagcacaacc guccaacc g 21

<210> 37
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)...(33)
 <223> Fosforilación

30 <400> 37

gaccgtgagg tagtaacaac gagaggaaac ctt 33

<210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)...(33)
 45 <223> Fosforilación

<400> 38

tgcccagga ggctagctgg ttgtatagtt gtc 33

50 <210> 39
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligo Sintético

<400> 39

60 ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 40
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 431 076 T3

<220>
 <223> Oligo Sintético
 5 <400> 40
 agcgaagctg agacaactat acaa 24
 <210> 41
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo Sintético
 <400> 41
 cgacgtgacc gtgaggtag 19
 20 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 42
 30 catggcaca gccaagctga 20
 <210> 43
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)...(33)
 <223> Fosforilación
 45 <400> 43
 gccccgcct ccaactacaa cgaggtgtg ctg 33
 50 <210> 44
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 60 <222> (31)...(31)
 <223> Fosforilación
 <400> 44
 65 cggttggtga ggctagcaac gcccgacct c 31

ES 2 431 076 T3

<210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 45
 10 gttggttacg gtcgcggttc 20
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 20
 <400> 46
 ccgaccgtaa ctattcgata cg 22
 25 <210> 47
 <400> 47
 000
 30 <210> 48
 <400> 48
 35 000
 <210> 49
 <400> 49
 40 000
 <210> 50
 45 <400> 50
 000
 <210> 51
 50 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 60 <223> Fosforilación
 <400> 51
 agatcaagat cattgctcca caacgagagg aacctt 37
 65 <210> 52

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (36)...(36)
 <223> Fosforilación

<400> 52

15 tgcccagga ggctagcttc ctgagcgcaa gtactc 36

<210> 53

<400> 53

20 000

<210> 54

25 <400> 54

000

<210> 55
 30 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)...(38)
 <223> Fosforilación

40 <400> 55

agttcaaatc tgtactgcac cacaacgaga ggcgtgat 38

45 <210> 56
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 55 <222> (38)...(38)
 <223> Fosforilación

<400> 56

60 ctgggaggaa ggctagctct ggaggtggat tcctttgg 38

<210> 57
 <211> 42
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 5 <221> característica_misc
 <222> (42)...(42)
 <223> Fosforilación

<400> 57
 10 actgaataga aatagtgata gatacaacga gtgccatggt aa 42

<210> 58
 <211> 41
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético
 20

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)...(41)
 <223> Fosforilación
 25

<400> 58
 tatcacagcc aaggctagct ccattcctat gactgtagat t 41

<210> 59
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

<220>
 <223> Oligo Sintético
 35

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)...(13)
 <223> ARN
 40

<400> 59
 45 aaggtttct cguccctggg ca 22

<210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (11)...(12)
 <223> ARN
 55

<400> 60
 60 cagcacaacc guaccaacc g 21

<210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (11)...(12)
 <223> ARN
 10
 <400> 61
 atcacgcctc gutcctcca g 21
 15
 <210> 62
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 25
 <222> (13)...(14)
 <223> ARN
 <400> 62
 30 ttaacatggc acgutggctg tgata 25
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 40 <400> 63
 cattgccgac aggatgcaga 20
 <210> 64
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Oligo Sintético
 <400> 64
 gagccgccga tccacacg 18
 55
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 65
 65 cactcagcca ctggatttaa 20

<210> 66
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

 10 <400> 66

 gcgcgctctt gctttattc 19

 <210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Oligo Sintético

 <400> 67

 ctttgctgac ctgctggatt a 21
 25
 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <400> 68
 35 cctgttgact ggtcattaca a 21

 <210> 69
 <211> 38
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 45
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)...(38)
 <223> Fosforilación
 50
 <400> 69

 agatcaagat cattgctcca caacgagtgcc catgttaa 38
 55
 <210> 70
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligo Sintético

 <220>
 <221> característica_misc
 65 <222> (38)...(38)
 <223> Fosforilación

<400> 70

5 tatcacagcc aaggctagct tcctgagcgc aagtactc 38

<210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligo Sintético

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (39)...(39)
 <223> Fosforilación

20 <400> 71

20 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag tgcgccatg 39

<210> 72
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligo Sintético

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)...(41)
 <223> Fosforilación

35 <400> 72

tacttctccc aaggctagct gtggagacgg attacacctt c 41

40 <210> 73

<400> 73

45 000

<210> 74

<400> 74

50 000

<210> 75
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligo Sintético

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)...(41)
 <223> Fosforilación

65 <400> 75

	actgaataga aatagtgata gatacaacga gaggaaacct t	41
	<210> 76	
	<211> 39	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Oligo Sintético	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (39)...(39)	
15	<223> Fosforilación	
	<400> 76	
	tgcccagga ggctagctcc attcctatga ctgtagatt	39
20	<210> 77	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
	<220>	
	<221> característica_misc	
30	<222> (33)...(33)	
	<223> Fosforilación	
	<400> 77	
35	gctggtcatc cagcagacaa cgaggttggtg ctg	33
	<210> 78	
	<211> 33	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
45	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (33)...(33)	
	<223> Fosforilación	
50	<400> 78	
	cggttggtga ggctagctgt gtcgacaat ggc	33
	<210> 79	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Oligo Sintético	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (12)...(13)	
65	<223> RNA	

<400> 79
 aaggttcct cguccctggg ca 22
 5 <210> 80
 <400> 80
 000
 10 <210> 81
 <400> 81
 15 000
 <210> 82
 <400> 82
 20 000
 <210> 83
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (11)...(12)
 <223> RNA
 35 <400> 83
 catggcgac gutgggagaa gta 23
 40 <210> 84
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 84
 50 caagactgga gacaaagt 19
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 60 <400> 85
 gcagagtttc ctctgtgata 20
 <210> 86
 65 <211> 37
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación
 10
 <400> 86
 ggtgtcgtc agctcgtgta caacgagagg aaacctt 37
 15
 <210> 87
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 <221> característica_misc
 25
 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación
 <400> 87
 30
 tgcccagga ggctagctcg tgagatgttg ggtaag 37
 <210> 88
 <211> 18
 <212> ADN
 35
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 40
 <400> 88
 tggatgatgg ttgtcgtc 18
 <210> 89
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50
 <223> Oligo Sintético
 <400> 89
 55
 ttgcgctcgt tgcggga 17
 <210> 90
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 65
 <221> característica_misc
 <222> (38)...(38)

<223> Fosforilación
 <400> 90

5 gaagaggcca ataaaggaga gacaacgaga ggcgtgat 38
 <210> 91
 <211> 37
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación

20 <400> 91
 ctgggaggaa ggctagctaa caccagctg ttacacc 37
 <210> 92
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Oligo Sintético
 <400> 92

35 cagggtcatc cattccatgc ag 22
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 93

45 gctagtacca gttgagccag 20
 <210> 94
 <211> 37
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 55 <400> 94
 ggctgtgca tccagcagta caacgagagg aaacct 37

60 <210> 95
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Oligo Sintético

ES 2 431 076 T3

	<400> 95	
5	gggctggtca tccagcagta caacaagagg aacctt	37
	<210> 96	
	<211> 37	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
	<400> 96	
15	gggctggtca tccagcagtt caacgagagg aacctt	37
	<210> 97	
	<211> 37	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
25	<400> 97	
	gggctggtca tccagcagta catcgagagg aacctt	37
30	<210> 98	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
	<400> 98	
40	gggctggtca tccagcagta ctacgagagg aacctt	37
	<210> 99	
	<211> 36	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
50	<400> 99	
	tgcccagggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca	36
	<210> 100	
55	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Oligo Sintético	
	<400> 100	
	tgcccagggga ggctagagtg ttcgacaatg gcagca	36
65	<210> 101	

ES 2 431 076 T3

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 101

10 tgcccaggga ggccagcgtg ttcgacaatg gcagca 36
 <210> 102
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético

20 <400> 102
 atgctgccat tgtcgaacac ctgctggatg accagcccaa 40
 <210> 103
 25 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Oligo Sintético
 <400> 103
 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtgta gtacctgggg gagtattgcg gaggaaggt 59
 35 <210> 104
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 104

45 catctctct ccgagcgtct gtaccgtgta c 31
 <210> 105
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético

55 <400> 105
 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacgtt 30
 60 <210> 106
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Oligo Sintético

<400> 106

5 ccaggta^cactatt 17

<210> 107
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligo Sintético

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (41)...(41)
 <223> Fosforilación

20 <400> 107

caaacgagtc ctggccttgt ctacaacga gaggaaacct t 41

<210> 108
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligo Sintético

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (28)...(28)
 <223> Fosforilación

35 <400> 108

tgcccag^gga ggctagcgtg gagacgga 28

40 <210> 109
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligo Sintético

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (28)...(28)
 <223> Fosforilación

<400> 109

55 tgcccag^gga ggctagcgtc gagacgga 28

<210> 110
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligo Sintético

65 <400> 110

	agcagccaca aaggcaga	18
	<210> 111	
5	<400> 111	
	000	
	<210> 112	
10	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligo Sintético	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (34)...(34)	
20	<223> Fosforilación	
	<400> 112	
25	tgcccagga ggctagctgt ggagacggat taca	34
	<210> 113	
	<400> 113	
30	000	
	<210> 114	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo Sintético	
40	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (33)...(33)	
	<223> Fosforilación	
45	<400> 114	
	tgcccagga ggctagcgtg gagacggatt aca	33
	<210> 115	
50	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Oligo Sintético	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (37)...(37)	
60	<223> Fosforilación	
	<400> 115	
65	caaacgagtc ctggcctgt ctacgagagg aaacctt	37
	<210> 116	

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación

<400> 116

15 tgcccagga ggctagctac agtgagacg gattaca 37

<210> 117
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (39)...(39)
 <223> Fosforilación

30 <400> 117

caaacgagtc ctggcctgt ctcaacgaga ggaaacct 39

<210> 118
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (35)...(35)
 45 <223> Fosforilación

<400> 118

tgcccagga ggctagctag tggagacgga ttaca 35

50 <210> 119
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 60 <222> (42)...(42)
 <223> Fosforilación

<400> 119

65 caaacgagtc ctggcctgt ctctacaacg agaggaaacc tt 42

<210> 120
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (32)...(32)
 <223> Fosforilación

 15 <400> 120

 tgcccagga ggctaggtg agacggatta ca 32

 <210> 121
 20 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Oligo Sintético

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (43)...(43)
 30 <223> Fosforilación

 <400> 121

 caaacgagtc ctggcctgt ctgctacaac gagaggaaac ctt 43
 35
 <210> 122
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <220>
 45 <221> característica_misc
 <222> (31)...(31)
 <223> Fosforilación

 <400> 122
 50
 tgcccagga ggctagtga gacggattac a 31

 <210> 123
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético
 60
 <400> 123

 gctacccaac tgtgcatc 19

 65 <210> 124
 <211> 78

ES 2 431 076 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligo Sintético

 <400> 124

aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtgcggtcgg ctcggggcat tcttagcggt 60
ttgccccgag cgcaccgc 78

 10
 <210> 125
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15
 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <400> 125

 20
 tgccccgagc cgaccgaact cactatt 28

 <210> 126
 <211> 38
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

 30
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)...(38)
 <223> Fosforilación

 35
 <400> 126

 actggatgct catctgtctg acaacgagag gaaacctt 38

 40
 <210> 127
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45
 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <220>
 <221> característica_misc
 50 <222> (23)...(23)
 <223> Fosforilación

 <400> 127

 55 tgcccagga ggctagctta tac 23

 <210> 128
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (15)...(15)
 <223> Fosforilación
 5 <400> 128
 cttcgtgagg gtgag 15
 10 <210> 129
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 129
 20 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52
 <210> 130
 <211> 52
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 30 <400> 130
 tgccccctca ccctcacgaa ggcatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52
 <210> 131
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligo Sintético
 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación
 45 <400> 131
 gggctgtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37
 50 <210> 132
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligo Sintético
 60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (36)...(36)
 <223> Fosforilación
 <400> 132
 65 tgcccagga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 133
 <211> 37
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligo Sintético

 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25)...(25)
 <223> ARN

 15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 <223> Fosforilación

 20 <400> 133

 gggctgtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

 <210> 134
 25 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligo Sintético

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)...(20)
 35 <223> ARN

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (37)...(37)
 40 <223> Fosforilación

 <400> 134

 gggctgtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

 45 <210> 135
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligo Sintético

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19)...(26)
 <223> RNA

 <400> 135
 60 gggctgtca tccagcagua caacgagagg aaacctt 37

 <210> 136
 <211> 36
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (11)...(17)
 <223> RNA

10 <400> 136
 tgcccagga ggcuagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 137
 15 <400> 137
 000

20 <210> 138
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligo Sintético

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (1)...(1)
 <223> Biotinilado

<220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (18)...(19)
 <223> ARN

<400> 138

40 aaaaaaagg ttcctcguc cctgggcagc tggcatcca gcagacaacg aggttgct g 61

<210> 139
 <211> 61
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (45)...(46)
 <223> RNA

55 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (61)...(61)
 <223> Biotinilado

60 <400> 139
 cggttgtga ggctagctgt gtcgacaat ggcaaggttt cctcgucct gggcaaaaaa a 61

<210> 140
 65 <211> 31
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (31)...(31)
 <223> Biotinilado
 10
 <400> 140
 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31
 15
 <210> 141
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 141
 25
 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43
 <210> 142
 <211> 28
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 35
 <400> 142
 tgagctacag tcggtcgaaa tagtgagt 28
 40
 <210> 143
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45
 <223> Oligo Sintético
 <400> 143
 50
 catctcttct ccgagcgctt catctca 27
 <210> 144
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <400> 144
 60
 ggcaactaacg tgccctgagct acagtcggtc gaaatagta gt 42
 <210> 145
 <211> 41
 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligo Sintético
 5 <400> 145
 catctctct ccgagcgctt catctcacga cgataacg41tc g 41
 <210> 146
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligo Sintético
 <400> 146
 tgagatgaag cactgtagct ca 22
 20 <210> 147
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligo Sintético
 <220>
 30 <221> característica_misc
 <222> (40)...(40)
 <223> Fosforilación
 <400> 147
 35 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40
 <210> 148
 <211> 39
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligo Sintético
 45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (39)...(39)
 <223> Fosforilación
 50 <400> 148
 tgcccagga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39
 55 <210> 149
 <400> 149
 000
 60 <210> 150
 <400> 150
 65 000

ES 2 431 076 T3

<210> 151
<400> 151
5 000
<210> 152
<400> 152
10 000
<210> 153
<400> 153
15 000
<210> 154
<400> 154
20 000
<210> 155
<400> 155
25 000
<210> 156
<400> 156
30 000
<210> 157
<400> 157
35 000
<210> 158
<400> 158
40 000
<210> 159
<400> 159
45 000
<210> 160
<400> 160
50 000
<210> 161
<400> 161
55 000
60
65 000

ES 2 431 076 T3

<210> 162
<400> 162
5 000
<210> 163
<400> 163
10 000
<210> 164
<400> 164
15 000
<210> 165
<400> 165
20 000
<210> 166
<400> 166
25 000
<210> 167
<400> 167
30 000
<210> 168
<400> 168
35 000
<210> 169
<400> 169
40 000
<210> 170
<400> 170
45 000
<210> 171
<400> 171
50 000
<210> 172
<400> 172
55 000
<210> 173
<400> 173
60 000
<210> 174
<400> 174
65 000

REIVINDICACIONES

1. Un kit para la detección de una diana, comprendiendo dicho kit al menos dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de la diana para formar una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), en donde cada uno de dicho al menos primer y dicho segundo componentes oligonucleotídicos comprenden una porción del brazo para el sustrato, una porción del núcleo catalítico y una porción del brazo sensor;
- 5
- en donde tras el autoensamblaje, la porción del brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos sensores de la MNAzima, la porción del brazo para el sustrato del primero y segundo componentes oligonucleotídicos actúan como brazos para el sustrato de la MNAzima, y la porción del núcleo catalítico del primer y segundo componentes oligonucleotídicos actúa como núcleo catalítico de la MNAzima;
- 10
- y, en donde los brazos sensores de la MNAzima interactúan con dicha diana con el fin de mantener el primer y segundo componentes oligonucleotídicos en proximidad para la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar el núcleo catalítico de la MNAzima, dicho núcleo catalítico capaz de modificar al menos un sustrato, y, en donde dichos brazos para el sustrato de dicha MNAzima establecen contacto con un sustrato de manera que dicho núcleo catalítico de dicha MNAzima puede modificar dicho sustrato.
- 15
2. El kit de la reivindicación 1, en donde la diana es una molécula de ácido nucleico.
3. El kit de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la porción del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los SEC ID NO: 149-153, 155-157, 159 y 161 y la porción del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los SEQ ID NO: 166-170 y 172.
- 20
4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico comprende la secuencia mostrada en el SEC ID NO: 150 y la porción del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico comprende la secuencia expuesta en el SEC ID NO: 166.
- 25
5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico comprende la secuencia mostrada en el SEC ID NO: 151 y la porción del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico comprende la secuencia mostrada en el SEC ID NO: 167.
6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción del núcleo catalítico del primer componente oligonucleotídico comprende la secuencia mostrada en el SEC ID NO: 152 y la porción del núcleo catalítico del segundo componente oligonucleotídico comprende la secuencia mostrada en el SEC ID NO: 168.
- 30
7. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente un sustrato.
8. El kit de la reivindicación 7, en donde el sustrato es un sustrato informador.
9. El kit de la reivindicación 8, en donde el sustrato informador comprende una marca.
- 35
10. El kit de la reivindicación 9, en donde la marca es un fluoróforo.
11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el sustrato informador comprende adicionalmente un extintor.
12. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde los dos o más componentes oligonucleotídicos están en un primer recipiente y el sustrato se encuentra en un segundo recipiente.
- 40
13. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente al menos un inhibidor del autoensamblaje de la MNAzima.
14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende adicionalmente cebadores para amplificar al menos una diana.
15. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende adicionalmente instrucciones de uso.
- 45
16. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende:
- (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

(b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

5 (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dicha al menos un primera MNAzima y

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

(d) detectar dicho efecto detectable;

10 en donde dicho facilitador del ensamblaje es una diana de ácido nucleico que se va a identificar, detectar o cuantificar y el método comprende adicionalmente una etapa de amplificación del ácido nucleico, comprendiendo la etapa de amplificación uno o más de: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

15 17. El método de la reivindicación 16, que comprende adicionalmente detectar dicho efecto detectable durante o después de dicha amplificación.

18. El método de la reivindicación 16 o 17, en donde dicha modificación de dicho sustrato se selecciona del grupo que comprende escisión, ligación, metalación de porfirina, formación de enlaces carbono-carbono, enlaces éster o enlaces amida.

19. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende:

25 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

(b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

30 (c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dicha al menos primera MNAzima y

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

(d) detectar dicho efecto detectable;

en donde

35 dicho facilitador del ensamblaje es una diana;

dichos al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico de (a) son susceptibles de autoensamblaje en presencia de un facilitador del ensamblaje y dicha una diana para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

40 al menos uno de dicho primer o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o facilitador del ensamblaje o dicho al menos un primer sustrato comprenden adicionalmente un aptámero y, en donde dicha diana es capaz de unirse al menos a una porción del dicho aptámero, proporcionando al menos un primer inhibidor que es capaz de inhibir de dicho autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa en ausencia de dicha diana;

dicha puesta en contacto de (c) comprende poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos, dicho facilitador del ensamblaje, dicho sustrato, y dicho inhibidor con una muestra que contiene supuestamente dicha diana en condiciones que permiten:

45 (1) la unión de dicha diana a dicho aptámero y

(2) la eliminación de dicha inhibición de dicho auto ensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa

(3) la actividad catalítica de la MNAzima; y

dicha detección de (d) comprende determinar la presencia de dicho efecto detectable detectando de ese modo la presencia de dicha diana.

20. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende:

5 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleotídicos, en donde al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico se autoensamblan en presencia de al menos un primer facilitador del ensamblaje para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima);

10 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

(c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:

(1) el autoensamblaje de dicho al menos primera MNAzima y

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

15 (d) detectar dicho efecto detectable;

en donde

al menos un facilitador del ensamblaje es una variante de la secuencia de ácido nucleico;

20 dichos al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico de (a) se autoensamblan en presencia de dicha variante de secuencia de un ácido nucleico para formar al menos una primera enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima); y

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

(1) el autoensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa, y

(2) la actividad catalítica de dicha MNAzima y

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

30 21. El método de la reivindicación 20, en donde la variante de la secuencia se selecciona del grupo que comprende polimorfismos de un solo nucleótido, polimorfismos de múltiples nucleótidos, inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, variantes de secuencia por desplazamiento del marco, variantes de secuencia sin sentido, o cualquier combinación de los mismos.

22. El método de la reivindicación 20 o 21, en donde dicha muestra que contiene dicha variante de secuencia se selecciona entre ADN metilado o no metilado modificado con bisulfito, ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito, al menos un amplicón de ADN metilado o no metilado modificado con bisulfito, al menos un amplicón de ARN metilado o no metilado modificado con bisulfito o una combinación de los mismos.

35 23. Un método para detectar la presencia de al menos un facilitador del ensamblaje que comprende:

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

40 (b) proporcionar al menos un primer sustrato, dicho primer sustrato susceptible de ser modificado por dicha primera MNAzima, en donde dicha modificación de dicho sustrato por dicha MNAzima proporciona un efecto detectable;

(c) poner en contacto dichos dos o más componentes oligonucleotídicos con una muestra que contiene supuestamente dicho al menos primer facilitador del ensamblaje en condiciones que permiten:

45 (1) el autoensamblaje de dicha al menos primera MNAzima y

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

(d) detectar dicho efecto detectable; en donde

dicho facilitador del ensamblaje es una diana;

- 5 dichos al menos un primer componente oligonucleotídico y un segundo componente oligonucleotídico de (a) son susceptibles de autoensamblaje en presencia de al menos un facilitador del ensamblaje y dicha diana para formar al menos una enzima de ácido nucleico de múltiples componentes catalíticamente activa (MNAzima), y al menos uno de dicho primero o dicho segundo componentes oligonucleotídicos o dicho al menos un facilitador del ensamblaje comprenden adicionalmente al menos un aptámero o una porción del mismo, en donde dicha diana es capaz de unirse a dicho al menos un aptámero o porción del mismo;

dicho suministro de (b) comprende adicionalmente proporcionar al menos un inhibidor del autoensamblaje de dicha MNAzima;

- 10 dicha puesta en contacto de (c) comprende poner en contacto dichos componentes oligonucleotídicos, dicho al menos un facilitador del ensamblaje y dicho inhibidor con una muestra que supuestamente contiene dicha al menos una diana en condiciones que permiten:

(1) la unión de dicha diana a dicho al menos un aptámero o porción del mismo;

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

- 15 (3) la eliminación de dicha inhibición de dicho auto ensamblaje de dicha MNAzima catalíticamente activa, y

dicha detección de (d) comprende determinar la presencia de la actividad catalítica de dicha MNAzima, en donde la presencia de dicha actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en donde al menos uno de los componentes oligonucleotídicos, el facilitador del ensamblaje, el sustrato o el inhibidor están anclados a un soporte insoluble.

Figura 1

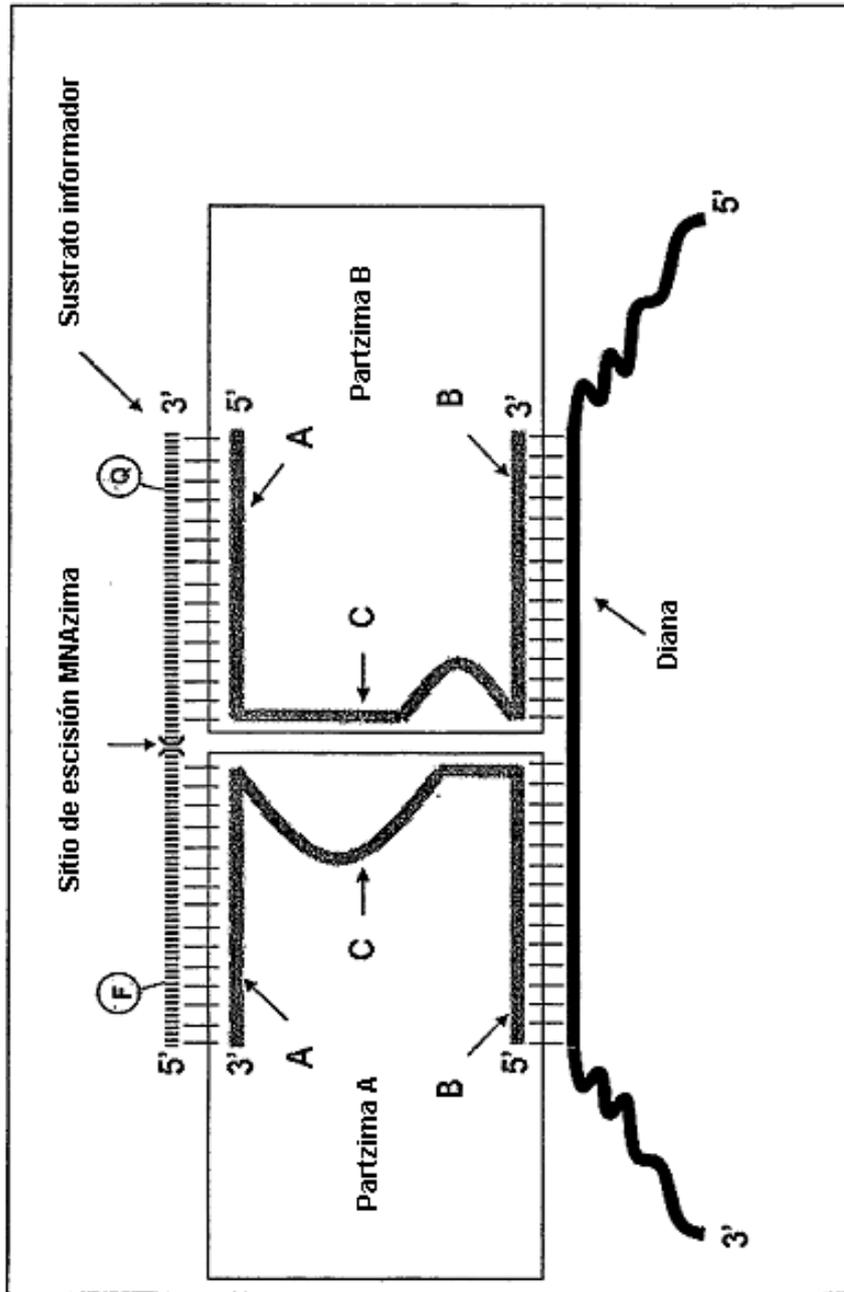


Figura 2

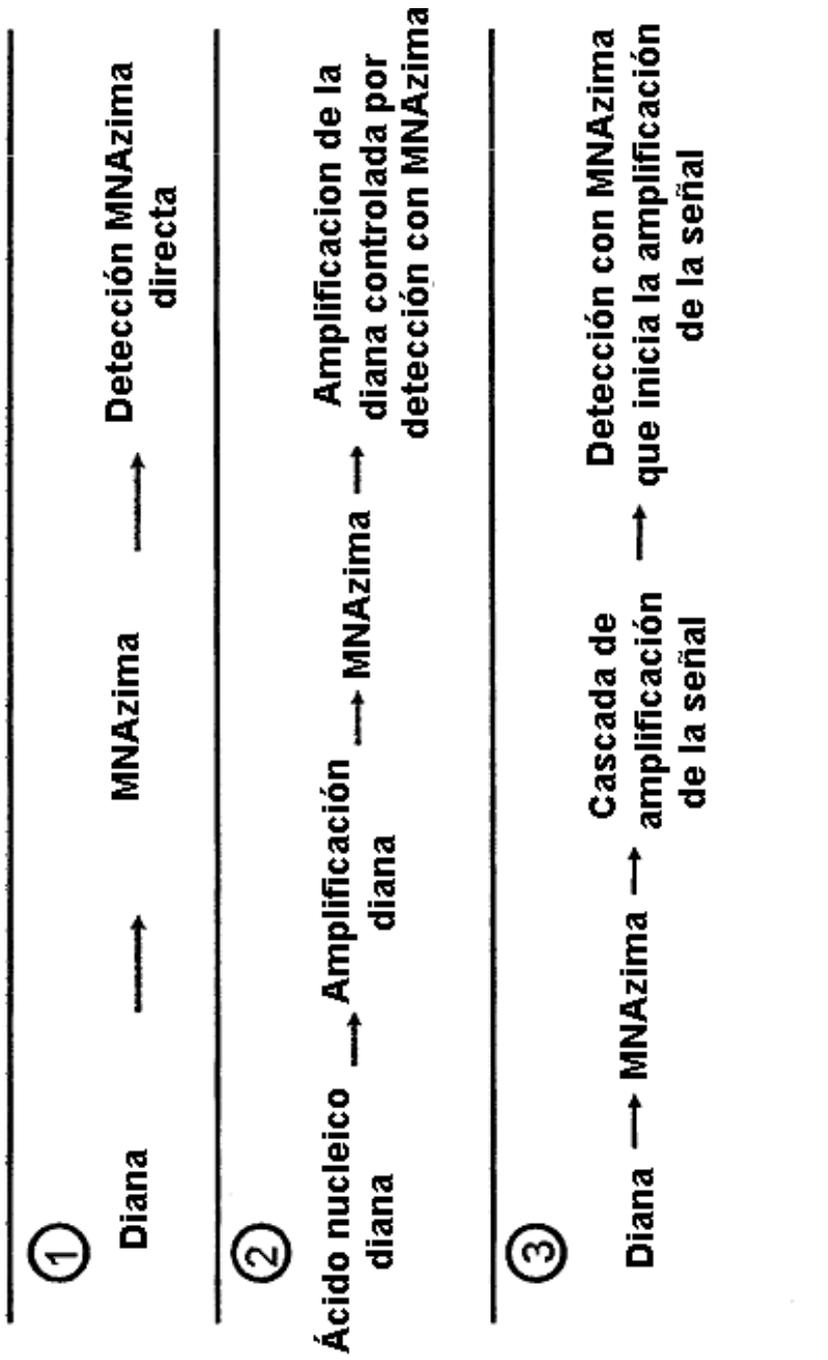


Figura 3

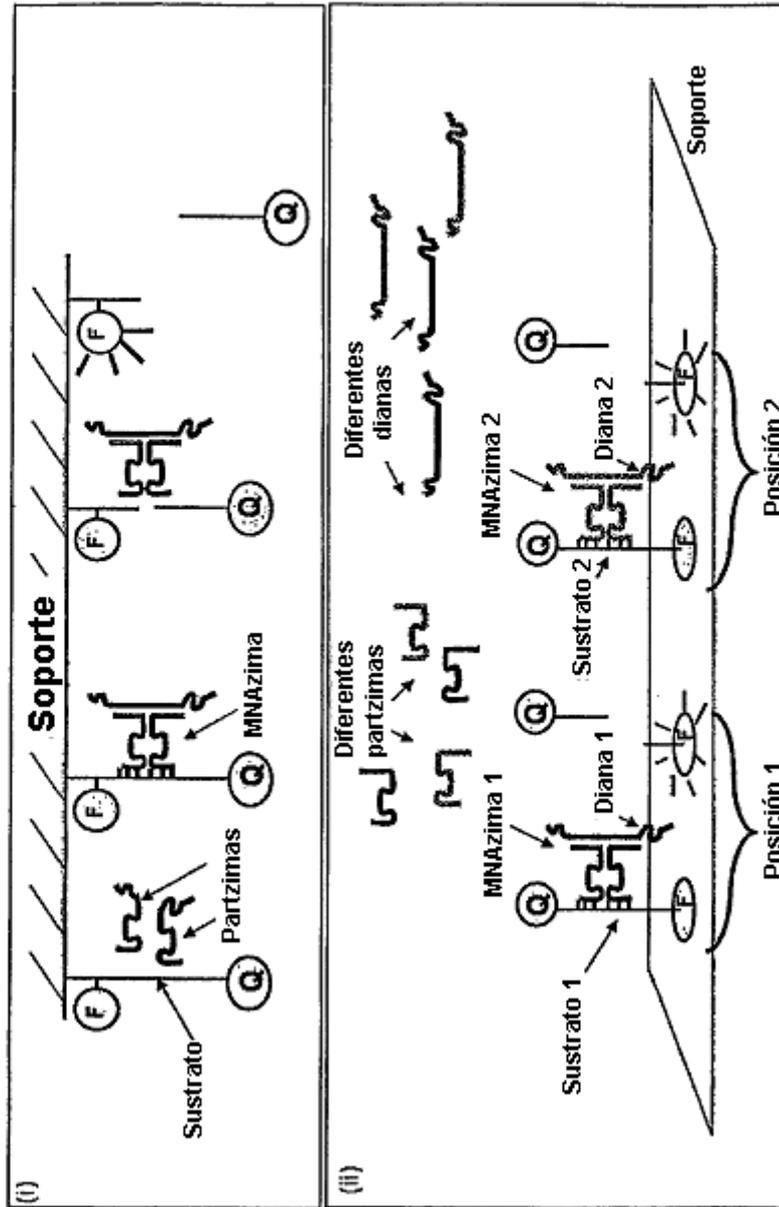


Figura 4

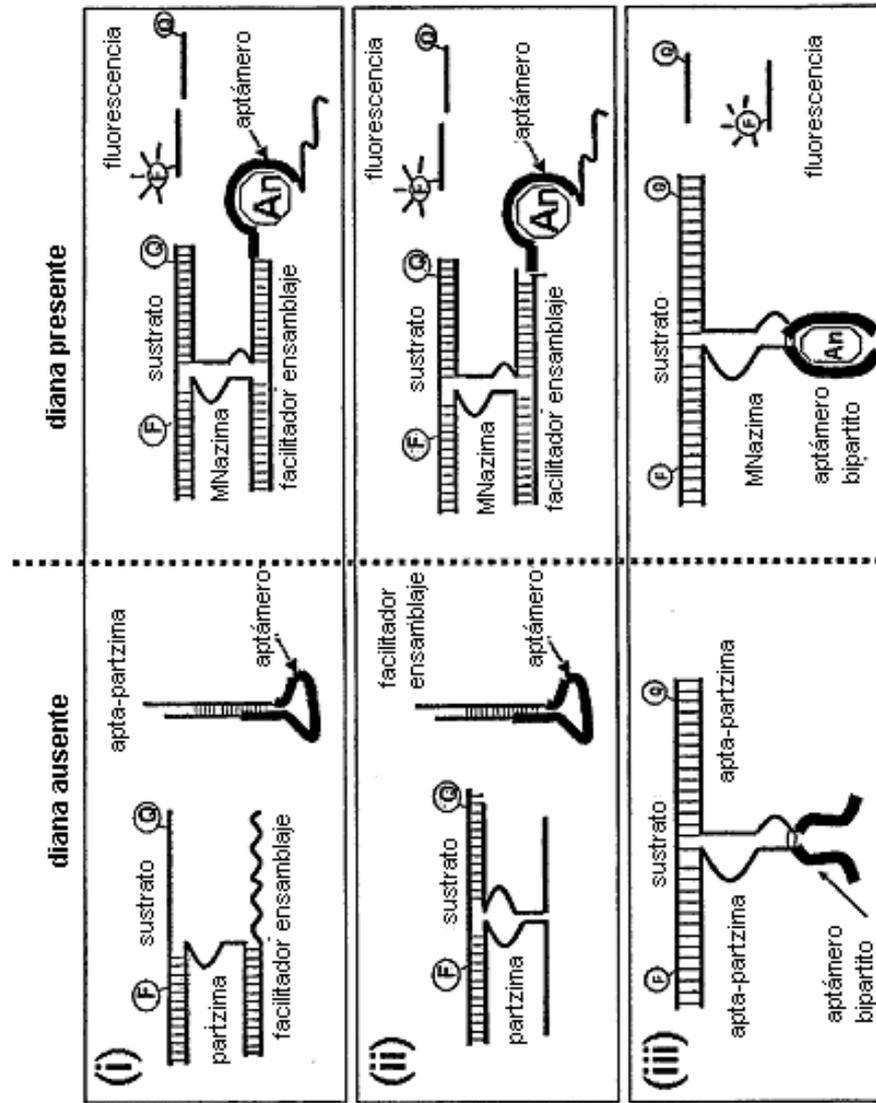


Figura 5

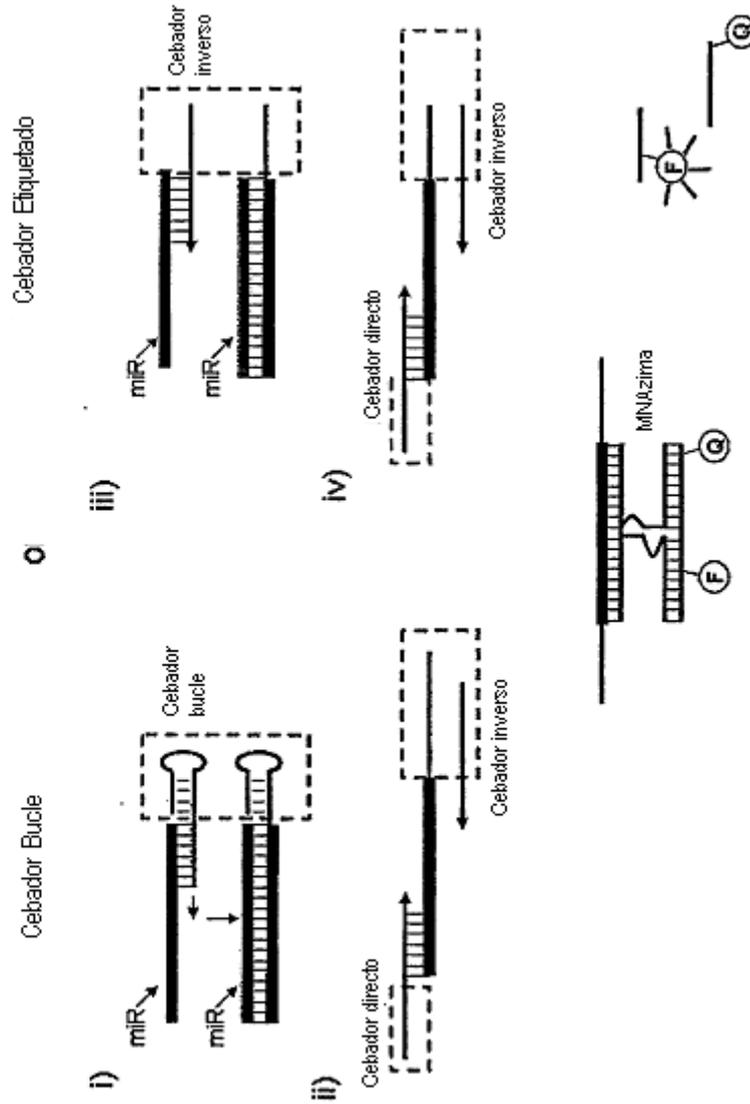


Figura 6

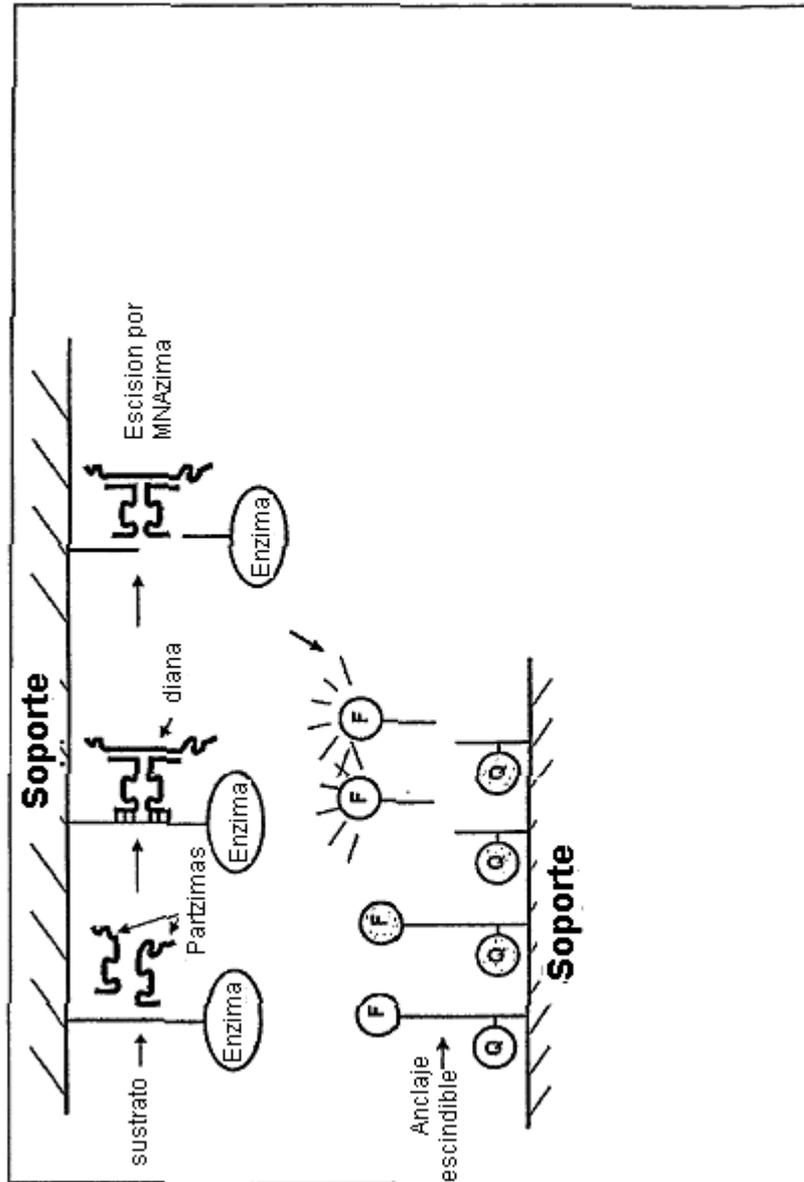


Figura 7

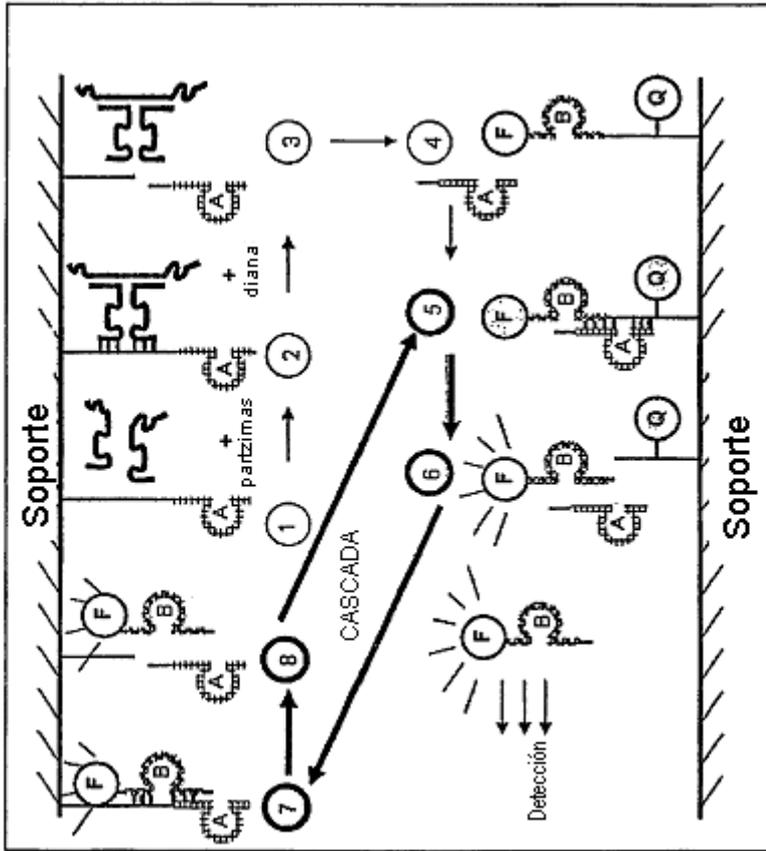


Figura 9

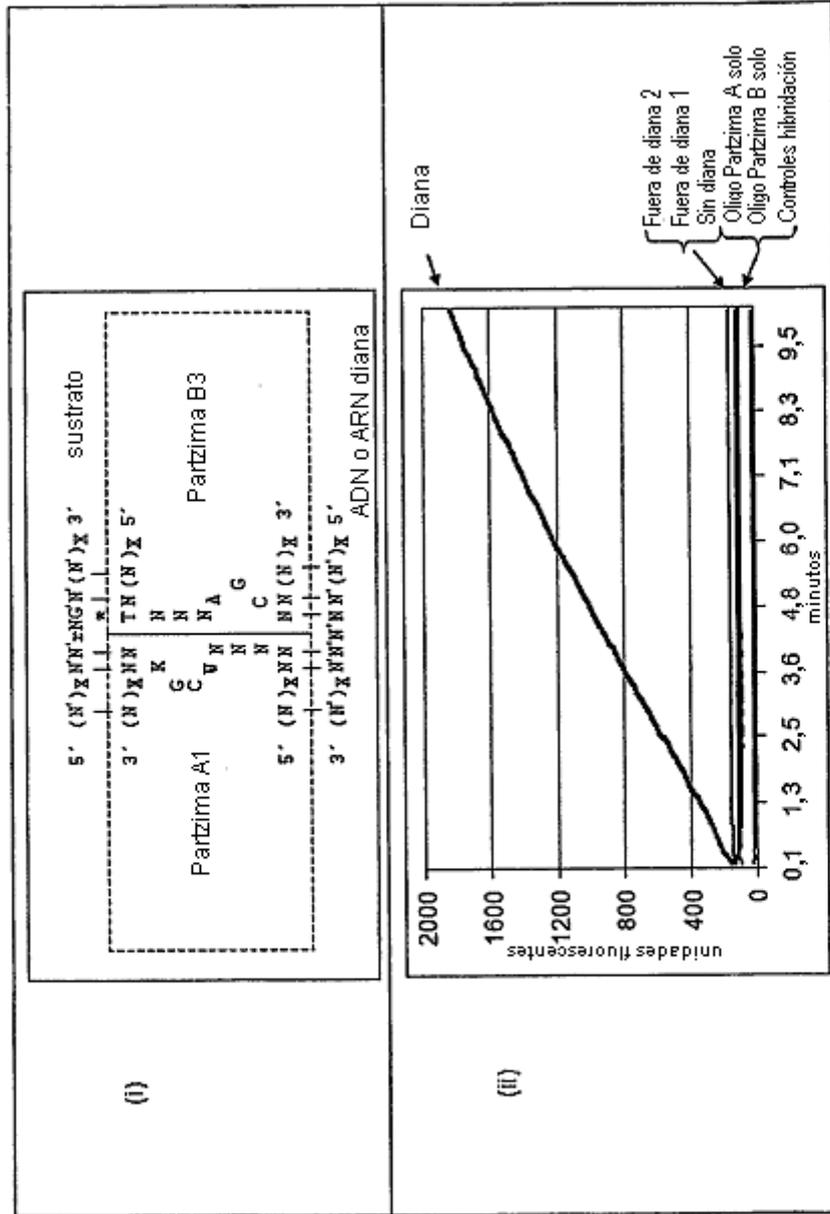


Figura 10

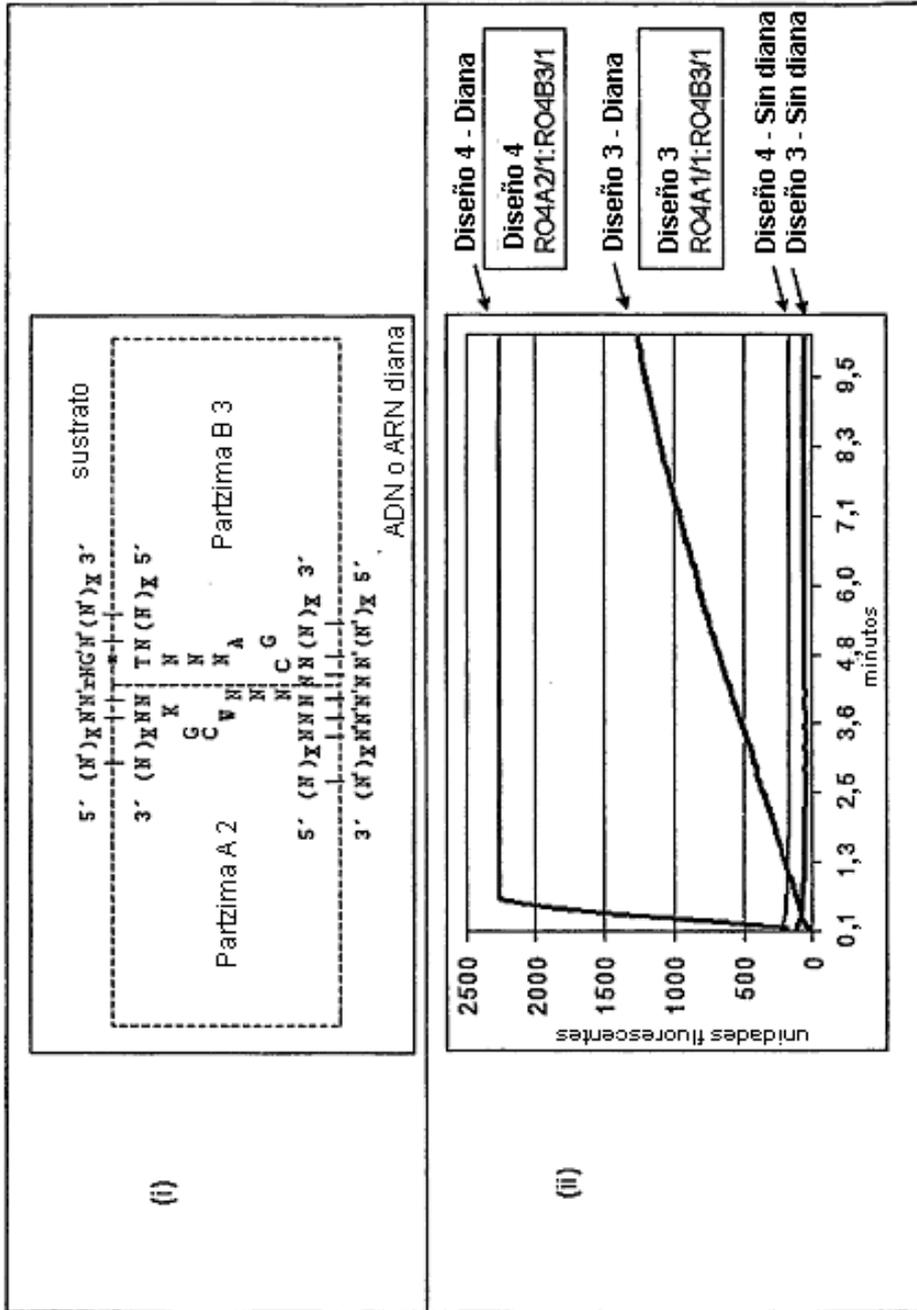


Figura 12

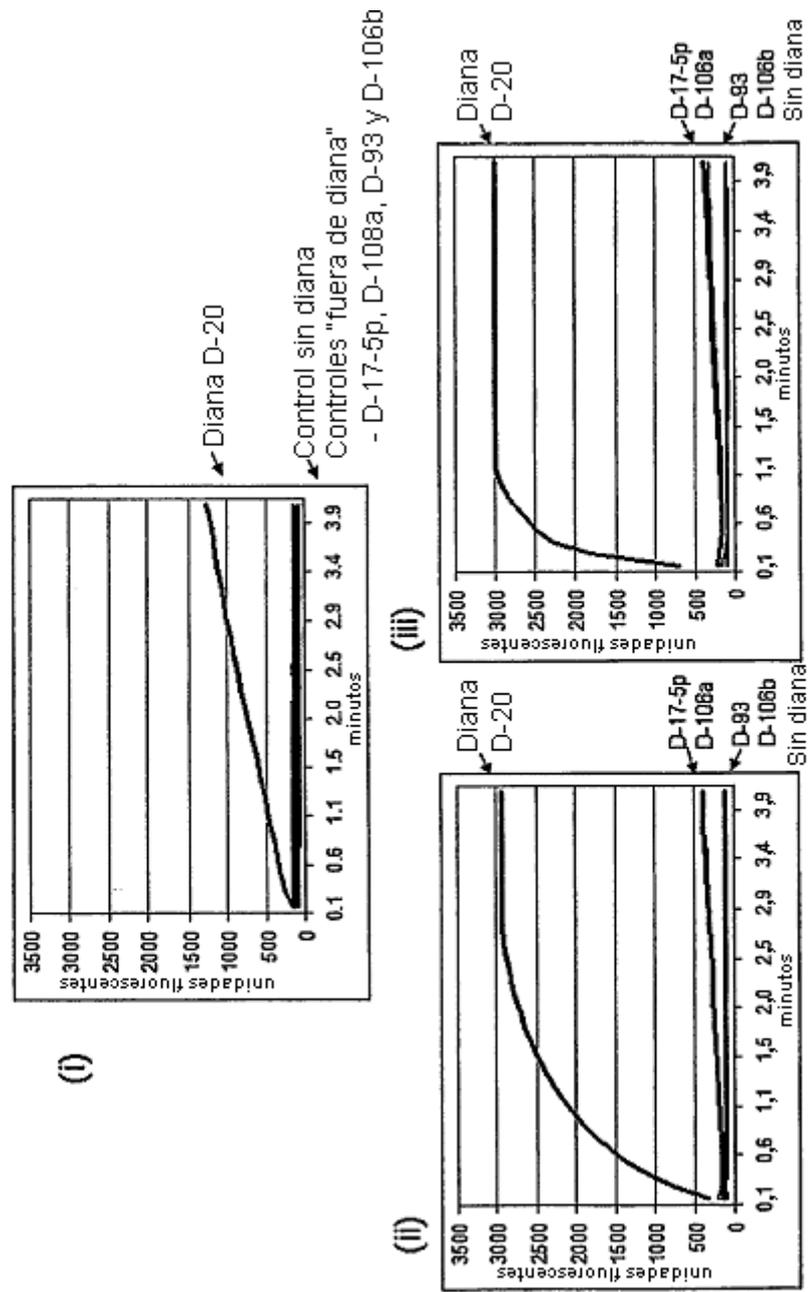


Figura 13

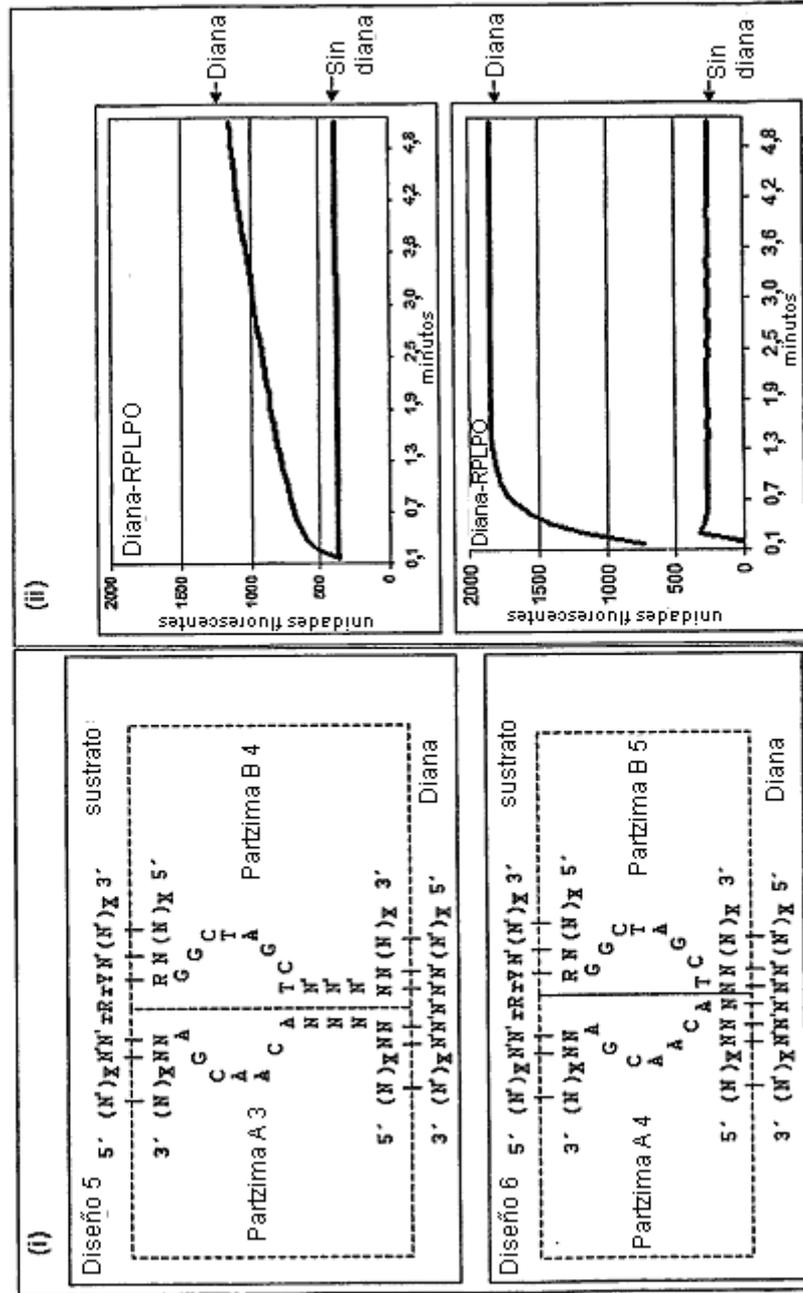


Figura 14

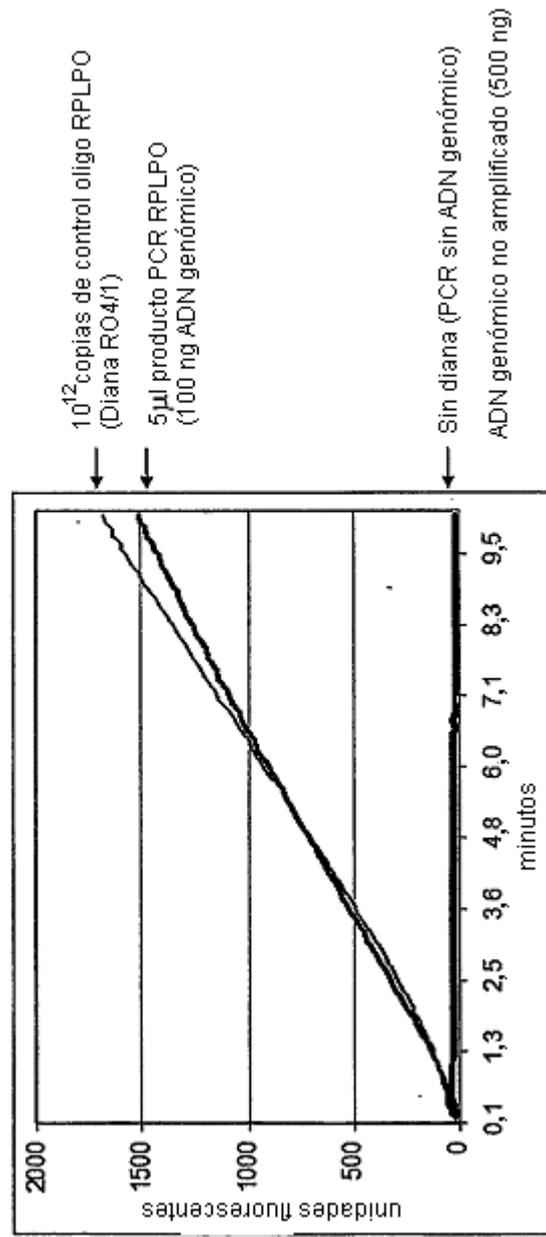


Figura 15

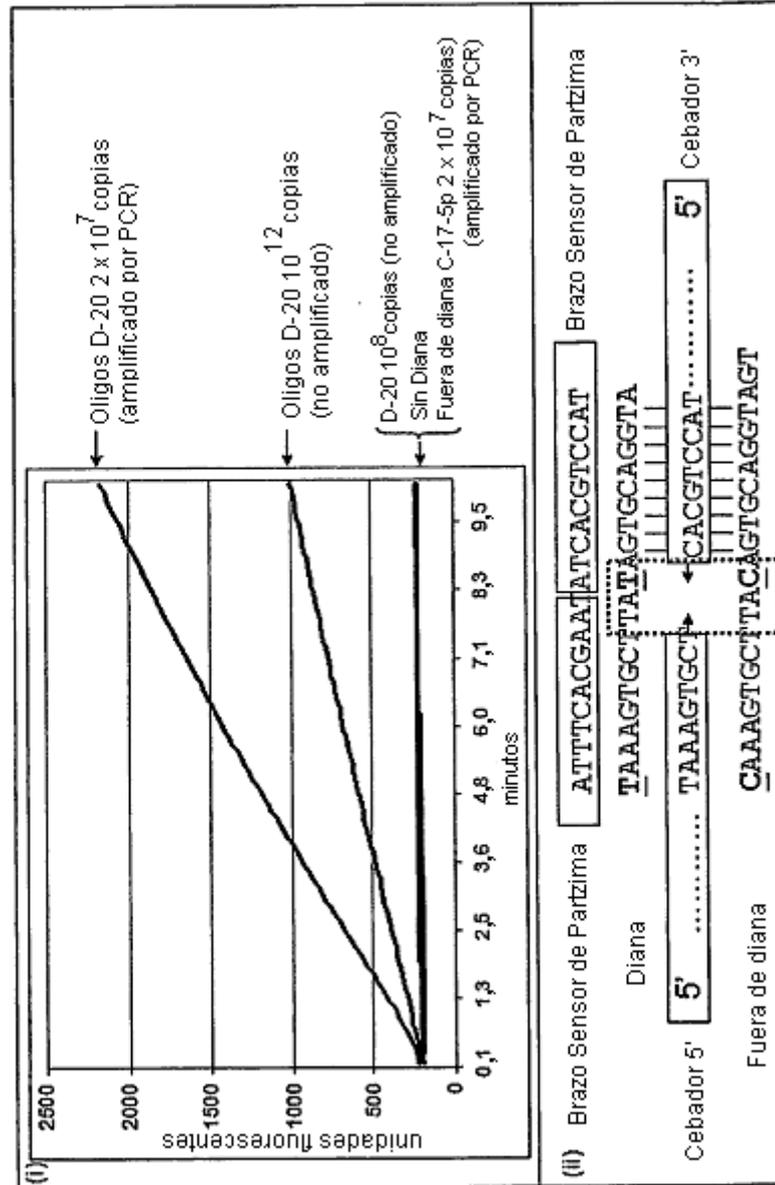


Figura 16

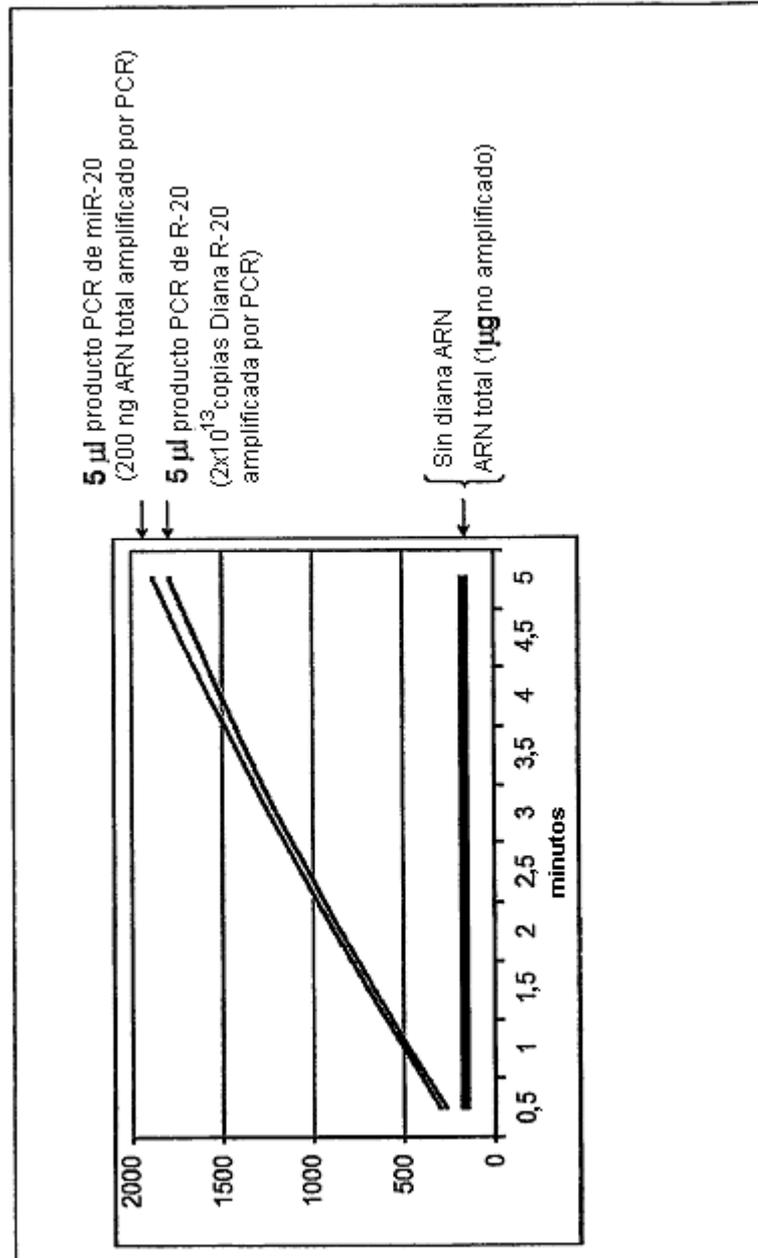


Figura 17

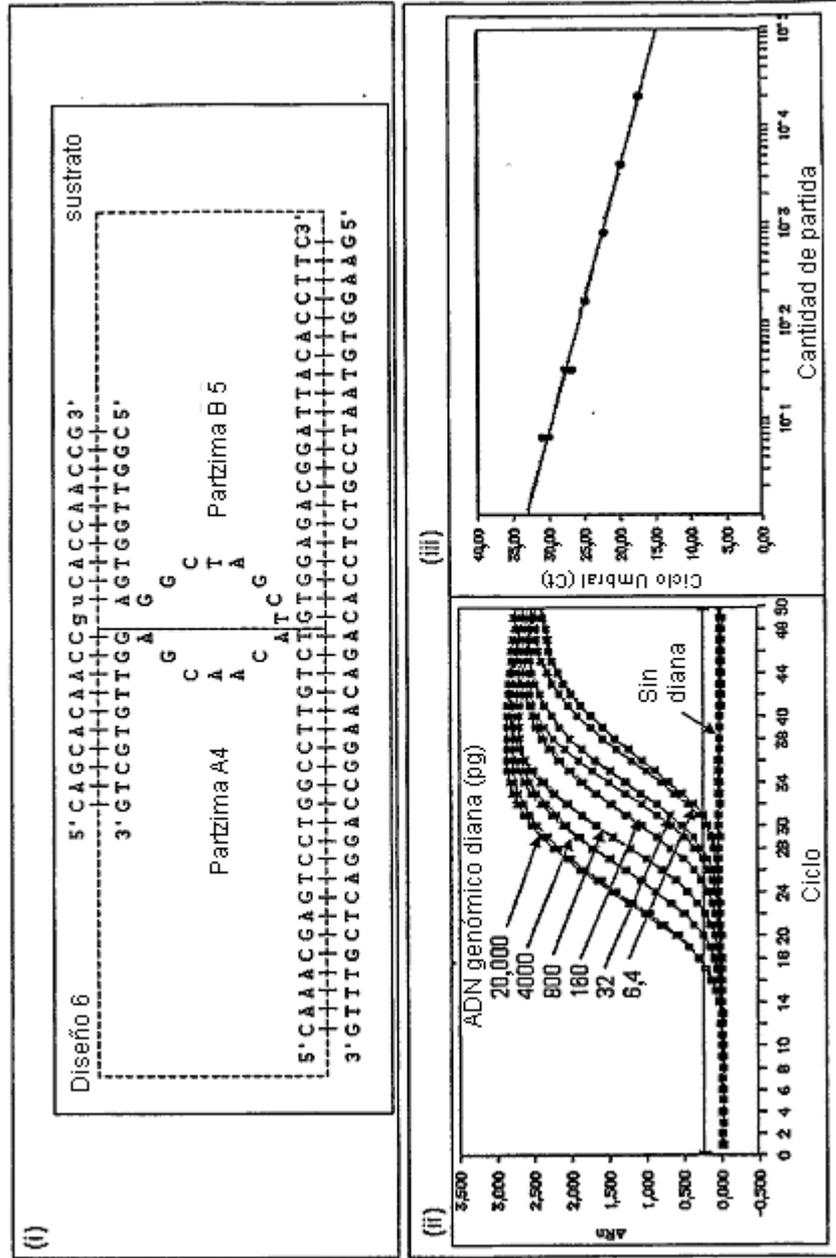


Figura 18

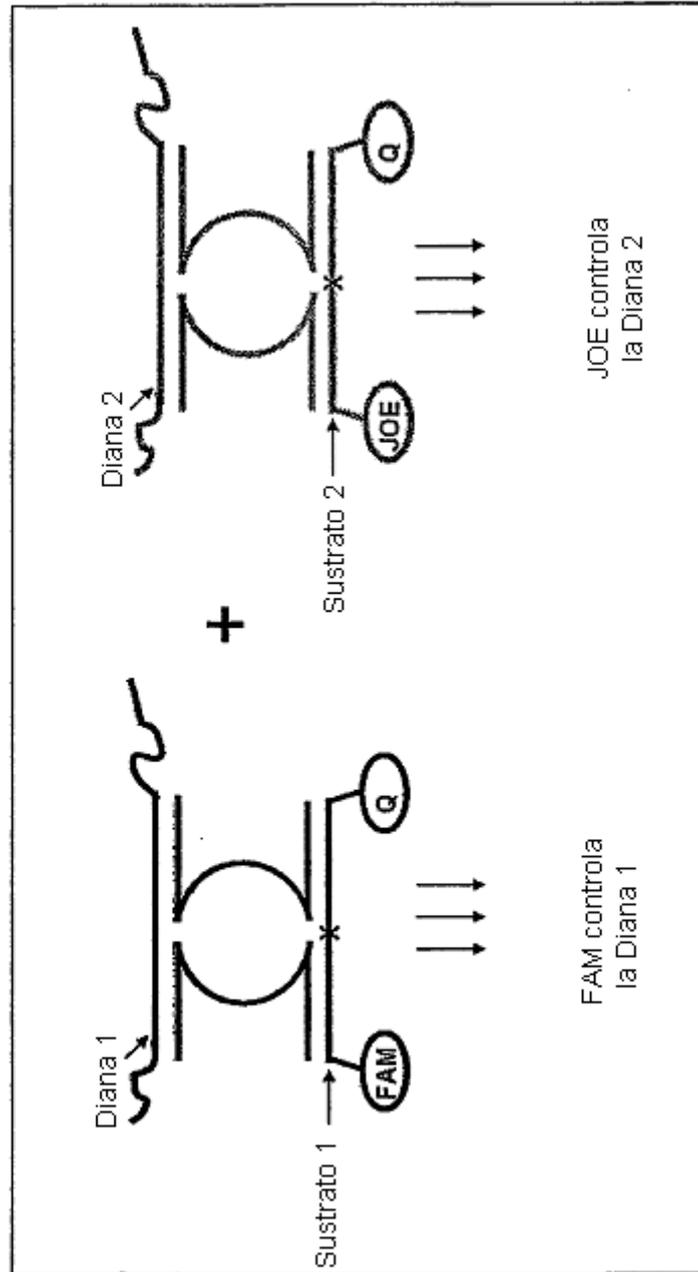


Figura 19

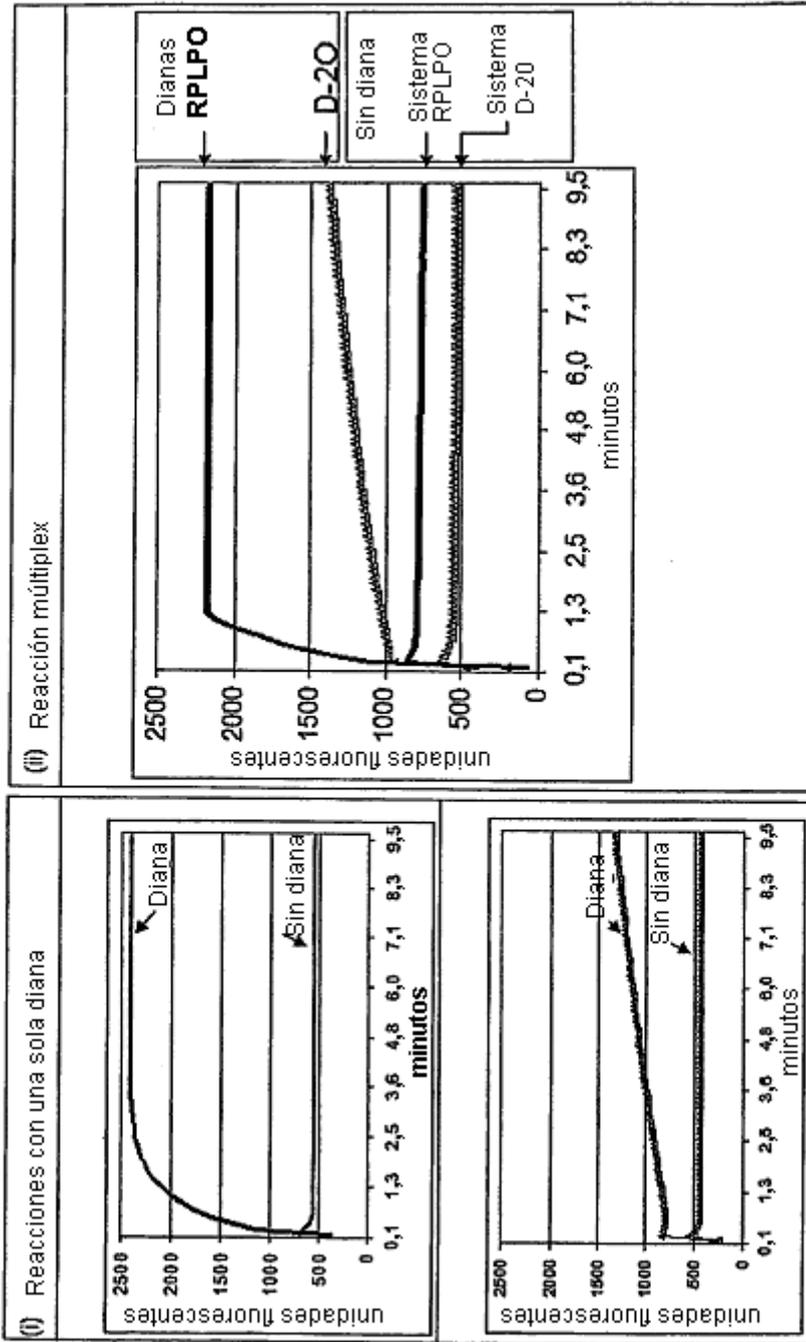


Figura 20

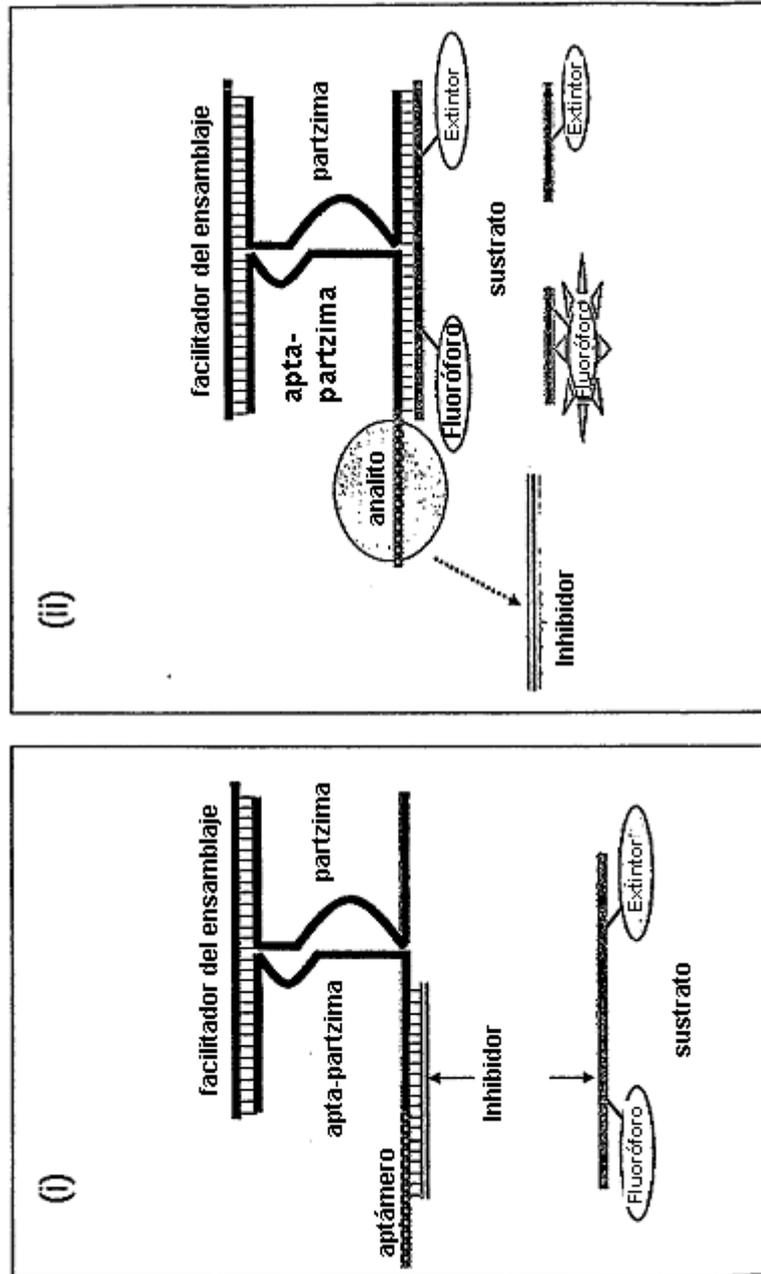


Figura 21

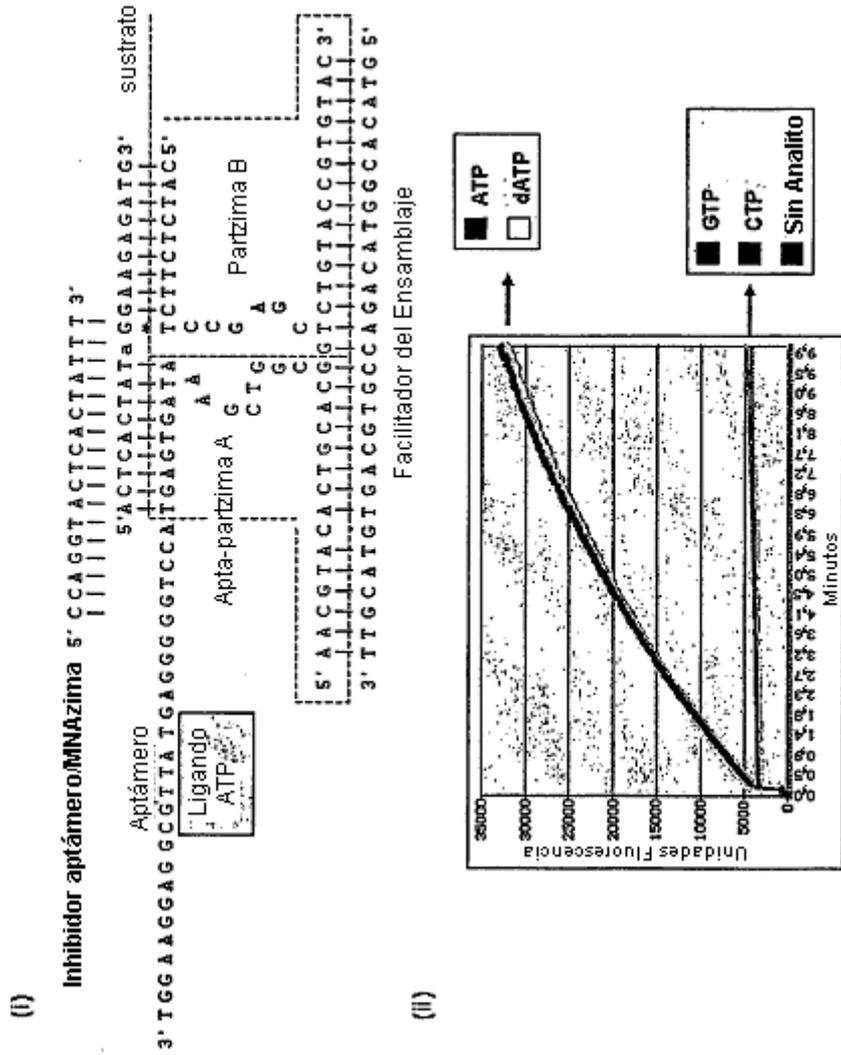


Figura 22

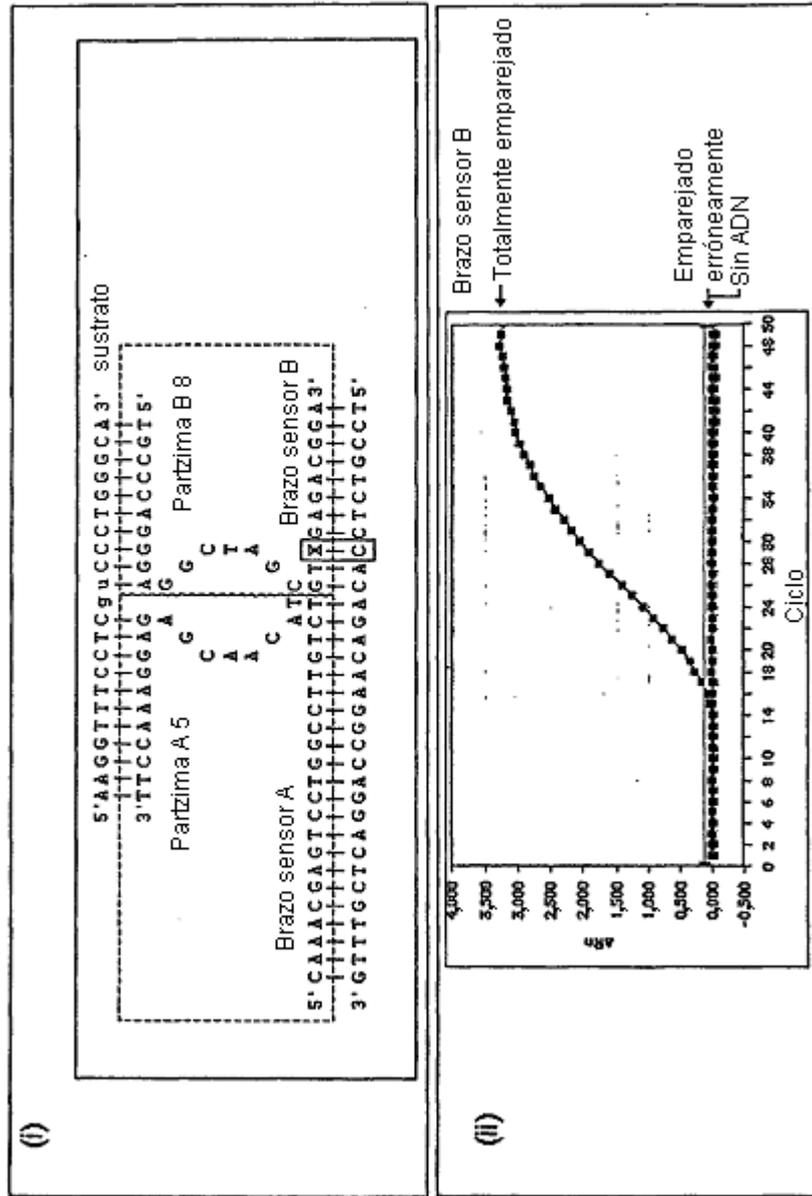


Figura 23

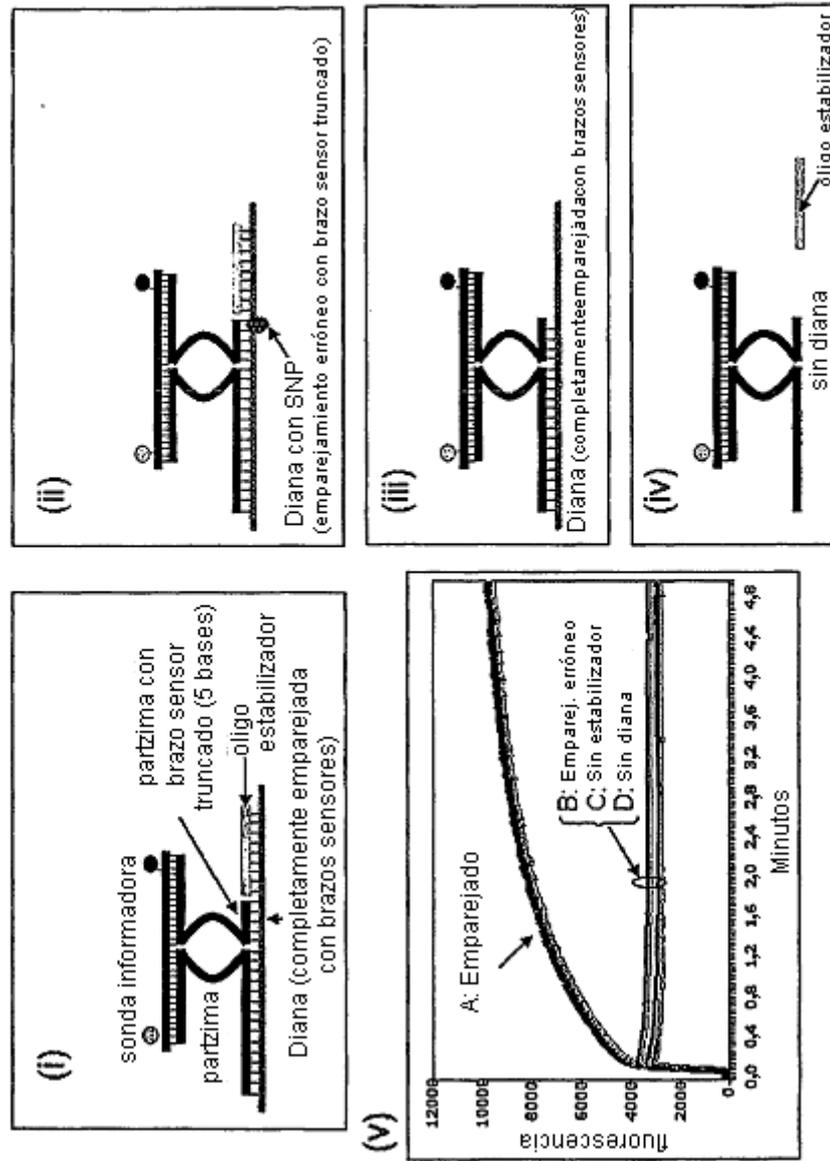


Figura 24

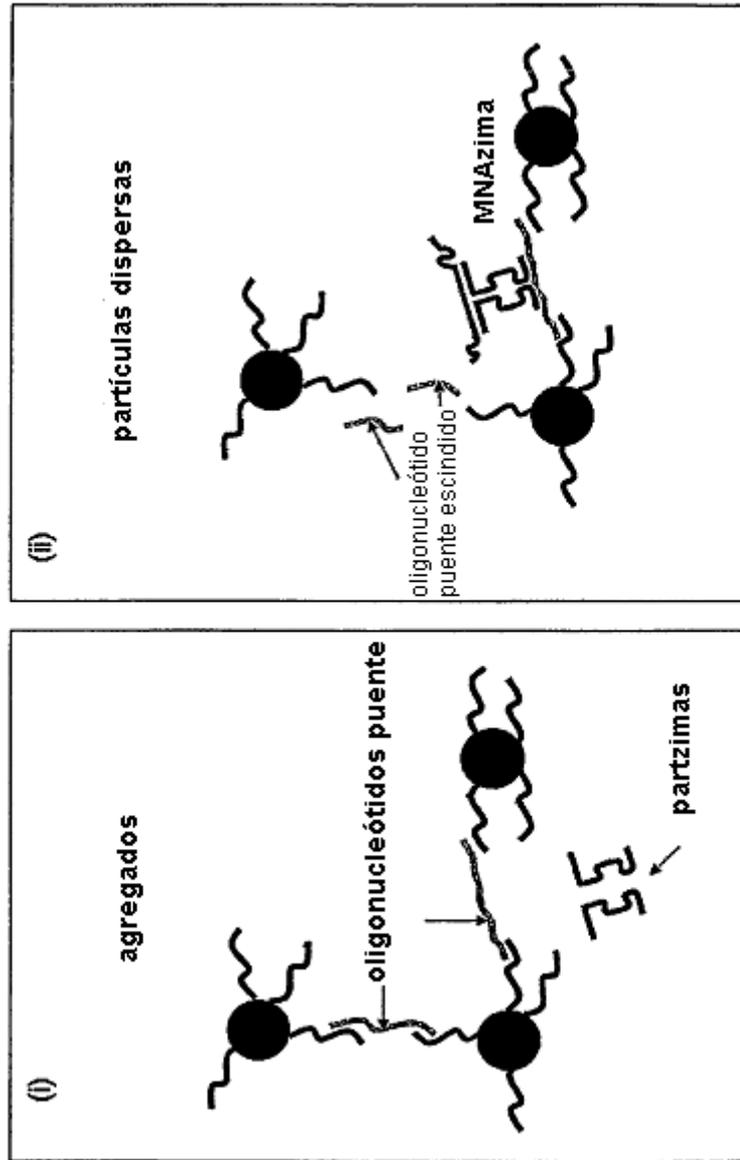


Figura 25

