

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 023**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07815323 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2066817**

54 Título: **Interruptores moleculares y métodos para su uso**

30 Prioridad:

06.10.2006 US 828451 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 520 023 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).

Interrupidores moleculares y métodos para su uso

Descripción

5 ÁMBITO TÉCNICO

10 [0001] El presente invento trata de compuestos y métodos que permiten la manipulación de la actividad catalítica de los complejos de ácido nucleico multi-componente (MNA). Además, se proporcionan métodos que usan estos compuestos y métodos para crear sensores moleculares, interruptores moleculares, y/o moduladores o propagadores de cascadas autocatalíticas autorreplicativas y otros procesos iterativos. Más en concreto, el invento trata de compuestos que permiten el auto-ensamblaje de complejos de ácido nucleico multicomponente inactivos y los métodos para su uso.

15 Contexto del invento

20 [0002] Además de sus funciones evolutivas optimizadas, las extraordinarias propiedades físicas y funcionales de los ácidos nucleicos proporcionan la oportunidad de un sinfín de dispositivos y métodos bio-moleculares nuevos. Se ha contemplado el diseño de ácidos nucleicos para usos terapéuticos, biosensores, instrumentos a escala nano y herramientas para el cálculo molecular. Los métodos utilizan las características del auto-ensamblaje del ADN, la electro conductividad, elementos de información, amplificación, interruptores, detección molecular y actividad catalítica. Además, teniendo en cuenta que el ADN es sólido, estable y termoestable, proporciona un material perfecto para la ingeniería molecular de instrumentos mecánicos o informáticos.

25 [0003] Los ácidos nucleicos monocatenarios, como el ADN y el ARN, tienen la capacidad de multiplicarse en estructuras tridimensionales complejas que pueden funcionar como receptores altamente específicos (aptámeros) y catalizadores (ribozimas y and DNAzimas). Además, la necesaria complementariedad entre cadenas de ácido nucleico para la hibridación conforma la base de una amplia gama de técnicas, que permiten la detección de objetivos (como el análisis de micromatriz, Northern blot o Southern blot), y/o amplificación del objetivo (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa). Además, la hibridación proporciona la base para la construcción a nano escala de ácido nucleico y para estrategias computacionales basadas en el ADN.

30 [0004] La auto-replicación es un proceso por el cual los elementos pueden duplicarse (copiarse) a sí mismos. En dichos procesos, los productos de cada una de las reacciones dirigen la formación de las nuevas copias (replicones) del elemento a partir de las partes de los compuestos. Se ha desarrollado una amplia variedad de técnicas para la auto-replicación de las secuencias de ácido nucleico.

35 [0005] Los métodos para la réplica *in vitro* de las secuencias diana de ácido nucleico (amplificación de la diana) son muy conocidos. Muchos de estos métodos necesitan cebadores oligonucleótidos, capaces de hibridación específica con el ADN o ARN diana, que puede extenderse por la polimerasa de ADN o ARN para crear una nueva copia de la diana (un amplicón), usando la diana como modelo para la síntesis directa. Dichas técnicas (revisadas por Schweitzer y Kingsmore, 2001) incluyen la reacción en cadena de polimerasa, amplificación del desplazamiento de cadena, amplificación de círculo rodante y amplificación isotérmica mediada por bucle, amplificación mediada por transcripción, auto-replicación de secuencia y amplificación basada en la replicación de secuencia de ácido nucleico. Un enfoque alternativo, conocido como reacción en cadena de la ligasa ("RCL") usa una ligasa de proteína para amplificar las dianas de ácido nucleico. La reacción depende de la capacidad de los productos de ligación de cada tanda para servir como modelos para dirigir la ligación de nuevas copias de la diana (Barany, 1991).

40 [0006] Las tecnologías de amplificación de la diana, como las que se han indicado anteriormente, se han usado con frecuencia en investigación y/o en diagnóstico clínico. De todas formas, a pesar de su valor, cada una tiene sus desventajas inherentes. Todas ellas necesitan el uso de enzimas de proteína (por ejemplo, polimerasa de ADN, polimerasa de ARN, transcriptasa inversa, y o ligasa). La inclusión de enzimas de proteína aumenta la complejidad y el coste de la fabricación del reactivo y disminuye el período de conservación de los kits que contienen reactivos. Otros retos técnicos asociados son la contaminación por replicones (amplicones de la diana) de reacciones previas que llevan a indicar falsos positivos y/o señales de fondo motivadas por la réplica de secuencia de cebadores (cebadores-dímeros) o un fondo provocado por la ligación independiente de diana.

45 [0007] En los últimos 20 años se ha descubierto una amplia variedad de moléculas de ácido nucleico, con actividad enzimática o catalítica. Las enzimas de ARN ("ribozimas") se dan en la naturaleza pero pueden manipularse para que de forma específica reconozcan y modifiquen un substrato diana de ARN (Haseloff y Gerlach, 1988). Las técnicas de evolución *in vitro* han facilitado el descubrimiento y el desarrollo de muchos otros ácidos nucleicos catalíticos, incluidos los ácidos desoxirribonucleicos, a los que con frecuencia se hace referencia como "enzimas de ADN" o "DNAzimas" (revisado por Emilsson y Breaker, 2002). Las DNAzimas y/o ribozimas con evolución *in vitro* se ha descubierto que tienen la capacidad de catalizar una amplia gama de reacciones, entre las que se incluye la división de ácidos nucleicos (Carmi *et al.*, 1996; Raillard y Joyce, 1996; Breaker, 1997; Santoro y Joyce, 1998), ligación de ácidos nucleicos (Cuenoud y Szostak, 1995; Prior *et al.*, 2004), metalización de porfirina (Li y Sen, 1996), y la formación de cadenas de carbono-carbono (Tarasow *et al.*, 1997), uniones de éster (Illangasekare *et al.*, 1995)

o uniones de amida (Lohse y Szostak, 1996).

[0008] En concreto, las DNAzimas y las ribozimas se han caracterizado por específicamente dividir secuencias diferenciadas de ácido nucleico después de la hibridación a través de emparejamiento de bases de Watson Crick. Las DNAzimas son capaces de dividir tanto moléculas de ARN (Breaker y Joyce, 1994; Santoro y Joyce, 1997) como de ADN (Carmi *et al.*, 1996). Las ribozimas también son capaces de dividir secuencias diana tanto de ARN (Hasehoff y Gerlach, 1988) como de ADN (Raillard y Joyce, 1996). La tasa de división catalítica de muchas enzimas de ácido nucleico es dependiente de la presencia y el nivel de concentración de iones de metales divalentes como Ba²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y Pb²⁺ (Santoro y Joyce, 1998; Brown *et al.*, 2003).

[0009] Las DNAzimas "10:23" y "8:17" son capaces de dividir sustratos de ácido nucleico en uniones de fosfodiéster de un ARN específico para crear un producto de reacción que tenga grupos de 2', 3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxil (Santoro y Joyce, 1997; revisado por Emilsson y Breaker, 2002). Entre los ejemplos de desoxirribozimas (DNAzimas), que pueden ligar productos de 2', 3'-fosfato cíclico and 5'-hidroxil se incluyen las ligas "7Z81" y "7Z48" (Prior, 2004).

[0010] Hay varios ácidos nucleicos catalíticos, entre los que se incluye la ribozima en cabeza de martillo, las DNAzimas 10:23 y 8:17 y las ligasas "7Z81" y "7Z48" que tienen estructuras básicas semejantes con dominios múltiples. Estas enzimas de ácido nucleico tienen un dominio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dos dominios con de unión de sustrato no conservados ("brazos"), que de forma específica reconocen y se hibridan al sustrato. Mientras estas enzimas de ácido nucleico pueden funcionar como auténticas enzimas múltiples de transporte, cada una de las enzimas solo tiene capacidad para reconocer una molécula, en concreto el sustrato que entonces puede modificar catalíticamente.

[0011] Se ha demostrado que los ácidos nucleicos catalíticos solo toleran ciertas modificaciones en el área que forma el núcleo catalítico (Perreault *et al.*, 1990; Perreault *et al.*, 1991; Zaborowska *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2004; Silverman, 2004). Dependiendo de la dureza de las condiciones de la reacción, podría tolerarse un cierto grado de desajuste dentro de los brazos del sustrato. De todas formas, los requisitos para el emparejamiento de base Watson Crick es lo suficientemente estricto como para permitir el desarrollo de protocolos que usen ácidos nucleicos catalíticos para facilitar la discriminación de secuencias estrechamente relacionadas (Cairns *et al.*, 2000) (WO 99/50452).

[0012] Los "aptámeros" son secuencias de ADN, ARN o péptidos que tienen capacidad de reconocer uno o más ligandos con gran afinidad y especificidad debido a su estructura de alto nivel. Por ejemplo un dominio o bolsa unido por 3-D. Muchos aptámeros han sido evolucionados *in vitro* por su capacidad de unirse a ligandos, entre ellos, por ejemplo, los ácidos nucleicos, las proteínas, los priones, pequeños compuestos orgánicos y/o organismos completos. Las "aptazimas" tienen secuencias comprendidas tanto de aptámeros como de secuencias catalíticas de ácido nucleico (ribozimas o DNAzimas). La unión de un ligando al aptámero induce una modificación de la conformación de la aptazima que activa una ribozima o DNAzima.

[0013] Sando (2003) ha desarrollado, junto con otros compañeros, una estrategia de amplificación de la señal que usa moléculas de detección (sondas de auto división con ayuda de la diana (TASC)), que contenían dominios múltiples que constituirían una secuencia de detección de la diana, un dominio de DNAzima y un sustrato quimérico de ADN/ARN para la DNAzima adosada. Mientras este método evita el uso de enzimas de proteína, las sondas TASC son moléculas complejas y caras que deben hacerse a medida para cada nueva diana.

[0014] Varios grupos han documentado la detección de dianas de ácido nucleico y otros analitos con lecturas colorimétricas (Elghanian *et al.*, 1997, Mirkin *et al.*, 1996, y Liu and Lu, 2004). Esta estrategia utiliza partículas nanoscópicas de oro etiquetadas con oligonucleótidos. Las partículas de oro pueden entonces agregarse a través del proceso de añadir un "oligonucleótido de conexión", provocando un cambio de color de rojo a azul (Mirkin *et al.*, 1996). Liu y Lu (2004) ampliaron esta estrategia con la incorporación de un sustrato de DNAzima al oligonucleótido de conexión, de forma que la activación de la DNAzima tiene como resultado una división, dispersión de las partículas de oro y un cambio de color de azul a rojo. El grupo usó este sistema para detectar plomo usando una DNAzima sensible al plomo y para detectar la adenosina usando una aptazima.

[0015] Se conocen varios ejemplos de cascadas de amplificación, que usan ácidos nucleicos catalíticos. La estrategia zimógeno/DzyNA combina la amplificación de diana (por ejemplo, PCR), con la replicación de DNAzimas. Las DNAzimas, que están co-amplificadas con la diana, dividen uno o más sustrato (s) de marcador universal permitiendo la detección genérica de una o más dianas (US 6,140,055; US 6,201,113; US 6365724; WO 99/45146, Todd *et al.*, 2000). Se han concebido estrategias para cascadas de amplificación que usan ácidos nucleicos catalíticos, en lugar de enzimas de proteínas para mediar la amplificación. En otra estrategia, una amplificación de señal usó dos DNAzimas 10:23 inactivas, circularizadas que fueron capaces de activarse mutuamente a través de una división cruzada que tuvo como resultado la linealización. Paul y Joyce (2004) han descrito una cascada de réplica mediada por una ribozima con actividad de ligasa. En esta reacción, una primera ribozima liga dos ARN que contienen oligonucleótidos para formar una segunda ribozima. Entonces, la segunda ribozima liga otras dos ARNs que contienen oligonucleótidos para formar una nueva primera ribozima, que activa una cascada de réplica, que

produce nuevas copias tanto de la primera como de la segunda ribozima.

5 **[0016]** Las cascadas de ácido nucleico se han tenido en cuenta para una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas, especialmente de diagnóstico. Pueden permitir la detección de proteínas y ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades facilitando la amplificación de señal. Los ácidos catalíticos nucleicos y/o las reacciones en cascada pueden usarse para aplicaciones distintas del diagnóstico, como en el ámbito del análisis computacional y la ingeniería biomolecular de instrumentos a nano escala e interruptores que podrían tener usos terapéuticos.

10 **[0017]** Los instrumentos que pueden convertir información de una forma a otra, de acuerdo con un procedimiento finito, se llaman autómatas. Un autómata programable finito, que consiguió resolver problemas informáticos se desarrolló usando enzimas de proteínas (una endonucleasa de restricción y una ligasa) y ADN de doble cadena (Benenson *et al*, 2001). Las enzimas sirven como "hardware" y el ADN codifica el "software". La entrada de datos y el autómata se programan con la selección del software del ADN adecuado. El autómata procede a través de una cascada de ciclos de división, hibridación y ligación, produciendo una molécula de salida detectable que codifica el estado final del autómata y de esa forma el resultado informático.

20 **[0018]** Podrían usarse ordenadores sencillos programables a escala molecular, que usan moléculas biológicas como datos de entrada y moléculas activas biológicamente como salida para crear sistemas para el control lógico de procesos biológicos (Benenson *et al*, 2004). Como demostración del concepto *in vitro*, Benenson *et al* han desarrollado un ordenador bio-molecular capaz de (i) medir la abundancia de especies específicas transportadoras de ARN y (ii) responder liberando una molécula de cadena única de ADN capaz de afectar a la expresión genética. Otro autómata molecular, que usaba una red de DNazimas para crear puertas lógicas a escala molecular, se programó para jugar al "tres en raya" (Stojanovic y Stefanovic, 2003). Recientemente, se ha diseñado una DNazima binaria con actividad de ligasa para reconocer e hibridar ("leer") a una secuencia, y ligar ("escribir") una secuencia separada e independiente, que por su parte podría amplificarse por medio de PCR (Tabor *et al*, 2006).

30 **[0019]** Los métodos en los que la informatización del ADN interactúa con la biología pueden tener amplias aplicaciones. Por ejemplo, una puerta lógica simple de ADN podría regular la liberación de insulina en base a una combinación de señales fisiológicas, como por ejemplo un alto nivel de azúcar en la sangre y glucagón bajo (Cox y Ellington 2001). Además, el progreso en el descubrimiento de nuevas funcionalidades para los ácidos nucleicos ha proporcionado toda una serie de herramientas, como aptámeros y ácidos nucleicos catalíticos, junto con nuevos compuestos estructurales que permiten el desarrollo de componentes para "máquinas" moleculares a nano escala.

35 **[0020]** Se han usado varios procesos para manejar los nanodispositivos y autómatas, incluidos los (i) procesos de hibridación, que incluyen migración de ramificación en cadena, inhibición de hibridación entre cadenas complementarias por la formación de estructuras secundarias, como por ejemplo formaciones de horquilla, (ii) división usando una endonucleasa y (iii) la inducción de cambios de configuración como la rotación alrededor de un eje central del ADN, movimientos de contracción/extensión y traslación. Un traductor de señal modular de ADN para la liberación controlada de una proteína por un aptámero usó una secuencia arbitraria de ADN como "entrada" (Beyer y Simmel, 2006).

45 **[0021]** De forma que hay una necesidad en aumento de métodos sencillos, rápidos y rentables para la detección de dianas, y para el ensamblaje de instrumentos a nano escala, incluidos instrumentos programables, que pueden funcionar usando componentes estables de ácido nucleico.

RESUMEN DEL INVENTO

50 **[0022]** En un aspecto del invento se proporciona el uso de un MNAi como interruptor molecular, donde dichas transiciones MNAi de un complejo inactivo a un activo MNA se da en respuesta e un evento de entrada.

[0023] En otro ejemplo, la transición puede tener como resultado un cambio de la señal de salida.

55 **[0024]** En otro ejemplo, el evento de entrada puede elegirse del grupo que incluye cambio en la temperatura, nivel de concentración de sal, potencia iónica, pH, presencia o ausencia de catión divalente, tipo o concentración, carga eléctrica, carga magnética, manipulación física y cambio en la concentración de un MNA o componente de modulador o componente del micro ambiente o cualquier otra combinación que pueda darse.

60 **[0025]** En otro de los ejemplos, el cambio de la señal de salida puede incluir la aparición de un señal que previamente estaba ausente, la desaparición de una señal que previamente estaba presente o un aumento o disminución de la señal de salida.

65 **[0026]** En otro de los ejemplos, la señal de salida puede depender de la modificación de un sustrato, donde la modificación se selecciona del grupo que comprende la división, ligación, metalación de porfirina, formación de ligas carbono-carbono, uniones de éster o uniones de amida o cualquier otra combinación que pueda darse.

5 **[0027]** En otro de los ejemplos, la señal de salida puede determinarse por medio de un espectroscopio de fluorescencia, resonancia plasmónica de superficie, espectroscopio de masa, NMR, resonancia del espín electrónico, espectroscopio de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, escintigrafía, gammagrafía, métodos electrónicos, UV, espectroscopia de luz visible o infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier otra combinación. Además, la determinación podría llevarse a cabo con un método que permita que se cuantifique la señal de salida. Además, la magnitud del hecho de entrada podría determinarse a partir de la señal cuantificada de salida. Además, cualquiera o tanto el evento de entrada como la señal de salida pueden amplificarse. Además, la amplificación de señal de salida podría generarse por medio de una cascada de señales.

10 **[0028]** La MNAi del invento comprende dos o más componentes oligonucleótidos y por lo menos una molécula inhibidora de la actividad.

15 **[0029]** En un aspecto del invento, se proporciona un MNAi que comprende uno o más compuestos oligonucleótidos donde como mínimo un primer compuesto oligonucleótido y un segundo compuesto oligonucleótido son capaces de auto-ensamblarse en presencia de cómo mínimo un inhibidor de actividad compleja de MNA donde cada uno de los dos y como mínimo el primer y segundo compuesto oligonucleótido comprenden una porción de brazo de sustrato, una porción de núcleo catalítico y una porción del brazo del sensor; donde por el auto-ensamblaje, la porción del brazo del sensor de dichos primer y segundo componentes de oligonucleótidos actúan como brazo de sensor, la porción de brazo de sustrato del primer y segundo compuesto oligonucleótidos actúan como brazos de sustrato y la porción de núcleo catalítico del primer y segundo compuesto oligonucleótidos forman el núcleo catalítico no funcional; y donde tras el auto-ensamblaje por lo menos uno de los brazos del sensor interactúa con dicho inhibidor de la actividad y dichos primer y segundo compuestos oligonucleótidos se mantienen en proximidad por la asociación de sus porciones respectivas de núcleo catalítico para formar un núcleo catalítico no funcional.

25 **[0030]** En otro ejemplo, el inhibidor de la actividad podría ser un sustrato.

30 **[0031]** En otro ejemplo, por lo menos uno de los componentes del complejo podría contener como mínimo un aptámero o porción donde dicho aptámero o porción una un ligando seleccionado del grupo comprendido de 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 ellos.

35 **[0032]** En otro aspecto del invento se proporciona un método para la detección de un facilitador de ensamblaje usando una cascada de señal que comprende una primera MNAzima, un complejo de MNA inicialmente presente en forma inactiva substancialmente catalíticamente (MNAi), un inhibidor de actividad capaz de modificarse por dicha primera MNAzima para proporcionar un efecto detectable, donde dicho inhibidor de la actividad es tanto inhibidor de la actividad como sustrato potencial; y
 40 donde la asociación de dicho facilitador del ensamblaje con partzimas para dicha primera MNAzima bajo condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima proporcionando la modificación de dicho inhibidor de la actividad para liberar un dominio activador del facilitador del ensamblaje y un dominio inhibidor de la actividad y donde dicha liberación proporcione dicho efecto detectable; y
 45 donde dicho dominio activador del facilitador del ensamblaje facilite el ensamblaje de una segunda MNAzima con componentes de dicho complejo de MNA; y donde la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima modifique dicho inhibidor de la actividad para liberar mayor dominio de inhibidor de la actividad y más dominio del activador del facilitador del ensamblaje, y donde dicha liberación proporcione un efecto más detectable y;
 50 donde dicho dominio activador del facilitador del ensamblaje facilite el ensamblaje de la segunda MNAzima adicional, proporcionando dichas MNAzimas catalíticamente activas que proporcionen un efecto más detectable indicativo de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje.

55 **[0033]** Donde el ensamblaje de las MNAzimas activas catalíticamente puedan ser reguladas por un evento de entrada seleccionado del grupo que comprende cambios de la temperatura, concentración salina, potencia iónica, pH, presencia o ausencia de cationes divalentes, tipo o concentración, carga eléctrica, carga magnética, manipulación física y cambios en la concentración de un MNA o componente de modulador o componente del micro ambiente o cualquier otra combinación.

60 **[0034]** En otro aspecto del invento se proporciona un método para detectar una diana usando una cascada, donde dicha cascada comprende una MNAzima inicial formada en la presencia de dicha diana; una primera MNAzima formada en presencia de un producto de dicha MNAzima inicial; una MNAzima adicional formada en presencia de un producto de dicha primera MNAzima donde dicho método comprenda los pasos de;

- 65 (i) Modificar un primer sustrato con dicha MNAzima inicial para generar un primer facilitador de ensamblaje;
 (ii) Ensamblar dicha primera MNAzima con dicho primer facilitador de ensamblaje;
 (iii) Modificar un sustrato adicional con dicha primera MNAzima para generar un facilitador del ensamblaje adicional;
 (iv) Ensamblar dicha MNAzima adicional con dicho facilitador del ensamblaje adicional;

- (v) Modificar dicho primer sustrato con dicha MNAzima adicional para generar dicho primer facilitador del ensamblaje;
- (vi) Ensamblar dicha primera MNAzima con dicho primer facilitador del ensamblaje liberado de (v) formando por lo tanto una cascada de amplificación; y

5 Donde dicha modificación de por lo menos uno de dichos primer sustrato o sustratos adicionales produce un efecto detectable que es indicativo de la presencia de dicha diana.

10 **[0035]** En otra representación, la primera y/o dicha MNAzima adicional puede comprender dos partzimas que se han convertido en activas catalíticamente en presencia de por lo menos dos componentes facilitadores del ensamblaje.

[0036] En otro ejemplo, la primera MNAzima o la MNAzima adicional pueden comprender dos partzimas que se volverán activas catalíticamente en presencia de tres o más componentes facilitadores del ensamblaje.

15 **[0037]** En otro ejemplo, el efecto detectable podría ser detectado como mínimo por uno de los siguientes elementos: espectroscopio de fluorescencia, resonancia plasmónica de superficie, espectroscopio de masa, NMR, resonancia del espín electrónico, espectroscopio de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fometría, escintigrafía, métodos electrónicos, UV, espectroscopio de luz visible o infra roja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los anteriores.

20 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

[0038]

25 **Figura 1: Representación de un diseño a modo de ejemplo de un ácido nucleico multi-componente (MNAzima).** A través de una representación a modo de ejemplo, una MNAzima compuesta de dos partzimas (A y B), que se auto ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje. Cuando dos partzimas se ensamblan en la presencia de un facilitador del ensamblaje, una MNAzima activa catalíticamente forma lo que es capaz de modificar, por ejemplo dividir, un sustrato. Las dos partzimas del componente tienen (i) brazos de sensor, que se unen al facilitador de ensamblaje, (ii) brazos de sustrato, que unen el sustrato, y (iii) secuencias parciales del núcleo catalítico.

35 **Figura 2: Otro ejemplo de diseño para MNAzimas activas. Panel (i):** Representación de un ejemplo de diseño para MNAzimas donde se necesitan múltiples componentes facilitadores del ensamblaje para la formación de MNAzimas. En este esquema, uno de los componentes (F1) del facilitador de ensamblaje es complementario a las áreas de los brazos del sensor de las dos partzimas A y B, mientras que un segundo componente facilitador del ensamblaje (F2) es complementario o bien únicamente a la partzima B (como muestra esta ilustración), o únicamente a la partzima A. Los dos componentes facilitadores del ensamblaje conjuntamente dirigen el ensamblaje de una MNAzima activa que puede modificar (por ejemplo, dividir) un sustrato. **Panel (ii):** Representación de un diseño a modo de ejemplo donde el componente de la partzima A y el componente de la partzima B bipartida se ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para producir una MNAzima capaz de modificar (por ejemplo, dividir) un sustrato. En este diagrama, la partzima B tiene un brazo de sensor truncado (T), que es insuficiente para permitir un ensamblaje estable de MNAzima en la ausencia de un segundo componente, al que se hace referencia como componente estabilizador de brazo (S). La hibridación del brazo del estabilizador al facilitador de ensamblaje en una ubicación adyacente al brazo del sensor truncando de la partzima, permite el ensamblaje de una MNAzima activa.

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

50 Se ha observado un aumento en la fluorescencia en la reacción (i), que contenía todos los componentes de las partzimas A y B y un facilitador del ensamblaje. Esto es coherente con el ensamblaje de las MNAzimas activas y la división del sustrato en esta reacción. La omisión de la porción del brazo del estabilizador de la partzima B (reacción (ii)) ha tenido como resultado que no se dé ningún aumento en la señal en el tiempo, lo que indica que este componente es esencial para el ensamblaje de MNAzimas activas en este sistema. Una reacción de control en la que falta un facilitador del ensamblaje (reacción (iii)) tampoco mostró ningún aumento de la fluorescencia en el tiempo.

60 **Figura 4: Representación de un ejemplo de diseño para un MNAi (lado izquierdo) y una MNAzima activa (lado derecho):** Un MNAi se forma cuando los complejos de partzimas A y B con un componente facilitador del ensamblaje y un inhibidor de la actividad (lado izquierdo). La MNAi es capaz de interactuar con, pero no de modificar catalíticamente, el sustrato. En algunos ejemplos, el inhibidor de actividad podría también incluir un conector lábil o divisible (representado por la flecha de puntos), que podría separar dos o más dominios en el inhibidor de la actividad. Dichos dominios podrían incluir, por ejemplo, (i) un dominio inhibidor de la actividad que es

65

sustancialmente no complementario a los componentes de la partzima y que ejerce un efecto inhibitor por que altera la estructura secundaria necesaria para formar una MNAzima activa catalíticamente y (ii) un dominio de activador del facilitador del ensamblaje, que si se separa del dominio inhibitor de la actividad, podría funcionar como componente facilitador del ensamblaje y controlar el ensamblaje de una MNAzima activa.

Figura 5: Demostración de actividad catalítica de varios complejos multi-componente de ácidos nucleicos.

Todas las reacciones contenían partzima A, partzima B y un sustrato etiquetado con un par de colorante de fluoróforo y quencher. Además, las reacciones contenían o (i) un facilitador de ensamblaje F $\frac{1}{2}$, (ii) un facilitador de ensamblaje que comprenda los componentes F1 y F2 (la secuencia de ambos juntos corresponde a la del facilitador de ensamblaje F $\frac{1}{2}$), (iii) una porción de facilitador de ensamblaje F1 y un inhibidor de la actividad que contenga los dos dominios juntos que corresponden a un dominio inhibitor de la actividad y a un dominio con la misma secuencia de F2 o (iv) ningún facilitador del ensamblaje ni inhibidor de la actividad. El cambio en la fluorescencia ha sido monitorizado en cuanto al tiempo como medida de división catalítica del sustrato por complejos activos de MNAzima (Figura 5). La fluorescencia ha aumentado rápidamente en reacciones que contenían o el facilitador de ensamblaje F1/2 o los facilitadores del ensamblaje F1 y F2, que indican la formación de las MNAzimas activas 1 y 2 respectivamente, y los dos son capaces de dividir el sustrato. En contraste, la reacción que contiene F1 y el inhibidor de la actividad no mostraron ningún incremento en la fluorescencia en el tiempo, lo que indica la formación de complejos de MNAi. No se ha comprobado ningún aumento en la fluorescencia en ausencia de un facilitador del ensamblaje.

Figura 6: Representación esquemática de la Cascada de Señales usando ADN (SCUD). El protocolo que se ilustra incluye los siguientes componentes: (i) un componente RIF doblemente etiquetado (Marcador-Inhibidor-Facilitador) que contiene dominios múltiples;

- a. el dominio RI, que comprende un dominio inhibitor de la actividad/marcador, que tiene la doble función de en primer lugar ser un inhibidor de la actividad (cuando esté incorporado en RIF) y en segundo lugar proporciona una señal de salida fluorescente cuando RIF se divide,
- b. Un dominio facilitador de la activación del ensamblaje F2b que es un componente esencial para el ensamblaje de un complejo MNAzima 2a, y
- c. una secuencia de sustrato ubicada entre el RI y F2b, que cuando se divide por la MNAzima 1a o MNAzima 2a tiene como resultado la separación de los dominios RI y F2b.

(ii) Un componente de facilitador del ensamblaje F2a

(iii) Componentes de partzima capaces de formar estructuras de MNAzima activa 1a solo en presencia de otro facilitador del ensamblaje (F1), que a modo de ejemplo podría ser un ácido nucleico diana presente en una muestra de prueba; la MNAzima activa 1a sería capaz de dividir el RIF, liberando y activando de esa forma el dominio F2b, al retirar el dominio RI (que puede entonces emitir fluorescencia y generar una señal de salida),

(iv) las partzimas capaces de formar una MNAzima activa 2a solo cuando los brazos de la partzima unen el dominio F2b liberado adyacente a un dominio F2a. La MNAzima 2a, en cambio, puede dividir más RIF liberando más F2b, creando de esa forma una cascada de replicaciones auto-catalíticas de MNAzima 2a. En presencia de RIF intacto, los componentes de la MNAzima 2a se ensamblan en un complejo de MNAi 2i.

En ausencia de F1, las partzimas de la MNAzima 2a formarían un complejo de MNAi 2i con RIF intacto. En presencia de F1, la MNAzima 1a activa formaría y dividiría RIF, liberando F2b, que entonces quedaría libre para asociarse y facilitar el ensamblaje de una MNAzima 2a activa. Ya que la MNAzima 2a también puede dividir más RIF, esto podría iniciar una señal de cascada. SCUD (Figura 6) podría iniciarse por las dianas de ácido nucleico (ADN y/o ARN), u otros analitos diana (proteínas, pequeñas moléculas, etc) si la estrategia de SCUD estuviese relacionada con un sistema de aptámero-MNAzima (tal y como se muestra en la Figura 7).

Figura 7: Un ejemplo de estrategia para la modulación de la actividad de las MNAzimas.

La estrategia de este sistema puede usarse como (i) método para controlar la actividad de MNAzima usando ligandos como moléculas de activación, y/o (ii) un método de detección de dianas de ácido nucleico usando apta-MNAzimas. Los oligonucleótidos de ácido nucleico que se incluyen en este ejemplo de estrategia de detección de apta-MNAzima incluyen:

- a) Una partzima estándar;
- b) Un apta-partzima que es una partzima con un aptámero incorporado a uno de sus extremos;
- c) Un facilitador del ensamblaje que es un oligonucleótido que se une tanto al apta-partzima como al partzima, permitiendo el ensamblaje de una MNAzima activa;
- d) Un sustrato de marcador; y
- e) un oligonucleótido inhibitor del ensamblaje que se hibrida con el apta-partzima en un lugar que abarca por lo menos parte de la secuencia del aptámero y parte del brazo unido al sustrato de la secuencia de apta-partzima.

En ausencia de un ligando activador (panel lateral izquierdo), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une al apta-partzima, compitiendo así y bloqueando la unión del sustrato marcador. Cuando un ligando de un activador está presente (panel lateral derecho), se une a la secuencia del aptámero del apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido del inhibidor de ensamblaje y permitiendo, de esta forma, la unión y la división del sustrato marcador. De esa forma, las MNAzimas solo pueden formar y causar una generación de señal fluorescente en presencia de ligandos que puedan unir aptámeros. Este enfoque puede usarse para desarrollar interruptores moleculares que pueden activar y desactivar la actividad catalítica del sistema de MNA. De forma alternativa, también puede aplicarse a la detección de ligandos de diana tanto de ácidos nucleicos como no nucleicos.

Alguien con experiencia en la materia, también podrá apreciar que uno o más aptámeros podrían incorporarse a cualquiera de los componentes de oligonucleótido, entre ellos, pero no solo las partzimas, el facilitador de ensamblaje o el sustrato. Además, el aptámero podría incorporarse a cualquiera de los extremos de cualquiera de esos oligonucleótidos. En una de las representaciones el aptámero está unido al menos a uno de los brazos sensores de una partzima. En otra representación, el aptámero está unido a por lo menos uno de los brazos sensores de una partzima.

Figura 8: Un ejemplo de una cascada de división /ligación mediada por una ligasa de DNAzima y una MNAzima: Un oligonucleótido como el oligo 1/2 puede ser dividido por una MNAzima en productos de división oligo 1 y oligo 2, generando de esa forma como productos 2',3'-ciclo fosfato y 5'- hidroxilo, que pueden participar en una reacción ligante consecuencia de ésta. Una ligasa de DNAzima, por ejemplo 7Z81 (Prior *et al*, 2004) puede ligar un primer oligonucleótido (oligo 1) al segundo oligonucleótido (oligo 2) para crear un producto de ligado oligonucleótido con la misma secuencia nucleótida de oligo 1/2.

Figura 9. Ejemplos de estructuras para diseños de MNAzima y MNAi: En los paneles del A al D se muestran ejemplos de estructuras activas MNAzimas (estructuras en el lateral izquierdo). Todas estas estructuras son capaces de formar enzimas catalíticamente activas, que pueden dividir el sustrato (S). Se muestran ejemplos de estructuras MNAi en los Paneles de A a D (estructuras a la derecha de las MNAzimas activas). Estas estructuras MNAi contienen un inhibidor de la actividad (I), que se une a la localización que estaría ocupada por un facilitador del ensamblaje (F) en una MNAzima activa. La ilustración contiene modelos de MNAzimas, que incluyen un facilitador de ensamblaje F1 (panel A), dos facilitadores de ensamblaje F1 y F2 (paneles B y D) o tres facilitadores de ensamblaje F1, F2 y F3 (panel C). Los ejemplos de MNA, que se muestran en el panel A, incluyen brazos sensores con áreas auto complementarias dentro de los brazos sensores de la partzima. Las estructuras de MNA podrían incluir también uno o más brazos estabilizadores (sA), tal y como se muestra en el panel D. Las estructuras específicas de MNAzima y MNAi etiquetadas de A a H podrían entenderse mejor con referencia a los ejemplos del 7 al 10.

Figura 10: Un ejemplo de estrategia para cascada usando dos sustratos. En esta estrategia se forma el inicio de una MNAzima (Mt) en presencia de una diana (T). El inicio de MNAzima (Mt) divide un primer sustrato (S1) para crear un primer componente facilitador del activador de ensamblaje (S1f), que guía la formación de una primera MNAzima (MNAzima Mc1 en cascada). En este ejemplo, la primera MNAzima (Mc1) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje denominados F1, F2 y S1f. Mc1 puede dividir un sustrato adicional (S2) que de esa forma liberaría un componente adicional facilitador del ensamblaje (S2f), que guía la formación de una segunda MNAzima (MNAzima Mc2 en cascada). En este ejemplo, la segunda MNAzima (Mc2) comprende dos partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje denominados F3, F4 y S2f. Mc2 puede entonces dividir más del primer sustrato (S1), creando así más del primer componente activador del facilitador del ensamblaje (S1f). Esto lleva a la formación de otra primera MNAzima (Mc1) que por lo tanto formaría una cascada de amplificación.

Figura 11. Una cascada de amplificación de la señal que usa una MNAzima en inicio, una amplificación de cascada SCUD y una ligasa de DNAzima mediada por una lectura de la división de la MNAzima. La estrategia que se ilustra en esta figura tiene las siguientes características:

(i) Un ácido nucleico diana (F1) facilita la formación de una MNAzima inicial (MNAzima 1a) que divide un primer sustrato (sustrato A) y genera un primer producto de división (producto Aa) y un segundo producto de división (un facilitador de la activación del ensamblaje) (producto Ab), el primer producto de la división (producto Aa) es necesario como componente en el aspecto reactivo (ii) y el segundo producto de la división (producto Ab) es necesario como componente en el aspecto reactivo (iii).

(ii) El primer producto de la división (producto Aa) tiene un fosfato cíclico de 2', 3' en su término 3' y es adecuado para funcionar como sustrato para la DNAzima 2a, que tiene actividad de ligasa. La ligasa de DNAzima 2a liga el primer producto de división (producto Aa) a un segundo sustrato (sustrato B) para crear una partzima para una MNAzima adicional (MNAzima 4a).

(iii) El segundo producto de división (producto Ab) funciona como un componente activador facilitador del ensamblaje para guiar la formación de una segunda MNAzima (MNAzima 3a). La segunda MNAzima (MNAzima 3a) modifica también el primer sustrato (sustrato A) generando además un producto de la primera división (producto Aa) y un producto de la segunda división (producto Ab). El segundo producto de la división (producto Ab) entonces

guía la formación de la segunda MNAzima (MNAzima 3a). Esto tiene como resultado una reacción de cascada de amplificación autocatalítica de auto-réplica de SCUD. Esta cascada de SCUD tiene como resultado una mayor acumulación del segundo producto de la división (producto Ab) que funciona para unir más de la segunda MNAzima (MNAzima 3a), y esto tiene como resultado la acumulación de más producto de la primera división (producto Aa), que funciona como sustrato para la DNAzima 2a en su aspecto (ii).

(iv) La partzima ligada para la MNAzima adicional generada en el aspecto (ii) por vía del ligado del primer producto de la división (producto Aa) y el segundo sustrato (Sustrato B) forma una nueva partzima para la MNAzima adicional (MNAzima 4a). La MNAzima adicional (MNAzima 4a) forma, junto con el facilitador F4 y modifica el sustrato C entre un fluoróforo y un par de colorante quencher, lo que tiene como resultado un aumento de la señal fluorescente indicativa de la presencia de ácido nucleico diana F1.

Figura 12. Sumador completo molecular usando MNAzimas. Las tres entradas, FAC1, FAC2 y FAC3, se muestran en gris, las líneas eclosionadas denominadas "verde" y "azul" representan sustratos con diferentes fluoróforos y los oligo-nucleótidos C se representan en negro. Las partzimas también se representan en negro y and están pre-compuestas con los oligo-nucleótidos C y sustrato.

DEFINICIONES

[0039] Algunos de los términos que se utilizan en el presente documento deberán entenderse con los significados que se indican a continuación.

[0040] El término "comprender" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente solo". Además, las variantes de la palabra "comprender", como "comprenden" y "comprende" tienen los significados correspondientes también.

[0041] Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" pueden intercambiarse en el uso y se refieren a un polímero de cadena única o doble de base desoxirribonucleótida o ribonucleótida o sus análogos, derivados, fragmentos o combinaciones de ellos, incluido pero no limitado a ADN, ADN metilado, ADN alquilado, ARN, ARN metilado, micro ARN, siARN, shARN, mARN, tARN, snoARN, stARN, smARN, ARN pre y pri micro, otros ARN no codificados, ARN ribosómico, sus derivados, sus amplicones o cualquiera de sus combinaciones. A través de un ejemplo no limitativo, la fuente de un ácido nucleico puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sintéticos, mamíferos, humanos, plantas, hongos, bacterias, virus, arqueas o cualquiera de sus combinaciones.

[0042] Los términos "molécula de ácido nucleico catalítico", "ácido nucleico catalítico", "enzima de ácido nucleico" y "secuencia catalítica de ácido nucleico" se usan en este documento de forma intercambiable y significan una molécula de ADN o una molécula que contenga ADN (también conocida como "enzima ADN", "desoxirribosima" o "DNAzima") o una molécula de ARN o que contenga ARN (también conocido como "enzima ARN" o "ribosima") o una combinación de ellas, que es una molécula híbrida de ADN-ARN, que podría reconocer un sustrato y catalizar una modificación del sustrato. Los residuos del nucleótido que se encuentran en los ácidos nucleicos catalíticos podrían incluir las bases A, C, G, T y U, así como sus derivados y análogos.

[0043] Los términos "complejo de ácido nucleico con múltiples componentes", "ácido nucleico con múltiples componentes", "MNA," o "complejo MNA" se refieren a complejos que comprenden dos o más componentes seleccionados de entre el grupo que comprende, pero no se limita a partzimas, brazos estabilizadores, facilitadores de ensamblaje, sustratos y componentes moduladores entre los que se incluyen los inhibidores de la actividad, inhibidores de ensamblaje y otros componentes de los mismos. En algunos de los ejemplos, el complejo de MNA es una MNAzima activa. En otros ejemplos, el complejo MNA es un complejo inactivo, como un MNAi que puede comprender un MNAi al que también podría hacerse referencia aquí como una proenzima inactiva de ácido nucleico multi-componente (MNAi). En otro de los ejemplos, el complejo MNA podría carecer de uno o más de los componentes necesarios para el ensamblaje y catálisis de la MNAzima incluidos, pero sin limitarse a, un sustrato, un facilitador de ensamblaje, un brazo estabilizador y las partzimas u otros componentes derivados.

[0044] El término "MNAzima" usado en este documento hace referencia a dos o más secuencias de oligonucleótidos (por ejemplo, partzimas) que, solo en presencia del facilitador de ensamblaje de la MNAzima (por ejemplo, una diana), forma un complejo de enzima de ácido nucleico activo capaz de modificar catalíticamente un sustrato. Se muestra un ejemplo de MNAzima que comprende una partzima A y partzima B en la Figura 1. Con referencia en la Figura 1, las partzimas A y B cada una se une a un facilitador de ensamblaje (por ejemplo, a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick). La MNAzima solo se forma cuando el brazo sensor de las partzimas A y B se hibridan de forma adyacente una de la otra en el facilitador de ensamblaje. Los brazos de sustrato de la MNAzima captan el sustrato, cuya modificación (por ejemplo, división) se cataliza por el núcleo catalítico de la MNAzima, formado por la interacción de los dominios catalíticos de las partzimas A y B. La división del sustrato de un marcador químérico de ADN/ARN se muestra en un ejemplo en el dibujo. La MNAzima divide el sustrato entre un par de fluoróforo y de colorante quencher, generando una señal. Los términos "enzima de ácido nucleico multi-componente" y "MNAzima" se usan en este documento de forma intercambiable y comprenden estructuras bilaterales, compuestas de dos moléculas, o estructuras trilaterales, compuestas de tres moléculas de ácido

nucleico, o otras estructuras multilaterales, como aquellas formadas por cuatro o más moléculas de ácido nucleico.

[0045] Un ejemplo de una MNAzima que está compuesta de más de dos moléculas es la que figura ilustrada en la Figura 2(ii). Una partzima podría comprender múltiples componentes, incluidos pero sin limitarse a, un componente de partzima con un brazo sensor trucado y un componente de brazo estabilizador que estabiliza la estructura de MNAzima interactuando con un facilitador de ensamblaje (como se representa en la Figura 2(ii)) o con un sustrato.

[0046] El término "MNAi", usado en el presente documento, hace referencia a un complejo de MNA que está en un estado catalíticamente inactivo, donde la actividad catalítica está inhibida por un "inhibidor de la actividad" de la forma que se define en el presente documento. En los mejores ejemplos, el MNAi podría estar inactivo catalíticamente debido a la unión a un oligonucleótido inhibidor de la actividad, por ejemplo, tal y como se representa en la Figura 4, que muestra un ejemplo de diseño para una MNAi. Por ejemplo, una MNAi podría formarse cuando la partzima A, la partzima B, un facilitador de ensamblaje y un inhibidor de la actividad se asocian para formar un complejo inactivo. En la Figura 9 se ilustran más ejemplos de estructuras de MNAi.

[0047] Los términos "complejo catalíticamente inactivo de MNA", "complejo inactivo de MNA", "MNA inactivo catalíticamente" o "MNA inactivo" usados en este documento hacen referencia a complejos de ácido nucleico multicomponente que no se encuentran en un estado catalíticamente activo. En uno de los ejemplos, el "complejo inactivo de MNA" es una MNAi que podría ser inactiva catalíticamente debido a la unión a un oligonucleótido inhibidor de la actividad. En otro ejemplo, el "complejo de MNA inactivo" es un complejo de MNA parcialmente ensamblado o parcialmente des-ensamblado en el que uno o más de los componentes necesarios para la actividad catalítica de la MNAzima no están asociados con el complejo MNA. En otro ejemplo, la ausencia de uno o más de los componentes necesarios para la actividad de la MNAzima en el medio de la reacción, podría tener como resultado la formación de un "complejo inactivo de MNA". En otro de los ejemplos como en el microentorno, la temperatura podría no ser compatible con la asociación de todos los componentes necesarios para una MNAzima activa. En otro de los casos, un "complejo inactivo de MNA" podría contener todos los componentes necesarios para la formación estructural de una MNAzima activa, pero el "complejo inactivo de MNA" carece de actividad debido a la ausencia de uno o más de los ingredientes esenciales necesarios para la catálisis, como por ejemplo un catión divalente. En otro de los ejemplos, el complejo inactivo de MNA podría estar inactivo por causa de la presencia de un inhibidor del ensamblaje.

[0048] Los términos "interruptor molecular" o "interruptor" se usan en el presente documento para hacer referencia a cualquier complejo de MNA que pueda transitar de complejo inactivo a activo o viceversa, en respuesta a un suceso de entrada. En las representaciones preferidas, el complejo inactivo es un complejo catalíticamente inactivo. Los complejos catalíticamente inactivos podrían comprender un complejo desensamblado, un complejo parcialmente ensamblado, o complejos como un MNAi o un complejo asociado a un facilitador del ensamblaje. Los complejos activos catalíticamente podrían ser MNAzimas.

[0049] Los términos "molécula facilitadora del ensamblaje", "facilitador del ensamblaje", "molécula facilitadora del ensamblaje de MNAzima", "facilitador", "facilitador del ensamblaje de MNAzima" y "facilitador de la activación del ensamblaje" usados en este documento hacen referencia a entidades que pueden facilitar el auto-ensamblaje de componentes de partzima para formar una MNAzima activa catalíticamente a través de la interacción con los brazos sensores de la MNAzima. En las mejores representaciones, se necesita un facilitador del ensamblaje para el auto-ensamblaje de una MNAzima. En uno de los ejemplos, un facilitador del ensamblaje podría comprender de una (Figura 1) o más moléculas o componentes (Figura 2(i), Figuras 4-6 y 9-10) que podrían emparejarse con, o unirse a, los brazos sensores de una o más "partzimas" oligonucleótidas. Los facilitadores del ensamblaje también podrían asociarse con complejos de MNA que no están activos catalíticamente, incluidos, pero sin limitarse a, MNAi y complejos parcialmente ensamblados o desensamblados de MNA.

[0050] Los componentes de un complejo de MNA podrían comprender dominios que tienen funciones separadas de las del componente en conjunto. Por ejemplo, los dominios del facilitador del activador del ensamblaje pueden estar en el interior de otros componentes, por ejemplo en el interior de una molécula inhibidora de la actividad, donde están presentes en un estado en el que no pueden contribuir al ensamblaje activo de la MNAzima hasta que se liberen del componente, por ejemplo, a través de una división. Los términos "facilitador del activador de ensamblaje" o "componentes del facilitador del activador de ensamblaje" cuando se usan en este documento hacen referencia a entidades que, una vez se han liberado del interior de otro componente o administrado de forma exógena, pueden facilitar el auto-ensamblaje de los componentes de la partzima para formar una MNAzima catalíticamente activa por medio de la interacción con los brazos sensores de la MNAzima.

[0051] Los facilitadores del ensamblaje, como los facilitadores del activador del ensamblaje, pueden usarse para controlar el ensamblaje de las MNAzimas activas o facilitar la transición de complejos inactivos de ácido nucleico multi-componente a MNAzimas activas. Dichos complejos inactivos de ácido nucleico multicomponente pueden ser inactivos catalíticamente debido a la presencia, por ejemplo, de un inhibidor de la actividad como en la MNAi.

[0052] El término "activador" usado en el presente documento hace referencia a cualquier componente oligonucleótido de MNA estructural o modulador, cualquier "efector molecular", "ligando", "diana", o "evento" que

tiene como resultado la activación de MNAzimas. Los oligonucleótidos activadores incluyen, sin limitarse a, oligonucleótidos que actúan como facilitadores del ensamblaje, una partzima o uno de sus componentes, como por ejemplo los que tienen truncamientos del sensor o brazo del substrato y componentes del brazo estabilizador de la partzima.

5 **[0053]** En otros ejemplos, los activadores pueden activar las MNAzimas al retirar oligonucleótidos que ejercen un efecto inhibitor. Entre los ejemplos de oligonucleótidos que pueden activarse por medio de un mecanismo se incluyen oligonucleótidos de modulador que pueden desplazar (retirar) componentes inhibidores, incluidos pero sin limitarse a, un "inhibidor de la actividad" o un "inhibidor del ensamblaje".

10 **[0054]** En otros ejemplos, un "activador" podría ser un ligando que interactúa con un dominio de aptámero de un componente de complejo de MNA donde el resultado de la interacción es la activación del complejo de MNA.

15 **[0055]** En el presente documento, el término "brazo estabilizador" hace referencia a entidades que pueden interactuar con al menos un facilitador del ensamblaje en una ubicación adyacente a un brazo sensor de una partzima para permitir el ensamblaje de un complejo de MNA, incluyendo pero sin limitarse a una MNAzima activa.

20 **[0056]** El término "diana" se usa en este documento para hacer referencia a cualquier entidad natural o sintética, integrante o analito que se pretende detectar, identificar o cuantificar por medio de una MNAzima(s) concreta, con o sin un paso adicional de amplificación, incluido pero sin limitarse a, un protocolo de amplificación de MNAzima, por ejemplo, la reacción "Cascada de Señal con el Uso de ADN" o "SCUD". Las dianas, por lo tanto, abarcan la gama más amplia de entidades, componentes o analitos detectables para los que se prefieren métodos sensitivos de detección, identificación y/o cuantificación. Algunos ejemplos de dianas incluyen, pero sin limitarse a, proteínas, polipéptidos, ácido nucleico o péptido, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos completos, células, virus, bacterias, arqueas, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, pequeñas moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de los anteriores. También se contemplan otras dianas para su uso en el presente documento. Se entiende que la diana también puede ser un facilitador o activador del ensamblaje.

30 **[0057]** Cuando se utilizan en el presente documento, los términos "evento detectable", o "entrada" o "evento de entrada" incluyen un cambio en el microambiente del complejo de MNA, incluido pero sin limitarse a, las MNAzimas y/o los complejos inactivos de MNA. El cambio podría ser, por ejemplo, un cambio de temperatura, concentración salina, resistencia iónica, pH, presencia o ausencia de catión divalente, tipo o concentración, carga eléctrica, carga magnética, manipulación física y cambios en la concentración de componentes de MNA o modulador del micro ambiente, o cualquiera de las combinaciones entre los anteriores. También se entenderá que las referencias a un "cambio en la concentración de" incluye un aumento o disminución de la concentración y también incluye la aparición de una entidad previamente ausente o a una concentración indetectable en el micro ambiente del complejo de MNA, incluyendo MNAzimas y/o complejos inactivos de MNA como MNAi.

40 **[0058]** Las entidades que representan eventos detectables también pueden usarse como "activadores" o "inhibidores" de la actividad catalítica de las MNAzimas, ya que los cambios en el microambiente puede usarse para manipular la actividad catalítica de los complejos de MNA. De esa forma, estas entidades permiten la actividad catalítica de las MNAzimas para pasar a "activadas" o "desactivadas", por ejemplo al promover la transición de complejos inactivos de MNA a MNAzimas activas, o viceversa. En algunos ejemplos, la entidad promueve el ensamblaje y la activación de las MNAzimas. En algunos casos, el evento o entidad promueve el desensamblaje y la desactivación de MNAzimas. En otros ejemplos, el evento o entidad podría controlar el ensamblaje o desensamblaje de MNAi o otros complejos de MNA. En los mejores ejemplos, el proceso de activación y desactivación de la actividad catalítica de la MNAzima es reversible.

50 **[0059]** El término "inhibidor de la actividad" hace referencia a cualquier entidad que pueda unirse a uno o más componentes de un complejo de MNA y controlar el ensamblaje de "MNAi" catalíticamente inactivo (por ejemplo, las Figuras 4-6 y 9-11). La inhibición de actividad catalítica por parte del inhibidor de la actividad podría ser mediado por un "dominio inhibidor de la actividad", también denominado "componente inhibidor de la actividad", "dominio inhibidor", o "dominio inhibidor de la actividad" que es sustancialmente no complementario a las partzimas. En los mejores ejemplos, un inhibidor de la actividad puede comprender varios dominios funcionales diferenciados. Por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a, los dominios funcionales en cualquier combinación seleccionados de un dominio inhibidor de la actividad, un dominio facilitador del activador del ensamblaje, un dominio de substrato, y/o un dominio marcador. Dichos dominios funcionales diferenciados podrían coincidir o no coincidir con varios dominios estructurales diferenciados en un inhibidor de la actividad. De acuerdo con esto, en algunos ejemplos, un inhibidor de la actividad podría comprender un dominio inhibidor de la actividad que es sustancialmente no complementario de los componentes de la partzima y que ejerce un efecto inhibitorio al alterar la estructura secundaria necesaria para la formación de una MNAzima catalíticamente activa. La presencia de un inhibidor de la actividad impulsa el ensamblaje de los complejos de MNAi capaces de interactuar con un substrato, pero sin modificarlo catalíticamente. En algunos ejemplos, un inhibidor de la actividad podría comprender un dominio facilitador del ensamblaje.

65 **[0060]** En algunos ejemplos, el inhibidor de la actividad podría incluir también un ligador o substrato lábil o divisible,

que podría por ejemplo estar ubicado entre dos o más dominios en el interior del inhibidor de la actividad, por ejemplo un dominio inhibidor de la actividad y un dominio facilitador del activador de ensamblaje. La división en el sustrato o en la ubicación de ligado podría permitir la separación de un dominio inhibidor de la actividad desde un dominio facilitador del activador de ensamblaje, que podría entonces funcionar como componente facilitador de ensamblaje y de esa forma impulsar el ensamblaje de una MNAzima activa.

[0061] En algunos ejemplos, el inhibidor de la actividad podría conjugarse con otras entidades. En algunos ejemplos, el inhibidor de la actividad se conjuga con una nanopartícula de oro acoplada a un campo magnético de radio-frecuencia para permitir el control remoto electrónico de la hibridación. En este enfoque, los campos magnéticos de radio-frecuencia funcionan como antenas permitiendo la desnaturalización termal reversible de oligonucleótidos específicos, al mismo tiempo que permiten que las moléculas circundantes no se vean afectadas, relativamente. En algunos ejemplos, el inhibidor de la actividad puede marcarse con biotina para facilitar la captura y el aislamiento físico del inhibidor de la actividad.

[0062] En el presente documento, un "inhibidor del ensamblaje" es un componente que inhibe el ensamblaje del complejo de MNAzima uniéndose de forma complementaria a un componente esencial del complejo activo de MNAzima, por ejemplo uniéndose a un componente de la partzima o a un facilitador del ensamblaje o un sustrato. La unión de la secuencia de inhibidor del ensamblaje con un primer componente del complejo de MNAzima lleva a una competencia entre el inhibidor del ensamblaje y dicho primer componente por la unión a un segundo componente de complejo de MNAzima. Por ejemplo, el inhibidor de ensamblaje podría unirse bien a un brazo de sustrato de partzima (que une el sustrato) o a un brazo sensor de partzima (que une el facilitador de ensamblaje). Cuando el inhibidor de ensamblaje es complementario a (y unido a él) el brazo de sustrato, compite con (y bloquea) la unión del sustrato a la partzima (Figura 7). Cuando el inhibidor de ensamblaje es complementario (y unido) al brazo sensor, compite con (y bloquea) la unión del facilitador de ensamblaje a la partzima. De esta forma, un inhibidor de ensamblaje bloquea el ensamblaje de los complejos de MNAzima. La molécula inhibidora del ensamblaje puede usarse para controlar el ensamblaje de las MNAzimas, y además permite el desarrollo de estrategias para la detección de analitos diana de ácido tanto nucleico como no nucleico.

[0063] Los términos "sustrato", "molécula de sustrato" y "sustrato químico" usados en el presente documento incluyen cualquier molécula capaz de ser reconocida, puesta en funcionamiento o modificada químicamente por una molécula como un complejo de MNA. La modificación del sustrato proporciona la señal de "salida" o el "efecto detectable" para monitorizar la actividad de los sistemas de MNA. En ciertos ejemplos, un sustrato puede ser reconocido y modificado por una enzima. En otros ejemplos, un sustrato puede ser reconocido y modificado por una molécula de ácido nucleico catalítico. En los mejores ejemplos, un sustrato puede ser reconocido y modificado por una MNAzima. La modificación química de un sustrato puede medirse por la aparición de, o aumento en, un producto de la reacción de modificación, o por la desaparición de, o descenso en, un sustrato de la reacción (o reacciones) de la modificación.

[0064] Un "sustrato marcador", "sonda marcadora" o "oligonucleótido marcador" tal y como se usan en el presente documento es un sustrato que se adapta de forma particular para facilitar la medición de la desaparición de un sustrato o la aparición de un producto en conexión con una reacción catalizada. Los sustratos marcadores pueden estar libres e una solución o unidos (o "fijados"), por ejemplo, a una superficie, o a otra molécula. Un sustrato marcador puede estar marcado por cualquiera de entre una gran variedad de medios, entre los que se incluyen, por ejemplo, los fluoróforos (con o sin un o más componentes adicionales, como los quenchers), marcadores radioactivos, biotina (por ejemplo, biotilación) o marcadores quimiluminescentes.

[0065] Cuando se haga referencia a ellos en este documento, los sustratos "genérico" o "universal" son sustratos, por sustratos marcadores, que son reconocidos por y accionados catalíticamente por un conjunto de MNAzimas, cada una de las cuales puede reconocer un facilitador de ensamblaje diferente. El uso de dichos sustratos facilita el desarrollo de experimentos separados para la detección, identificación o cuantificación de una amplia variedad de facilitadores de ensamblaje que usan MNAzimas relacionadas estructuralmente, cada una de las cuales reconoce un sustrato universal. Estos sustratos universales pueden estar cada uno de ellos marcado de forma independiente con una o más etiquetas. En los mejores ejemplos, se usan etiquetas detectables de forma independiente para marcar uno o más sustratos genéricos para permitir la creación de un sistema conveniente para detectar de forma independiente o simultánea una gran variedad de facilitadores de ensamblaje usando MNAzimas. En algunos ejemplos, los sustratos divididos por MNAzimas pueden reconstituirse, y por lo tanto reciclarse, usando una ligasa de DNAzima.

[0066] El término "modulador" usado en el presente documento es una entidad que puede aumentar o disminuir la actividad catalítica de un sistema de MNA. Los moduladores pueden ser "activadores", que activan o accionan la actividad de una MNAzima. En algunos ejemplos, los moduladores son "inhibidores", que incluyen pero no se limitan a, "inhibidores de ensamblaje" o "inhibidores de actividad".

[0067] El término "aptámero", usado en el presente documento, 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 mayor nivel del aptámero, como un dominio o bolsa con una unión de 3

dimensiones. Los aptámeros, por lo tanto, pueden unir proteína, polipéptido, ácido péptido o nucleico, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos completos, pequeñas moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinación de las anteriores, o cualquier otra entidad. Los aptámeros preferibles pueden comprender oligómeros de ADN o ARN de única cadena que pueden aislarse de conjuntos complejos de ácido nucleico sintético a través de un proceso iterativo de adsorción, recuperación y repetición de la amplificación. Por lo tanto, los aptámeros podrían generarse contra casi cualquier diana, en una gama que va desde pequeñas moléculas como aminoácidos o antibióticos hasta estructuras de proteína o de ácido nucleico. En este invento, los aptámeros se usan para construir interruptores moleculares en sistemas de MNA que contienen inhibidores de ensamblaje. La presencia de un ligando de activación puede activar la actividad de la MNAzima (Figura 7, lateral derecho) y la retirada o ausencia de un ligando activador puede desactivar la actividad de una MNAzima (Figura 7, lateral izquierdo). Además, en el presente invento los aptámeros también se utilizan para facilitar la detección de ligandos de ácido nucleico y no nucleico. La detección de un ligando también puede usarse para activar una cascada de amplificación, incluyendo pero sin limitarse a una cascada de ampliación de SCUD.

[0068] En este documento, los términos "partzima", "partzima de componente", "componente de partzima" y "oligonucleótido de componente" hacen referencia a un oligonucleótido que contiene ADN o ARN o ADN-ARN, dos o más de los cuales, solo en presencia de un facilitador de ensamblaje de una MNAzima de la forma en que se define en este documento, pueden formar conjuntamente una "MNAzima." En ciertos de los mejores ejemplos, una o más de las partzimas de componente, y preferentemente como mínimo dos, pueden comprender tres regiones o dominios: un dominio "catalítico", que forma parte del núcleo catalítico que cataliza una modificación química; un dominio de "brazo sensor", que podría asociarse con y/o unir un facilitador de ensamblaje; y un dominio de "brazo de sustrato", que podría asociarse con y/o unirse a un sustrato. Se muestra un ejemplo de diseño de estas áreas o dominios en la Figura 1. Las partzimas pueden comprender como mínimo un componente adicional incluyendo, pero sin limitarse a, lo que se hace referencia en este documento como "apta-partzima".

[0069] El término "sumador completo" utilizado en este documento hace referencia a un elemento lógico que lleva a cabo una operación sobre tres entradas binarias para producir dos salidas binarias únicas. Las operaciones de sumador completo siguen las siguientes reglas: i) La presencia de cualquiera y exactamente una entrada produce solo una primera salida; ii) la presencia de cualquiera y exactamente dos entradas produce solo una segunda salida; iii) la presencia de exactamente todas las tres entradas produce tanto la primera como la segunda salida y; iv) la ausencia las tres entradas no produce ninguna salida.

[0070] Utilizado en el presente documento, el término "cascada" hace referencia a cualquier sucesión de procesos u operaciones que se dan en fase sucesivas, donde la sucesión de cada fase depende normalmente de la sucesión de una fase precedente. Una cascada, por lo tanto, puede incluir, entre otros, una cascada enzimática o cualquier otra cascada de transducción de señal. En algunos ejemplos, una cascada puede comprender la amplificación de una señal como resultado de la actividad catalítica de una MNAzima. En los mejores ejemplos, una cascada de amplificación puede implicar la amplificación repetida y por lo tanto cíclica de una señal, donde la actividad catalítica de una primera MNAzima pone a disposición una molécula necesaria para la actividad catalítica de una segunda MNAzima, lo que a su vez pone a disposición un activador necesario para la actividad catalítica de una segunda MNAzima adicional. En algunos ejemplos, el activador necesario puede comprender una partzima, una enzima, un facilitador del ensamblaje, un sustrato, una diana, una porción o fragmento de los elementos o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, una cascada podría por lo tanto implicar la producción de un efecto acumulativo y de esa forma detectar una diana de bajo nivel de abundancia a través de la generación de una señal de un nivel que la haga detectable. En otros ejemplos, podrían usarse más de dos fases catalíticas. La cascada podría ser lineal. En uno de los mejores ejemplos, la cascada podría ser exponencial. En los mejores ejemplos, la cascada podría implicar la activación de una MNAi a través de la retirada de la influencia de un inhibidor de la actividad. En algunos ejemplos, los componentes de complejos MNA podrían crearse a través de la división de otros componentes complejos MNA. En algunos ejemplos, los componentes de complejos MNA podrían crearse a través de ligando otros componentes de complejos MNA, como por ejemplo usando una ligasa DNAzima.

[0071] El término "oligonucleótido" normalmente designa 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 los mismos. Algunos ejemplos de oligonucleótidos incluyen las dianas de ácido nucleico; sustratos, como por ejemplo, los que pueden ser modificados por una MNAzima o DNAzima; cebadores como los que se utilizan para la amplificación de diana *in vitro* por métodos como el PCR; y compuestos de complejos de MNA. Los complejos de MNA incluyen, pero sin limitarse a los facilitadores de ensamblaje, inhibidores de ensamblaje, inhibidores de actividad, estabilizadores de brazo y/o sustratos, en ciertos ejemplos, podrían incluir oligonucleótidos de acuerdo con nuestra definición. Las partzimas definidas en este documento podrían también comprender oligonucleótidos.

[0072] Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" incluyen referencias a cualquier secuencia especificada, así como a la secuencia complementaria a ella, a no ser que se indique lo contrario. Los oligonucleótidos pueden comprender como mínimo una adición o sustitución, incluyendo pero sin limitarse al grupo que comprende 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxilma-til)uridina, 2'-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil tiouridina,

5 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-met-oxiaminometil-2-tiouridina, beta D-mannosilmetiluridina, 5-
metoxycarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-
metilthiopurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metil-carbamoil)threonina, uridina-5-
oxiacetic metiléster ácido, ácido oxiacético uridina-5 (v), wibutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-thiocytidina, 5-
metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-met-yluridina, N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina,
10 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wibutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, uridina beta D-arabinosil,
timidina beta D-arabinosil.

15 **[0073]** El término "derivativo" cuando se usa en relación con un ácido nucleico o nucleótido incluye cualquier ácido nucleico o nucleótido equivalente, incluida cualquier molécula de fusión producida íntegramente (por ejemplo, por métodos recombinantes) o post-síntesis añadida (por ejemplo, por medios químicos). Dichas fusiones pueden comprender oligonucleótidos con ARN o ADN añadidos a los presentes o combinados con un polipéptido (por ejemplo, puromiocina u otro polipéptido), una pequeña molécula (por ejemplo, psoraleno) o un anticuerpo.

20 **[0074]** El término "análogo", cuando se usa en relación con un ácido nucleico o nucleótido, incluye un compuesto que tiene una estructura física relacionada con una molécula o residuo de ADN o ARN, y puede tener la capacidad de formar una unión de hidrógeno con un residuo de ADN o ARN o análogos (por ejemplo, tiene la capacidad de unirse con un residuo de ADN o ARN o un análogo de los anteriores para formar un par de base), pero dicha unión no es necesaria para que dicho compuesto entre en la definición del término "análogo". Dichos análogos pueden poseer diferentes propiedades químicas y biológicas para el residuo de ribonucleótido o desoxirribonucleótido con cuya estructura se relacionan. Los residuos metilados, iodizados, bromados o biotinados son algunos ejemplos de análogos. Se han descrito DNazimas activas que contienen análogos nucleótidos, entre los que se incluye desoxinosina, C-5-imidazola desoxiuridina, 3-(aminopropinil)-7-deaza-dATP, 2'-O-metil RNA, 2' O-metil (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 las DNazimas. La modificación de una secuencia catalítica de ácido nucleico, por ejemplo a través de la sustitución de una base por otra, por la sustitución de un análogo por una base o la modificación del componente de azúcar o núcleo de fosfodiéster, pueden ser muy sencillas para un experto en la materia. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones durante la síntesis, o a través de la modificación de bases específicas después de la síntesis. Las pruebas empíricas de ácidos nucleicos catalíticos que incorporan modificaciones como cambios de base o análogos de base permite la evaluación del impacto de las secuencias modificadas, o análogos específicos, en la actividad catalítica. Los análogos de las bases A, C, G, T y U son conocidos en este ámbito, y en la Tabla 1 se relaciona un subgrupo.

Tabla 1: Ejemplos de análogos de nucleótidos útiles para el invento

Abreviatura	Nombre
ac4c	4-acetilcitidina
chm5u	5-(carboxihidroxi)metiluridina
Cm	2'-O-metilcitidina
Cmm5s2u	5-carboximetilaminometil tiouridina
D	Dihidrouridina
Fm	2'-O-metilpseudouridina
Galq	beta, D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metilguanosa
I	Inosina
i6a	N6-isopenteniladenosina
m1a	1-metiladenosina
m1f	1-metilpseudouridina
m1g	1-metilguanosa
m1i	1-metilinosina
m22g	2,2-dimetilguanosa
m2a	2-metiladenosina
m2g	2-metilguanosa
m3c	3-metilcitidina
m5c	5-metilcitidina
m6a	N6-metiladenosina
m7g	7-metilguanosa
mam5u	5-metilaminometiluridina

(continuación)

Abreviatura	Nombre
5 mam5s2u	5-metoxiaminometil-2-tiouridina
Manq	beta, D-mannosilmetiluridina
mcm5s2u	5-metoxicarbonilmetiluridina
Mo5u	5-metoxiuridina
10 Ms2i6a	2-metiltio-N6-isopenteniladenosina
Ms2t6a	N-((9-beta-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il)carbamoil)treonina
Mt6a	N-((9-beta-ribofuranosilpurina-6-il)N-metil-carbamoil)treonina
Mv	Uridina-5- metiléster ácido oxiacético
o5u	Uridina-5- ácido oxiacético(v)
15 Osyw	Wibutoxosina
P	Pseudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocytidina
20 s2t	5-metil-2-tiouridina
s2u	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metiluridina
25 t6a	N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina
tm	2'-O-metil-5-metiluridina
Um	2'-O-metiluridina
Yw	Wibutosina
30 X	3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, (acp3)u
AraU	beta D-arabinosiluridina
AraT	beta D-arabinosiltimidina

35 **[0075]** El término "exigencia" utilizado en el presente documento hace referencia a las condiciones bajo las que dos ácidos nucleicos pueden hibridarse y pueden incluir, por ejemplo, la concentración de sales y/o detergentes en una solución, la temperatura de una solución que se usa durante la hibridación de los dos ácidos nucleicos y el período de tiempo de la hibridación. En consecuencia, el término "alto nivel de exigencia" usado en el presente documento se refiere a las condiciones en una solución que conducen a la hibridación de dos ácidos nucleicos solo cuando dichos ácidos nucleicos comparten un alto grado de complementariedad. El grado de complementariedad puede incluir, pero no se limita a, una gama de entre el 50% y el 100%. De esa forma, las condiciones "alto nivel de exigencia" pueden implicar, pero no se limitan a, el uso de una temperatura variable y un regulador que comprende varias concentraciones de detergentes, sales y cationes divalentes.

45 **[0076]** Las siguientes abreviaturas se usan en el siguiente documento y en las especificaciones:

MNA: ácido nucleico multi-componente, o ácido nucleico multilateral;
 Complejo de MNA: complejo multi-componente de ácido nucleico, o complejo de ácido nucleico multilateral;
 MNAzima: enzima de ácido nucleico multi-componente, o enzima de ácido nucleico multilateral;
 MNAi: complejo de proenzima inactiva de ácido nucleico multi-componente, o complejo de proenzima multilateral inactiva de ácido nucleico;
 DNAzima: enzima de ácido desoxirribonucleico;
 PCR: reacción en cadena de polimerasa;
 LCR: reacción en cadena de ligasa;
 LNA: ácido nucleico bloqueado;
 55 PNA: ácido nucleico péptido;
 An: analitos o diana;
 F: fluoróforo;
 Q: quencher
 FAM o 6-FAM: 6-Carboxifluorescente.
 60 BHQ1: Quencher de agujero negro 1
 BHQ2: Quencher de agujero negro 2
 shRNA: ARN corto de horquilla
 siRNA: ARN corto interferente
 mRNA: ARN mensajero
 65 tRNA: ARN de transferencia
 snoRNA: ARN nucleolar pequeño

- 5 *stRNA*: ARN temporal pequeño
smRNA: ARN pequeño modulador
pre-microRNA: microARN precursor
pri-microRNA: microARN primario
SCUD: Cascada de señal con uso de ADN
TASC: auto división con asistente para diana
RIF: Marcador-Inhibidor-Facilitador
Ri: dominio Marcador-Inhibidor
10 *GTP*: guanosina 5'-trifosfato
CTP: citosina 5'-trifosfato
dATP: desoxiadenosina 5'-trifosfato
ATP: adenosina 5'-trifosfato
LP: producto de ligado
15 *CP*: producto de división
oligo: oligonucleótido

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DISEÑOS DESCRIPTIVOS

20 **[0077]** Debe entenderse que las figuras y ejemplos que se proporcionan son para dar ejemplos y no para limitar el invento y sus diversas representaciones.

25 **[0078]** De acuerdo con el presente invento, las composiciones, métodos y kits se proporcionan para la modulación de complejos de MNA. Los métodos generalmente comprenden el uso de composiciones que comprenden complejos de ácido nucleico multi-componente o multilateral, que preferentemente están conformados por componentes múltiples de ácido nucleico que se auto ensamblan para formar complejos de ácido nucleico catalíticamente activos o inactivos en presencia de un facilitador del ensamblaje.

30 **[0079]** De acuerdo con el presente invento, una alternativa a unir la detección de MNAzima con la amplificación de diana (por ejemplo, el PCR) es combinarlo con la amplificación de señal, preferiblemente usando solo enzimas de ácido nucleico. Dichas reacciones de cascada de señal podrían reemplazar las tecnologías de amplificación de diana, como el PCR. Además, pueden desarrollarse protocolos para el diagnóstico que no necesiten ninguna enzima de proteínas y por lo tanto sean más baratos y tengan un período de conservación mayor.

35 **[0080]** De acuerdo con el presente invento, se han concebido varias estrategias para las cascadas de señal, que usan MNAzimas, más o menos DNAzimas.

1. Composición – complejos de MNAzimas y MNA inactiva

40 **[0081]** Las enzimas de ácido nucleico Multi-componente (también se hace referencia a ellas en este documento como enzimas multilaterales de ácido nucleico o "MNAzimas") se describen en detalle en la solicitud internacional WO 2007/041774. Tal y como se define en el presente documento, las MNAzimas son un tipo de complejo MNA. Las MNAzimas son capaces de auto-ensamblarse a partir de dos o más componentes de oligonucleótidos, a los que también se hace denomina partzimas. Los oligonucleótidos de partzimas se auto ensamblan en presencia de un facilitador del ensamblaje para formar un complejo de MNA. Las MNAzimas con complejos de MNA activos catalíticamente. En algunos ejemplos, la presencia de una MNAzima puede detectarse, y es indicativa de la presencia de una diana, porque la MNAzima se forma solo en presencia de la diana, donde la diana comprende el facilitador del ensamblaje. En el presente documento se proporciona una amplia variedad de ensayos basados en los principios básicos señalados anteriormente. También se proporcionan en este documento los compuestos que comprenden oligonucleótidos capaces de formar MNAzimas y las MNAzimas de varias secuencias. En algunos ejemplos, por lo menos uno de los componentes de de oligonucleótidos, el facilitador del ensamblaje o el sustrato pueden comprender un aptámero que sea capaz de unirse a un activador o diana.

55 **[0082]** En la Figura 1 se muestra un ejemplo de diseño de una MNAzima. La molécula facilitadora del ensamblaje proporciona la señal de "entrada" que guía el ensamblaje de los componentes de la partzima de una forma altamente específica que está sujeta a modulación. En algunos ejemplos, el facilitador del ensamblaje puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de diana presente en una muestra de prueba. En otro ejemplo, el facilitador de ensamblaje podría ser, por ejemplo, un oligonucleótido sintético incluido en el medio para guiar el auto-ensamblaje de los componentes de la partzima en presencia de una entidad o evento detectable. La modificación del sustrato por parte de la MNAzima ensamblada puede proporcionar una señal de "salida" que podría detectarse y/o cuantificarse. Únicamente a modo de ejemplo, cuando el sustrato está doblemente marcado con un fluoróforo (F) y un quencher (Q), la división del sustrato por parte de una MNAzima activa separa el fluoróforo y el quencher teniendo como resultado un aumento inherente en la fluorescencia.

65 **[0083]** Las MNAzimas tal y como se han descrito anteriormente se contemplaron para la detección, identificación y cuantificación de analitos diana. La presentación actual describe nuevos métodos, composiciones y aplicaciones de los complejos de MNA. Este invento describe nuevas composiciones que proporcionan componentes de

oligonucleótidos que pueden usarse para manipular la actividad de las MNAzimas formando estructuras alternativas que carecen de actividad catalítica como complejos desensamblados o ensamblados parcialmente. El presente invento también describe complejos de MNA inactivo como MNAl, que comprenden componentes de oligonucleótidos, que podrían ensamblarse MNAzimas activas en las condiciones adecuadas, pero que cuando se ensamblan con un "inhibidor de la actividad" tienen como resultado la formación de complejos que son inactivos catalíticamente. Dichos complejos de MNA inactivos se definen en este documento como "MNAl", y dicha inactividad puede ser producto de una influencia inhibitoria por parte de un inhibidor de la actividad. El MNAl puede interactuar con el sustrato a través de los brazos de sustrato de los componentes de partzima, pero no puede modificar el sustrato catalíticamente.

[0084] El inhibidor de la actividad puede también comprender como mínimo un dominio facilitador del ensamblaje, un dominio inhibidor de la actividad, un dominio marcador, un dominio de sustrato o cualquier combinación de ellos. El inhibidor de la actividad podría comprender un dominio facilitador del activador del ensamblaje y un dominio inhibidor de la actividad. El inhibidor de la actividad puede comprender un dominio facilitador del activador del ensamblaje, un dominio inhibidor de la actividad y un dominio marcador. Por lo menos dos elementos entre el dominio inhibidor de la actividad, el dominio facilitador de activador del ensamblaje, el dominio de sustrato y el dominio marcador pueden estar ubicados en dominios distintos del inhibidor de la actividad. Por lo menos dos elementos de entre el dominio inhibidor de la actividad, el dominio facilitador del activador del ensamblaje y el dominio marcador pueden estar unidos por un ligador lábil o sustrato divisible.

[0085] El inhibidor de la actividad puede comprender una secuencia de nucleótido sustancialmente no complementaria de al menos un componente de MNA, incluyendo las partzimas.

[0086] El sustrato puede comprender como mínimo un dominio facilitador del activador del ensamblaje, un dominio inhibidor de la actividad y un dominio marcador, o cualquier combinación de ellos.

[0087] El inhibidor de la actividad podría también comprender por lo menos un inhibidor del ensamblaje.

[0088] El dominio facilitador del ensamblaje podría ser un dominio facilitador del activador del ensamblaje. El inhibidor de la actividad también podría comprender un dominio facilitador del activador del ensamblaje y un dominio inhibidor de la actividad. Ilustramos esta posibilidad por medio del inhibidor de la actividad que se muestra en la Figura 4. El inhibidor de la actividad puede comprender un dominio facilitador del activador del ensamblaje, un dominio inhibidor de la actividad y un dominio marcador, por ejemplo, la molécula RIF que se ilustra en la Figura 6. En el caso de la molécula RIF, por lo menos dos elementos entre el dominio inhibidor de la actividad, el dominio facilitador activador del ensamblaje y el dominio marcador pueden estar ubicados en dominios independientes del inhibidor de la actividad.

[0089] Con referencia a la molécula RIF que se muestra en la Figura 6, por lo menos dos elementos entre el dominio inhibidor de la actividad, el dominio facilitador activador del ensamblaje y el dominio marcador están unidos por un ligador lábil o por sustrato divisible.

[0090] El invento también revela que la inhibición de la actividad catalítica puede retirarse cuando se de un evento concreto, como por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a, la presencia de un activador como un facilitador del ensamblaje definido en este documento, o un cambio en parámetros como por ejemplo, pero sin limitarse a, cambios en la temperatura, longitud de la onda, presión, concentración de sal, detergente, cationes o cualquier otro parámetro. Además, los componentes de MNA, incluido por ejemplo un inhibidor de la actividad, podría incorporar entidades adicionales para facilitar la retirada por medios físicos que podría incluir, entre otros, ácidos nucleicos unidos, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácido nucleico, grupos de biotina, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos péptidos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido péptido-nucleico, fracciones de radio frecuencia o cualquier combinación de los anteriores. Un complejo de MNA catalíticamente inactivo representa un estado "desactivado", mientras que la MNAzima catalíticamente activa representa un estado "activo".

[0091] Un activador podría inducir el estado activo de forma directa o indirecta. Por ejemplo, la inducción directa del estado activo podría darse cuando un componente facilitador del ensamblaje (activador) interactúa con las partzimas. Por ejemplo, la inducción indirecta del estado activo de MNAzima podría darse a través de la acción o acciones de uno o más intermediarios, como cuando un activador comprende o consiste de un agente que actúa sobre un inhibidor para provocar la retirada de un inhibidor de la actividad, como por la liberación de un dominio inhibidor de un inhibidor de la actividad consistente en un dominio inhibidor y un dominio facilitador del ensamblaje. En otras representaciones prácticas, el activador retira el inhibidor de la actividad.

[0092] En los mejores ejemplos, los complejos de MNA, incluidas las MNAzimas y los complejos de MNA inactivo se basan en una o más DNAzimas y/o ribozimas. Otros componentes de partzima preferibles para complejos de MNAzima y MNA inactiva se basan en una estructura concreta de DNAzima. Las estructuras preferibles en la actualidad se basan en DNAzimas, incluidas las DNAzimas 10:23 y 8:17 DNAzimas. En varias representaciones, las MNAzimas y los complejos de MNA inactiva comprenden, una de las dos o ambas, las bases de ribonucleótido y

desoxirribonucleótido. En otros de los ejemplos más indicados, los complejos de MNA, incluido el de MNAzima y los complejos de MNA inactiva se basan, por lo menos en parte, en la estructura de una DNAzima. En otros ejemplos, los complejos de MNA, incluidas las MNAzimas y los complejos de MNA inactiva comprenden por lo menos algunas bases de desoxirribonucleótidos o análogos. En otros ejemplos, las porciones de núcleo catalítico de las partzimas ensambladas en una MNAzima y/o complejos de MNA inactiva comprenden una o más bases de desoxirribonucleótido o sus análogos. En otros de los mejores ejemplos, una o más bases desoxirribonucleótidas o sus análogos están implicadas en la catálisis de un sustrato por parte de una MNAzima. En otras representaciones, por lo menos una base desoxirribonucleótida, o sus análogos, en el núcleo catalítico promueve la actividad catalítica de una MNAzima. Todavía en otras representaciones, existe el requisito estricto de cómo mínimo una base desoxirribonucleótida o sus análogos, en el núcleo catalítico de la MNAzima para que la catálisis se dé a tasas medibles, en relación con la de una MNAzima comparable sin que tenga presente la base desoxirribonucleótida, una vez que el efecto inhibitor de un inhibidor de la actividad se ha retirado.

[0093] Tal y como se indica en el presente documento, los complejos de MNA, incluidas las MNAzimas y los complejos inactivos de MNA podrían contener una o más sustitutos como bases análogas, derivadas, modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones del azúcar o del núcleo de fosfato, varias eliminaciones, inserciones, sustituciones, duplicados u otras modificaciones o cualquier combinación de ellas, bien conocidas para los expertos en la materia. Dichas modificaciones, sustituciones, eliminaciones, inserciones, etc podrían hacerse en el brazo sensor y/o de sustrato y/o en las porciones del núcleo catalítico, tal y como se muestra en el presente documento, de forma que la molécula retenga la actividad catalítica. Las sustituciones y modificaciones de los brazos que unen el sustrato o el facilitador de ensamblaje podrían tolerarse aceptablemente y, de hecho, son la base que permite 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 de sustrato permitirán la adaptación a diferentes sustratos. El análisis de múltiples sustratos genéricos permite la supervisión simultánea de múltiples señales de "salida".

[0094] En determinadas de las representaciones más adecuadas, el invento contempla las MNAzimas con actividad catalítica que comprenden de desoxirribonucleótidos o que se derivan de dichas moléculas por determinadas modificaciones/ sustituciones, etc. Como norma general, la sustitución de la molécula completa por, por ejemplo, ribonucleótidos, hará que la molécula quede inactiva porque depende para su actividad de determinados desoxirribonucleótidos clave. Correspondientemente, algunos ribonucleótidos en una ribozima podrían sustituirse con desoxirribonucleótidos pero la sustitución de la molécula completa por, por ejemplo, desoxirribonucleótidos, dejará a la molécula inactiva.

[0095] El experto apreciará que los complejos de MNA, incluidas las MNAzimas y los complejos de MNA inactivo comprenden o desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o incluso ambos. Estas MNAzimas y los complejos de MNA inactivo que comprenden como mínimo uno y más preferiblemente, todos, en el presente se prefieren los oligonucleótidos con componente desoxirribonucleótido. También se prefieren las MNAzimas y las MNAs inactivas que comprenden como mínimo una base desoxirribonucleótida o sus análogos, en el interior de cómo mínimo uno de los núcleos catalíticos parciales de las partzimas que comprenden la MNAzima y/o los complejos de MNA inactivo. Se prefieren incluso más las representaciones donde dicha base se necesita para la actividad catalítica de una MNAzima.

[0096] En alguna de las representaciones preferidas, por lo menos un componente de un complejo de MNA podría comprender un área de auto-complementariedad que bajo ciertas condiciones podría formar una estructura en horquilla. En una de las representaciones, podría haber un área de auto complementariedad situada en uno o los dos brazos sensores. En otra representación, el área de auto complementariedad podría estar situada en uno de los brazos de sustrato o ambos. En otra representación, podría haber presentes un área o áreas de auto complementariedad en un facilitador de ensamblaje, un inhibidor de ensamblaje o un componente inhibidor de la actividad o cualquier combinación de los anteriores. En otras representaciones, los complejos de MNA podrían unir sustratos que contengan áreas de auto complementariedad.

[0097] El experto en la materia también apreciará que las DNAzimas multilaterales tienen ventajas a respecto de las ribozimas multilaterales, por ejemplo a respecto de la estabilidad y facilidad de uso. También se puede apreciar que en ciertas representaciones, las MNAzimas ofrecen ventajas sobre las enzimas de ácido nucleico uni-moleculares, por ejemplo las DNAzimas, que solo pueden reconocer un sustrato, mientras que una MNAzima única (y/o un complejo de MNA inactivo) puede reconocer dos moléculas, concretamente un facilitador del ensamblaje y un sustrato. Por ejemplo, estas propiedades de las MNAzimas hacen que sean adaptables para sistemas que necesitan que los componentes puedan "leer" una señal de "entrada" y "escribir" una señal de "salida", por ejemplo en sistemas que emplean puertas lógicas. Esta propiedad de las MNAzimas proporciona la capacidad de transducir información, por ejemplo, para recibir una señal de entrada y dar una señal de salida apropiada.

2. Métodos para regular la actividad catalítica de los complejos de MNA y aplicaciones para su uso.

[0098] El ensamblaje y desensamblaje de complejos de MNA puede controlarse cambiando el micro ambiente. Entre los ejemplos de dichos cambios se incluyen, pero sin limitarse a, temperatura, tipo y concentración de catión

divalente, concentración salina, pH, aditivos y la presencia o ausencia de componentes críticos esenciales para el ensamblaje y/o la actividad de una MNAzima activa.

5 **[0099]** La MNAzima ensamblada representan el estado "activado", mientras que los componentes desensamblados o ensamblados parcialmente representan un estado "desactivado". El ensamblaje y desensamblaje puede controlarse por la temperatura. El estado "activado" puede inducirse situando la temperatura a una que se encuentre en la gama compatible tanto con el ensamblaje como con la actividad catalítica de una MNAzima. En cambio, pueden inducirse los estados "desactivados" situando la temperatura fuera de la gama compatible con el ensamblaje y/o con la actividad catalítica de una MNAzima. Las temperaturas de fusión de los componentes de complejos MNA pueden ajustarse para solo permitir el ensamblaje dentro de los límites de una gama de temperatura limitada. Los oligonucleótidos, que son especialmente útiles en este aspecto del invento, incluyen pero no se limitan a, componentes de brazo estabilizador, componentes de partzima con brazos sensores truncados y componentes de facilitador del ensamblaje y/o oligonucleótidos moduladores. Los complejos de MNA en los que el diseño básico (Figura) se han dividido en subunidades de componentes más pequeños o porciones como el brazo sensor truncado o la porción de brazo que se representa en la Figura 2 otorgan gran flexibilidad. Sus secuencias pueden adaptarse con respecto a la temperatura de fusión, la composición de la secuencia y la complementariedad, o la falta de ella, con otros oligonucleótidos de los componentes. A respecto de la Figura 2, un experto en la materia apreciaría que el brazo de la partzima, que está truncado, podría ser cualquiera de los siguientes: el brazo sensor de la partzima A, el brazo sensor de la partzima B (ilustrado en la Figura B), el brazo de substrato de la partzima o el brazo de substrato de la partzima B o una combinación de los anteriores.

15 **[0100]** La sensibilidad de una MNAzima a la temperatura puede usarse para construir termo-sensores y reóstatos. Si la temperatura fuese demasiado alta o demasiado baja para el ensamblaje (hibridación) de los oligonucleótidos del componente, y/o por actividad catalítica, el substrato de MNAzima no se vería modificado (por ejemplo, dividido). Si la temperatura permitiese la actividad de MNAzima, el substrato se vería modificado y se generaría una señal. Una subida o bajada de temperatura a una que sea incompatible con la actividad de la MNAzima, a otra que sea compatible con la actividad de la MNAzima, podría detectarse por una señal generada siguiendo la modificación del substrato por parte de la MNAzima. Las MNAzimas pueden proporcionar un instrumento capaz de detectar los cambios de temperatura. Un experto apreciaría que los instrumentos sencillos que usan MNAzimas para detectar la temperatura podría aplicarse en muchas industrias como por ejemplo, la industria farmacéutica, alimentaria y agrícola.

25 **[0101]** En otras representaciones, una fuerza magnética podría regular la concentración de catión y por lo tanto proporcionar un interruptor para conectar y desconectar la actividad de la MNAzima. Los cationes con carga positiva son necesarios para la actividad catalítica de algunas MNAzimas. Una fuerza magnética podría, de forma alternativa, desconectar la actividad de MNAzima separando físicamente los componentes de la partzima con carga negativa de los cationes con carga positiva, por ejemplo Mg^{2+} . La MNAzima podría volver a conectarse al permitir que las partzimas y los cationes vuelvan a ponerse en contacto.

35 **[0102]** En algunos ejemplos, pueden inducirse los estados "activados" (MNAzima) usando un pH perteneciente a la gama compatible con la actividad. De forma opuesta, puede inducirse un estado "desactivado" usando un pH que esté fuera de la gama compatible con la actividad. El pH podría usarse también para controlar la actividad de los complejos de MNA provocando la hidrólisis de secuencias lábiles, y creando o destruyendo de esa forma un nuevo componente para una MNAzima y/o un complejo inactivo de MNA.

40 **[0103]** La presencia o ausencia de cualquier componente de los complejos de MNA puede provocar una "activación" o "desactivación". Cambiando, por ejemplo, la secuencia de oligonucleótido, la temperatura y o concentración de fusión puede conseguir un ajuste más fino. El amplio alcance de los diseños de componentes que pueden ensamblarse en complejos de MNA, por ejemplo dos facilitadores de ensamblaje de dos partes y/o dos componentes de partzimas de dos partes (con dominios de sensor truncado y brazo estabilizador), introduce flexibilidad en sistemas que pueden permitir la adaptación (ajuste) de condiciones compatibles con la hibridación y, por lo tanto, el ensamblaje del complejo de MNA. Además, la potencia de la hibridación y la exigencia de la unión de oligonucleótidos específicos dentro de un complejo de MNA se ve afectada por muchos factores, incluido pero sin limitarse a, concentración salina, concentración de catión, temperatura y la presencia o ausencia de aditivos (por ejemplo, DMSO). De la misma manera, las entidades que tienen efecto sobre la hibridación pueden proporcionar una herramienta para controlar el ensamblaje y desensamblaje de los complejos de MNA incluyendo las MNAzimas activas y las MNAs inactivas.

45 **[0104]** La manipulación física de componentes puede conseguirse, por ejemplo, explotando las propiedades físicas de las fracciones anexadas como "ganchos" moleculares, y/o explotando las propiedades inherentes de los oligonucleótidos, por ejemplo, la carga negativa, o la complementariedad de la secuencia. En otro ejemplo, la fracción anexa permite la captura selectiva de los oligonucleótidos, usando por ejemplo un grupo de biotina. En otro ejemplo, la fracción contiene un campo magnético de radiofrecuencia para facilitar el control electrónico remoto de la hibridación. Esta aproximación se ha diseñado para permitir la retirada selectiva de moléculas de componentes a través de la desnaturalización selectiva de moléculas de componentes de oligonucleótidos específicos dentro de un complejo de MNA, permitiendo así la activación o inhibición de la actividad enzimática dependiendo de si la molécula

del componente en sí misma es una secuencia activadora o inhibidora. Por ejemplo, el inhibidor de la actividad puede desnaturalizarse de forma selectiva de un complejo de MNAi, permitiendo la transición del estado de la MNAzima activa.

5 [0105] Pueden usarse otras estrategias para retirar la influencia de una molécula activadora o inhibidora y de esa forma promover el ensamblaje o desensamblaje de las MNAzimas activas y los complejos de MNA inactivos. Por ejemplo, la hibridación entre dos oligonucleótidos en el extremo monocatenario pueden provocar una migración de la rama de ADN y la descompresión de áreas de ácido nucleico de doble cadena. En una de las representaciones, puede retirarse un inhibidor de la actividad de un complejo de MNAi a través de un oligonucleótido modulador que funciona por la migración de la rama de la cadena.

10 [0106] En otros ejemplos, los oligonucleótidos complementarios pueden usarse para dejar fuera y por lo tanto dejar "desactivados" los componentes de oligonucleótidos, lo que en sí mismos podría comprender complejos de (MNAzima) activada o de MNA inactiva, como MNAi. Los componentes que se inhiben por este planteamiento podrían comprender componentes activadores o inhibidores o complejos de MNAzima o de MNA inactiva.

15 [0107] La retirada o inhibición de un dominio facilitador del activador del ensamblaje podría permitir la transición de una MNAzima activa catalíticamente a un complejo inactivo de MNA, como el MNAi. La retirada de un dominio facilitador activador del ensamblaje podría comprender el desplazamiento de un dominio facilitador activador del ensamblaje por parte de una MNAzima por un inhibidor de la actividad.

20 [0108] Un experto reconocerá que los diversos métodos que se proporcionan en el presente documento pueden usarse, de forma general, para modular el ensamblaje o la actividad de complejos únicos de MNA o de complejos múltiples de MNA en una reacción o ensayo único.

25 **3. Uso de los compuestos como interruptores moleculares**

[0109] Alguien experto en este ámbito podrá reconocer y entender que el presente invento podría equipararse con un "interruptor" molecular o biológico, cuyas aplicaciones se contemplan en el presente documento. A continuación se muestran ejemplos del mecanismo para activar y desactivar la actividad de una MNAzima en la Tabla 2.

Tabla 2. Estados activo e inactivo de MNA y mecanismos para pasar de un estado a otro.

Tipo	Estado "activado"	Estado "desactivado"	Ejemplo de mecanismo, que puede inducir la transición entre estados activos e inactivos.
Ensamblaje y desensamblaje de complejo de MNAzima	Ensamblado totalmente	Desensamblado total o parcialmente	La temperatura podría ser compatible o incompatible con la retirada física del ensamblaje o con la adición de componentes
Complejo de apta-MNAzima	Ligando del activador presente	Ligando de activador ausente	El ligando de activador proporciona un interruptor al retirar un inhibidor del ensamblaje
	Inhibidor de ensamblaje retirado	Inhibidor de ensamblaje proporcionado	Retirada, desplazamiento o modificación del inhibidor del ensamblaje, por ejemplo a través de la migración de cadena de ramificación en cadena
Estructuras alternativas de complejos MNA	MNAzima	MNAi	Retirada, desplazamiento o modificación del inhibidor de la actividad, por ejemplo por migración de ramificación en cadena o división
Inhibición de catálisis	MNAzima más catión, por ejemplo Mg ²⁺	MNAzima menos catión, por ejemplo Mg ²⁺	Separación de cationes positivos de componentes de ADN MNA con carga negativo usando, por ejemplo, fuerza magnética

55 [0110] A este respecto, la presencia o ausencia de cualquier componente de los complejos multi-componente de ácido nucleico pueden proporcionar un interruptor de "desactivación" o "activación" o proporcionar un interruptor de "desactivación" inhibidor.

60 [0111] En algunas representaciones, la presencia o adición de un brazo estabilizador puede proporcionar un interruptor de "activación". En otra representación, pueden generarse nuevos brazos estabilizadores en el sistema durante una reacción, por ejemplo por medio de la división de un inhibidor de la actividad o cualquier otro componente de MNA. En otras representaciones, la ausencia, modificación o retirada de un brazo estabilizador puede proporcionar un interruptor de "desactivación".

65 [0112] En algunas representaciones, la presencia de un facilitador del ensamblaje o alguno de sus componentes

puede proporcionar un interruptor de "activación". En algunas representaciones, pueden generarse nuevos facilitadores del ensamblaje por medio de la división de MNAzima de componentes de un MNA complejo, por ejemplo, por medio de la división de inhibidores de la actividad durante SCUD o por modificación de otros componentes proporcionados por la fracción de la reacción. En algunas representaciones, los facilitadores del ensamblaje pueden proporcionar sistemas de señal de "entrada" específicos, codificados en el interior de la secuencia. En algunas representaciones, el facilitador del ensamblaje puede ser reconocido o "leído". En algunas representaciones, el brazo sensor de la partzima puede "leer" las secuencias facilitadoras del ensamblaje, incluidas las que difieren por una o más bases. En otras representaciones, la ausencia o retirada de un facilitador del ensamblaje, o uno de sus componentes, puede proporcionar un interruptor de "desactivación".

[0113] En algunas representaciones pueden generarse componentes para complejos de MNA por medio del ligado de componentes presentes en el medio de la reacción. En algunas representaciones, se crea una partzima por medio del ligado de oligonucleótidos, generando de esa forma un nuevo componente de partzima, que puede asociarse para formar, por ejemplo, una MNAzima activa. En algunas representaciones, se crea un facilitador de ensamblaje por medio del ligado de oligonucleótidos, generando así un nuevo componente facilitador del ensamblaje que puede facilitar el ensamblaje de un complejo de MNA.

[0114] La transición entre estados de activación (MNAzima) y desactivación (MNA inactiva) puede proporcionar un mecanismo para la creación de un interruptor molecular, que puede regularse alternando entre las configuraciones activa e inactiva. Dichos interruptores moleculares pueden, por ejemplo, aplicarse para el control de cascadas de replicación del ácido nucleico o para la regulación de instrumentos autónomos a escala molecular para uso terapéutico, diagnóstico e informático.

[0115] El presente invento proporciona composiciones que comprenden los componentes para auto-ensamblar complejos de MNAi que se auto-ensamblan en presencia de una o más moléculas facilitadoras del ensamblaje de MNAzima para formar MNAi, donde por lo menos una de las moléculas facilitadoras del ensamblaje comprenda un inhibidor de la actividad.

[0116] El invento se entenderá mejor haciendo referencia a las figuras. La Figura 1 muestra un ejemplo de método básico para ensamblar una MNAzima usando un facilitador del ensamblaje. De forma más específica, las partzima A y la partzima B se muestran en la Figura 1, cada una de ellas comprendiendo una (i) porción de brazo sensor, (ii) una porción de brazo de sustrato, y (iii) una porción de núcleo catalítico.

En presencia de un facilitador del ensamblaje, las porciones de brazo sensor de la partzima A y la partzima B pueden hibridarse con y emparejarse con porciones complementarias del facilitador del ensamblaje, como por ejemplo una secuencia de ADN o ARN. Al entrar en contacto con el facilitador del ensamblaje de esta forma, la MNAzima se auto-ensambla formando un núcleo catalítico que puede modificar un sustrato que está unido por los brazos de sustrato. Preferiblemente, la presencia de la MNAzima se detecta a través de la detección o medición de su actividad catalítica. Los brazos de sustrato de la MNAzima ensamblada de esta forma pueden añadir un sustrato, por ejemplo el sustrato marcador que se muestra en la Figura 1, a través de la interacción de las secuencias complementarias con los brazos de sustrato y el sustrato. Una vez que el sustrato está unido de esta forma a los brazos de sustrato, el núcleo catalítico puede promover la modificación (por ejemplo, división) del sustrato, lo que a su vez puede medirse o detectarse, directa o indirectamente. La MNAzima puede, de forma alternativa, ensamblarse (activada) y des-ensamblarse (desactivada) por medio de varios métodos.

[0117] Con referencia a la Figura 2, se muestran diseños adicionales para las MNAzimas activas, a modo de ejemplo. La estructura de ejemplo para una MNAzima se muestra en el panel (i) donde se necesitan múltiples componentes facilitadores del ensamblaje para la formación de una MNAzima. En este diseño, un componente facilitador del ensamblaje (F1) es complementario a las áreas del brazo sensor tanto de la partzima A como de la B, mientras que un segundo componente facilitador del ensamblaje (F2) es complementario con la partzima B sola (como en la Figura 2(i)), o con la partzima A sola. Los dos componentes facilitadores del ensamblaje juntos guían el ensamblaje de una MNAzima activa, que puede modificar (por ejemplo, dividir) un sustrato. La Figura 9 (estructuras del lado izquierdo) ilustra otros diseños de facilitadores para el ensamblaje de MNAzimas.

[0118] El panel (ii) de la Figura 2 muestra un ejemplo de diseño en el que el ensamblaje de la partzima A con un componente de partzima B bilateral en presencia de un facilitador del ensamblaje produce una MNAzima activa capaz de modificar (por ejemplo, dividir) un sustrato. En este diseño, la partzima B tiene un brazo sensor truncado (T), que es insuficiente para permitir un ensamblaje estable de la MNAzima en ausencia de un segundo componente, al que se hace referencia como componente de brazo estabilizador (S). De todas formas, cuando un componente de brazo estabilizador se hibrida con el facilitador de ensamblaje en una ubicación adyacente a aquella a la que se une el brazo de sensor truncado de la partzima, esto permite el ensamblaje a una MNAzima activa.

[0119] La MNAzima activa formada por el ensamblaje de una partzima A, un componente de partzima B con un brazo sensor truncado, un componente de brazo estabilizador en presencia de un facilitador de ensamblaje representa un estado "activado". La omisión, retirada o modificación del componente de brazo estabilizador de la partzima o de un componente facilitador del ensamblaje tiene como resultado un estado "desactivado" activo

- 5 catalíticamente. De esa forma, la actividad catalítica de la MNAzima puede regularse por medio de la presencia o ausencia de varios oligonucleótidos y/o por la capacidad de dichos componentes de oligonucleótidos para ser activos funcionalmente, por ejemplo ser capaces de hibridarse con otros componentes de oligonucleótidos para formar complejos estables de MNAzima. El brazo truncado está diseñado para ser insuficiente para permitir el ensamblaje estable de MNAzima bajo unas condiciones de reacción, a no ser que esté acompañado de un componente de brazo estabilizador. El componente de brazo estabilizador y el facilitador de ensamblaje pueden de esa forma funcionar como interruptores de "activación" para la actividad de la MNAzima.
- 10 **[0120]** Las reacciones que se ilustran en la Figura 3 representan dos estados alternativos para los complejos de MNA. La MNAzima activa (reacción(i)) representa el estado "activado". Esas reacciones eran o un componente de brazo estabilizador de partzima (reacción (ii)), o un componente facilitador del ensamblaje (reacción (iii)) omitido, eran complejos inactivos de MNA representativos de los estados "desactivados". De esa forma, la actividad catalítica de la MNAzima puede regularse por medio de la presencia o ausencia de varios oligonucleótidos y/o por la capacidad que tienen dichos componentes oligonucleótidos de ser activos funcionalmente, por ejemplo ser capaces de hibridarse con otros componentes oligonucleótidos para formar MNAzimas estables. El brazo truncado está diseñado para ser insuficiente para permitir el ensamblaje estable de la MNAzima bajo las condiciones de reacción, a no ser que estén acompañados de un componente de brazo estabilizador. El brazo estabilizador y el facilitador de ensamblaje pueden funcionar como interruptores de "activación" para la actividad de MNAzima.
- 15 **[0121]** Alguien experto en la materia apreciaría que el brazo de la partzima, que está truncado, podría ser cualquiera de los anteriores; el brazo sensor de la partzima A, el brazo sensor de la partzima B (tal y como se ilustra), el brazo de sustrato de la partzima A o el brazo de sustrato de la partzima B.
- 20 **[0122]** Alguien experto en la materia reconocería que las MNAzimas pueden usarse en estrategias para crear sensores moleculares, interruptores moleculares, y/o moduladores o propagadores de cascadas autocatalíticas que se auto replican o de otros procesos iterativos. Las áreas potenciales de uso incluyen, sin limitarse a, aplicaciones médicas, veterinarias, agrícolas, de tecnología alimentaria, imágenes y bioterrorismo.
- 25 **[0123]** A respecto de la Figura 4, se forma una MNAi cuando las partzimas A y B se combinan con un facilitador de ensamblaje y un inhibidor de la actividad (panel izquierdo).
- 30 **[0124]** La MNAi es capaz de interactuar con el sustrato, pero no de modificarlo catalíticamente. En algunas representaciones, el inhibidor de la actividad podría incluir también un ligador lábil o divisible, que podría separar dos o más dominios en el interior del inhibidor de actividad. Dichos dominios podrían incluir, por ejemplo, (i) un inhibidor de la actividad que es sustancialmente no complementario de los componentes de la partzima y que ejerce un efecto inhibitorio alterando la estructura secundaria que es necesaria para la formación de una MNAzima activa catalíticamente y (ii) un dominio facilitador activador del ensamblaje que, si se separa del dominio inhibidor, podría funcionar como componente adicional facilitador del ensamblaje y guiar el ensamblaje de una MNAzima activa.
- 35 **[0125]** Una MNAzima activa (Figura 4, lado derecho) puede derivarse de los componentes de la MNAi, siguiendo la modificación del inhibidor de la actividad, como la división de la molécula y separación del (i) dominio del inhibidor y del (ii) dominio facilitador del activador del ensamblaje. El dominio facilitador del activador del ensamblaje liberado podrá entonces funcionar como segundo componente facilitador del ensamblaje, lo que en conjunto con el primer componente facilitador del ensamblaje puede guiar el ensamblaje de componentes de partzima A y B a una MNAzima activa capaz de modificar catalíticamente un sustrato.
- 40 **[0126]** En la Figura 9 se muestran otros ejemplos de estructuras para MNAi.
- 45 **[0127]** La MNAi y la MNAzima activa catalíticamente representan dos estados alternos para los componentes ensamblados, concretamente un estado "desactivado" y el estado "activado", respectivamente.
- 50
- 4. Uso de las composiciones como puertas lógicas**
- 55 **[0128]** Alguien experto en la materia reconocería que los complejos de MNA descritos en el presente documento podrían usarse como puerta lógica. Los estados "activados" incluyen complejos MNA ensamblados, activos catalíticamente, incluidos pero sin limitarse a, MNAzimas o apta-MNAzimas en presencia de su ligando activador. Los estados "desactivados" incluyen complejos MNA inactivos catalíticamente, entre los que se incluyen, entre otros, los complejos MNA desensamblados total o parcialmente, los complejos de apta-MNA en los que el ligando activador no está presente, y los MNAis. De acuerdo con esto, una puerta lógica de complejo de MNA se crea comprendiendo como mínimo un complejo inactivo de MNA, como mínimo una entrada y como mínimo una salida, donde la presencia de dicha entrada activa dicha puerta lógica de complejo inactivo de MNA y donde dicha activación proporciona dicha salida. La puerta es capaz de al menos dos estados de salida, donde dicho estado depende de la activación de dicha puerta lógica de complejo inactivo de MNA.
- 60 **[0129]** La puerta del complejo de MNA podría tener por lo menos dos entradas y un primer estado de salida, donde el complejo de MNA esté inactivo y un segundo estado de salida en el que dicho complejo de MNA esté activado. El
- 65

primer estado de salida, donde el complejo de MNA no está activado, corresponde a un desactivado lógico y el segundo estado de salida, donde dicho complejo de MNA está activado, corresponde a un activado lógico. De forma alternativa, el primer estado de salida podría corresponder a un activado lógico y el segundo estado de salida podría corresponder a un desactivado lógico.

5 **[0130]** La salida de la puerta lógica de complejo de MNA podría ser detectada por cualquiera o cualquier combinación de espectroscopio de fluorescencia, resonancia plasmónica de superficie, espectroscopio de masa, NMR, resonancia del espín electrónico, espectroscopio de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, métodos radiométricos, métodos electrónicos, UV, espectroscopio de luz visible o infrarrojo, métodos enzimáticos.

10 **[0131]** La puerta lógica de complejo MNA podría comprender dos entradas y ser una puerta lógica AND cuando el complejo MNA esté activado, proporcionando así una salida correspondiente a la activación lógica, solo si la primera y segunda entradas están presentes. En presencia de la entrada sola o en la ausencia de entrada el complejo de MNA permanece inactivo, correspondiente a una desactivación lógica.

15 **[0132]** La puerta lógica de complejo MNA podría comprender una entrada y ser una puerta de sensor lógico, donde dicha entrada active la puerta lógica de complejo de MNA inactivo, proporcionando una salida correspondiente a la activación lógica y en la ausencia de dicha entrada la puerta lógica de complejo MNA inactivo permanece inactiva en correspondencia con el desactivado lógico.

20 **[0133]** La puerta lógica del complejo de MNA podría comprender dos entradas y ser una puerta de OR lógico, en la que cualquiera o ambas entradas activa la puerta lógica del complejo de MNA, proporcionando así una salida correspondiente a la activación lógica y donde si no hay ninguna entrada presente, la puerta lógica del complejo de MNA permanece inactiva, correspondiendo a una desactivación lógica.

25 **[0134]** La puerta lógica del complejo podría comprender dos entradas y ser una puerta lógica EX-OR (Exclusiva-OR) donde cualquiera pero no las dos entradas juntas activen la puerta lógica del complejo MNA, proporcionando de esa forma una salida correspondiente a la lógica y donde no haya presente ninguna entrada o si están presentes las dos entradas la puerta lógica de complejo de MNA permanece inactiva, correspondiendo a una desactivación lógica.

30 **[0135]** Además, alguien experto en la materia se dará cuenta de que el desensamblaje y el ensamblaje de las MNAs puede proporcionar de forma igual dos estados, un estado activado y un estado desactivado y la transición entre los dos estados puede modularse por medio de varias entidades y eventos. Estos estados pueden también aplicarse a los sistemas de puerta lógica de forma similar a la descrita anteriormente.

35 **[0136]** En la Figura 12 se da un ejemplo del uso de las puertas lógicas en un sumador completo y se describe en el Ejemplo 12.

40 **5. Métodos que usan apoyos solubles y sólidos**

45 **[0137]** También debe entenderse que generalmente los métodos, ya sean multiplexados o no, son aplicables en solución, o combinados con un soporte insoluble o soporte sólido en donde pueden estar anexados un sustrato o más, componentes de complejo de MNA o sus porciones. De acuerdo con esto, por lo menos uno de los componentes de partícula, un sustrato, un facilitador de ensamblaje, un inhibidor de ensamblaje y/o un inhibidor de la actividad podrían estar unidos, anexados o fijados. De nuevo, las características de dicho sistema de pruebas las entenderá quien sea experto en la materia al que se le proporcionen los métodos y variaciones que se dan en ejemplos en este documento junto con los ejemplos prácticos.

50 **[0138]** Las representaciones del presente invento que abarcan un soporte insoluble en forma de un "chip", también conocidos como matriz o micromatriz, normalmente comprenden varios sustratos acoplados, fijados o ligados de otra forma al chip. En ciertas representaciones, los sustratos comprenden un ácido nucleico. Puede posicionarse un grupo de ácidos nucleicos en el chip por medio de cualquier método adecuado de los conocidos, como por ejemplo, una pipeta, impresión de tinta, impresión de contacto o fotolitografía. El chip podría estar comprendido de por lo menos un elemento, y cada elemento comprendería al menos un ácido nucleico. El elemento que podría estar comprendido de un grupo de ácidos nucleicos de la misma secuencia. El número de elementos que contiene un chip puede ser cualquiera y cuando hay un grupo de elementos posicionado en un chip, los elementos pueden estar espaciados a una distancia uniforme o variada o a una combinación de ambas. En algunas representaciones, los elementos podrían estar situados de forma aleatoria, determinando así la ubicación respectiva de cada elemento. El tamaño y forma de los elementos dependerá de su aplicación concreta y elementos con tamaños y formas diferentes pueden combinarse en un único chip. La superficie del chip podría ser sustancialmente plana o tener características como depresiones o protuberancias y los elementos podrían estar ubicados en las depresiones o las protuberancias. Dichas depresiones podrían proporcionar un depósito para soluciones en las que los elementos estén inmersos, o dichas protuberancias podrían facilitar el secado de los elementos. Por ejemplo, los elementos podrían situarse en cada uno de los huecos de una placa de 96 huecos. En algunas representaciones, el chip podría incluir identificadores como indicios, etiquetas de radio frecuencia, instrumentos integrados, como

microprocesadores, códigos de barras u otros marcadores para identificar cada uno de los elementos. Los identificadores únicos podrían comprender de forma adicional o alternativa las depresiones o protuberancias de la superficie de la matriz. Además, los identificadores únicos pueden proporcionar la orientación o identificación correcta del chip. Los identificadores únicos podrían ser leídos directamente por un instrumento de captura de datos o un escáner o detector óptico.

Además, los identificadores únicos pueden proporcionar la orientación correcta o la identificación del chip. Los identificadores únicos podría leerlos directamente un instrumento de captura de datos o un escáner o detector óptico.

6. Sistemas de sustrato de marcador que se usan en los métodos

[0139] También se proporcionan sistemas de sustrato de marcador genérico, que permiten un desarrollo rápido del sistema porque permiten cambios del diseño sencillos para crear nuevas MNAzimas y complejos de MNA inactivo que reconocen diferentes facilitadores del ensamblaje. Tal y como se discute en el presente documento, la porción del brazo de sustrato y la porción del núcleo catalítico de las partzimas podrían permanecer sin modificación, con cambios solo en la porción del brazo sensor de una o más de las partzimas necesarias para facilitadores del ensamblaje nuevos. Se proporciona una secuencia genérica del sustrato y el mismo sustrato puede, por lo tanto, incorporarse a sistemas para diversas aplicaciones. Además, el mismo sustrato puede incorporarse a los métodos de varias de las representaciones de este documento, incluyendo ensayos en los que el sustrato está libre en una solución o está fijado o anexo a un soporte. Puede usarse una serie de sustratos genéricos en una reacción multiplexada permitiendo la detección simultánea de múltiples facilitadores del ensamblaje.

[0140] Los sustratos que han sido divididos pueden reconstituirse y por lo tanto reciclarse usando una ligasa de DNAzima.

7. Sustratos usados en los métodos

[0141] Tal y como se describe más detalladamente a continuación, los complejos de MNA como las MNAzimas y los complejos de MNA inactivo tienen una propiedad ventajosa en ciertas representaciones, pues pueden utilizar un sustrato universal o genérico. Dicho sustrato se muestra en la Figura 1 en una configuración preferida en este documento donde el sustrato comprende tanto una porción detectable como una porción quencher. La porción quencher está adaptada para disminuir o eliminar una señal detectable de la porción detectable del sustrato hasta que el sustrato es dividido por una MNAzima. Por ejemplo, la porción quencher podría comprender un "Quencher de Agujero Negro 1" (BHQ1) o "Quencher de Agujero Negro 2" (BHQ2).

[0142] De esa forma, la MNAzima divide el sustrato entre la porción detectable y la porción quencher, permitiendo que las dos porciones se separen en solución, permitiendo de esa forma que aparezca la señal detectable o que aumente mientras se distancia la porción quencher, o se retira de forma efectiva del medio local de la porción detectable.

[0143] El uso del sustrato genérico o universal se permite a través del diseño de partzimas componentes de la MNAzima. Al alterar sólo los brazos sensores de las partzimas, pero dejando los brazos de sustrato sin cambios, se puede diseñar una gran variedad de complejos de MNAzimas y MNA inactivo específicos para cada uno de una pluralidad de facilitadores de ensamblaje, todos los cuales utilizan un sustrato universal para producir una señal de salida. Un técnico experto apreciará las ventajas que esto ofrece en términos de eliminar la necesidad de sustratos personalizados o únicos para responder a cada evento de entrada. La detección de cada nuevo facilitador de montaje requiere solo uno o más cambios en una o más de las porciones de brazo sensor; la porción del brazo de sustrato y la porción de núcleo catalítico pueden permanecer constantes. De esa forma, puede usarse un único sustrato marcador para un único facilitador de ensamblaje o cualquier otro evento de entrada utilizando un complejo de MNA, tal como una MNAzima, y múltiples facilitadores de ensamblaje en una serie de sistemas que utilizan complejos MNA modificados, como MNAzimas. Varios sustratos marcador permiten la supervisión de múltiples complejos MNA y MNAzimas dentro de un sistema.

[0144] Además, los sustratos pueden incorporar entidades adicionales como ácidos nucleicos marcados, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticuerpos, ARN, ADN, análogos de ácidos nucleicos, grupo de biotina, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de ácido péptido nucleico, fracción de campo magnético de radiofrecuencia, o cualquier combinación de los mismos.

[0145] Los sustratos pueden modificarse por medio de una MNAzima proporcionando así un "efecto detectable" o señal de "salida". En el proceso de detección, la modificación del sustrato por una MNAzima podría implicar, por ejemplo, división, ligación, metalación de porfirina y la formación de enlaces carbono-carbono, enlaces de éster o enlaces de amida. Como consecuencia de la modificación del sustrato por parte de una MNAzima, se genera un efecto detectable y la magnitud del efecto, por lo tanto, podría ser indicativa de la cantidad de la señal de entrada. El efecto detectable podría ser detectado por varios métodos, incluyendo la espectroscopia de fluorescencia, la resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de masa, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopia

de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, radiometría, fotometría, gammagrafía, métodos electrónicos, UV, espectroscopio de luz visible o infrarroja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de UV, luz visible espectroscopio de infrarrojos, métodos enzimáticos o cualquier combinación de los mismos.

5
 [0146] 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). Esta estrategia implica la preparación de los lotes de nanopartículas de oro, cada uno de los cuales tiene una secuencia de oligonucleótido de ADN diferenciada unida a su superficie. Las partículas de oro pueden agregarse entonces por medio de la adición de un "oligonucleótido puente", que se complementa con las secuencias que están unidas a las partículas de oro. La agregación de partículas tiene como resultado un cambio inherente en el color de rojo a azul (Mirkin et al, 1996). La inclusión de una secuencia de sustrato DNAzima dentro del oligonucleótido puente puede proporcionar un mecanismo para invertir la adición de las partículas de oro (Liu y Lu, 2004). La activación de la DNAzima plomo-dependiente por la adición de plomo, provocó la división del oligonucleótido puente, la disociación de las partículas de oro y un cambio de color de azul a rojo.

10
 [0147] Se pueden desarrollar detectores simples para la supervisión de los cambios usando este principio y un complejo de MNA, como una MNAzima. Los cambios en la temperatura o por otras entidades o eventos podrían activar el complejo (o complejos) de MNA para formar una MNAzima (o MNAzimas), que podría dividir los oligonucleótidos puente provocando la disociación de nanopartículas y un cambio de color.

8. Perfeccionamiento de los métodos

25
 [0148] Quien sea experto en la materia comprenderá fácilmente que los métodos descritos en este documento pueden perfeccionarse usando varios parámetros experimentales. Los parámetros experimentales concretos que perfeccionan y el nivel de dicha mejora, dependerán del método concreto que se use y/o del evento concreto que se quiera detectar. Tales parámetros incluyen, entre otros, tiempo, temperatura, concentración de sales, detergentes, cationes y otros reactivos incluyendo, entre otros, dimetilsulfóxido (DMSO), la longitud, la complementariedad, el contenido de GC y el punto de fusión (Tm) de los ácidos nucleicos. La temperatura a la que dichos métodos se pueden poner en práctica puede estar en el intervalo de aproximadamente 20° C a aproximadamente 96° C, de aproximadamente 20° C a aproximadamente 75° C, de 20° C a aproximadamente 60° C o de aproximadamente 20° C a aproximadamente 55° C. La temperatura puede ser constante o darse en ciclo entre una temperatura compatible con el ensamblaje y con la actividad catalítica de una MNAzima y una temperatura incompatible con la actividad catalítica.

30
 [0149] De forma adicional o alternativa, podría usarse una variación en los parámetros y/o el microambiente para pasar el complejo MNA de un estado inactivo a un estado activo. De esa forma, un parámetro del microambiente podría comprender un "activador" como se define en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a eventos como cambios en la temperatura, longitud de la onda, concentración de sales, detergentes, cationes y concentración de componentes estructurales y moduladores que incluyen, entre otros, facilitadores del ensamblaje o componentes de facilitadores del ensamblaje, partzimas o componentes de partzima, sustratos, inhibidores del ensamblaje, inhibidores de la actividad y componentes de oligonucleótido activador. De acuerdo con esto, dicha mejora de los parámetros y/o el microambiente pueden llevarse a cabo para conseguir el uso de complejos de MNA como interruptores moleculares.

35
 [0150] En una de las mejores representaciones, las reacciones optimizadas para la práctica de los métodos de uso de complejos MNA se proporcionan en el presente documento. En dichas reacciones mejoradas, la activación de la actividad catalítica se puede aumentar hasta en un 10, 20, o 30% por encima de las reacciones no mejoradas. Otros de los mejores ejemplos pueden mejorar la actividad catalítica por lo menos en un 35% o 40%, y preferiblemente hasta el 50% o más. En otros de los mejores ejemplos, las reacciones optimizadas pueden tener un aumento en la activación de la actividad catalítica de más del 50%, y hasta un 66%, 75% o incluso 100%. En otros de los mejores ejemplos, un método de reacción totalmente perfeccionado puede proporcionar un aumento del 100, 200 o incluso 300% o más en la activación de la actividad catalítica. Otras condiciones de reacción preferidas pueden mejorar la activación de la actividad catalítica hasta el 1000% o más a respecto de los métodos practicados con condiciones de reacción no mejoradas. Una condición de reacción altamente recomendada para la optimización de los métodos proporcionados en este documento es la inclusión de ciertos cationes divalentes. La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas de ácido nucleico puede recibir la influencia de una manera dependiente de la concentración por la concentración de cationes divalentes. Las reacciones mejoradas preferibles podrían estar mejoradas para uno o más de entre Ba²⁺, Sr²⁺, M²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, y Pb²⁺.

9. Métodos que usan aptámeros

50
 [0151] Con referencia a la Figura 7, se ilustra un método en el que un ligando activador puede usarse para "activar" o "desactivar" el funcionamiento de la apta-MNAzima. Se ilustra el método que usa un inhibidor de ensamblaje para bloquear la actividad de las apta-MNAzimas en ausencia de un activador. Estos métodos usan aptámeros que pueden comprender un ácido nucleico o proteína, polipéptido o un péptido o una combinación de los anteriores 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, pequeñas moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualquier derivado, porción o combinaciones de los anteriores o cualquier otra entidad (Lee et al., 2004).

[0152] Los aptámeros preferidos en el presente documento pueden comprender oligómeros cortos de ADN o ARN de una cadena que pueden aislarse de conjuntos complejos de ácidos nucleicos sintéticos por medio de un proceso iterativo de adsorción, recuperación y reamplificación. Los aptámeros podrían, entonces, generarse contra casi cualquier diana, desde pequeñas moléculas como amino ácidos o antibióticos a proteínas y estructuras de ácido nucleico. En las representaciones preferidas, los aptámeros incluyen, por ejemplo, moléculas con unión de ácido nucleico que se generan preferentemente por medio de técnicas de evolución y selección. Preferentemente, los aptámeros pueden comprender moléculas de ADN o ARN, o una combinación de ambas, incluyendo, entre otros, los análogos nucleótidos como, por ejemplo, la Tabla 1.

[0153] Alguien experto en esta materia apreciará que el aptámero podría incorporarse en cualquiera de los extremos de la molécula o moléculas facilitadoras del ensamblaje y o el inhibidor de la actividad. Además, se apreciará que un aptámero o aptámeros múltiples podrían incorporarse a uno más de los componentes del oligonucleótido de la partzima. Además, se apreciará que un aptámero o múltiples aptámeros también podrían incorporarse a al menos uno de los componentes del oligonucleótido de la partzima. El facilitador del ensamblaje en las estrategias que se ilustran en la Figura 7 podría comprender, por ejemplo, ADN, ARN, ALN, APN o una secuencia que contenga uno o más análogos de base nucleótida.

[0154] En la estrategia que se muestra en la Figura 7, se incorpora una secuencia de aptámero al extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración en la que solo se forma una MNAzima activa en presencia del activador.

[0155] Alguien experto en la materia, también apreciará que se podrían incorporar uno o más aptámeros a cualquiera de los componentes del oligonucleótido, incluidas las partzimas, el facilitador del ensamblaje o el sustrato. Además, el aptámero podría incorporarse a cualquier extremo de cualquiera de esos oligonucleótidos.

[0156] La estrategia que se ilustra en la Figura 7 puede usarse (i) para proporcionar un método para controlar la actividad de complejo MNA usando ligandos como moléculas activadoras y/o (ii) para proporcionar un método para la detección de ácido no nucleico y dianas de ácido nucleico usando complejos de MNA que forman MNAzimas cuando entran en contacto con un activador de ligando. Los oligonucleótidos de ácido nucleico necesarios para esta estrategia de detección de apta-MNAzima incluyen:

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

[0157] En ausencia de un ligando activador (panel lateral izquierdo), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima compitiendo con y bloqueando la unión del sustrato marcador. Esta estructura representa un complejo de MNA inactivo. Cuando hay presente un ligando activador (panel lateral derecho), se une a la secuencia de aptámero de la apta-partzima, bloqueando la unión del oligonucleótido inhibidor del ensamblaje y permitiendo así la unión del sustrato y la formación de una MNAzima catalíticamente activa, que entonces, en este contexto, divide el sustrato. De esa forma, las MNAzimas catalíticamente activas pueden formar y causar una generación de señal fluorescente solo en presencia de activadores que pueden unir aptámeros.

[0158] En algunos ejemplos, la modulación de la actividad de MNAzima puede conseguirse usando un ácido nucleico o un ligando diana de ácido no nucleico activador como mecanismo interruptor. En otras realizaciones, la molécula inhibidora del ensamblaje se manipula por otros medios con el fin de modular la actividad. Por ejemplo, podría retirarse el inhibidor de montaje por medio de varias estrategias, entre las que e incluyen la desnaturalización térmica selectiva o métodos que utilizan oligonucleótidos para competir por la unión y/o usan migración de la cadena en rama para desplazar fragmentos.

10. Métodos que usan cascadas

[0159] Alguien experto en la materia apreciará que los métodos que se describen pueden usarse para llevar a cabo una cascada de la forma que se define en este documento. Algunas representaciones concretas para poner en práctica dichos métodos como los descritos en el presente invento incluyen, entre otros, la (1) activación de un complejo de MNA inactivo para formar una MNAzima para modificar un sustrato solo en presencia de una diana o evento, donde dicho sustrato se pone a disposición para implicarlo en un segundo evento como la generación de una señal detectable o la (2) activación de un complejo de MNA inactivo para formar una MNAzima para modificar un sustrato solo en presencia de una diana o evento, donde dicho sustrato se pone entonces a disposición para su implicación en un segundo evento, donde la puesta en práctica de dicho segundo evento pone a disposición a su vez una mayor cantidad de sustrato para su implicación en cualquier número de eventos sucesivos, de forma que un evento sucesivo pone a disposición un sustrato para su implicación en la puesta en marcha de un evento anterior, formando de esa manera una cascada cíclica, como se muestra en la Figura 6, Figura 10 y Figura 11(iii), donde dichas cascadas cíclicas podrían usarse para amplificar una señal, por ejemplo, en aplicaciones en las que un evento de entrada de baja intensidad, por ejemplo cuando una diana se encuentra en baja cantidad y no podría proporcionar de otra forma una señal de salida que sea detectable.

[0160] Un mecanismo para generar una cascada de replicación de MNAzima diseñada para la detección de diana utiliza la estrategia de cascada SCUD. La estrategia SCUD puede incorporarse a cascadas de una amplia variedad de diseños como los ilustrados, a modo de ejemplo, en la Figura 6, donde se incorporan dos complejos de MNA; en la Figura 10, donde se incorporan tres complejos MNA; y en la Figura 11 donde los dos complejos MNA y una ligasa de DNAzima se incorporan a una reacción en cascada.

[0161] El método SCUD depende de la capacidad para controlar la capacidad de controlar el ensamblaje de las MNAzimas activas y MNAi de con los componentes oligonucleótidos presentes en la mezcla. Un formato de SCUD se muestra en la Figura 6. Este ejemplo de SCUD describe un método general para la amplificación de la señal.

[0162] Una representación de dicho método, conocida como SCUD (Signal Cascade using DNA – Señal en cascada con uso de ADN), como se ilustra en la Figura 6, contiene los siguientes componentes:

(i) un inhibidor de la actividad (como la RIF (Reporter-Inhibitor-Facilitator – Marcador-Inhibidor-Facilitador) doblemente marcada como se muestra en la Figura 6) que contiene tres áreas;

- a. un dominio inhibidor/marcador (RI) de la actividad que tiene las funciones duales de en primer lugar ser un inhibidor de la actividad cuando se incorpora al RIF y en segundo lugar proporcionar una señal fluorescente cuando el RIF se divide y
- b. un componente facilitador del activador del ensamblaje F2b que forma un componente esencial de la MNAzima 2a,
- c. un dominio de sustrato ubicado entre los dominios RI y F2b, que podría ser dividido por la MNAzima 1a o la MNAzima 2a,

(ii) un componente facilitador del ensamblaje F2a

(iii) partzimas capaces de formar estructuras de MNAzima 1a activas solo en presencia de un facilitador del ensamblaje F1, que podría ser, a modo de ejemplo un ácido nucleico diana presente en una muestra de prueba; la MNAzima 1a activa, que es capaz de dividir RIF en componentes RI y F2b, generando de esa forma fluorescencia, negando el efecto inhibitorio de actividad de la MNAzima y en consecuencia generando un nuevo componente facilitador del activador del ensamblaje F2b.

(iv) partzimas capaces de formar complejos activos de MNAzima 2a solo cuando los brazos de la partzima unen el componente facilitador del ensamblaje F2a adyacente al componente facilitador del activador del ensamblaje liberado F2b. La MNAzima 2a, a su vez, podría dividir más RIF liberando más RI y creando así F2b una cascada de auto replicación de MNAzima 2a y una amplificación de señal fluorescente en consecuencia.

[0163] En ausencia de F1, que por ejemplo podría ser un ácido nucleico de diana, las partzimas para la MNAzima 2a formarían un complejo inactivo, MNAi 2i, con RIF intacto. RIF intacto funciona como inhibidor de la actividad en la formación de MNAi 2i. En presencia del analito diana, la MNAzima 1a activa formaría, dividiendo RIF y liberando un componente facilitador el activador del ensamblaje F2b que entonces quedaría libre para asociarse y convertirse en componente de una MNAzima 2a activa. En vista de que la MNAzima 2a también puede dividir más RIF, esto iniciaría la cascada de amplificación de replicación/señal.

[0164] Cada vez que una MNAzima 2a divide una molécula RIF, se generarían más componentes (facilitadores del activador del ensamblaje F2b) necesarios para la formación de nuevas MNAzimas 2a. La cascada de MNAzima tiene como resultado el ensamblaje de los complejos MNAzima 2a que son idénticos a la MNAzima matriz que usa componentes que son los productos generados por la actividad catalítica de la MNAzima 2a. De esa forma, el producto de la división de la MNAzima (F2b) puede guiar el ensamblaje de nuevas (matriz) moléculas de MNAzima en un sistema de auto-replicación que es autocatalítico.

[0165] Las estructuras que se describen en este documento y otros interruptores moleculares pueden formar componentes de cascadas, incluyendo las cascadas que se auto replican.

5 **[0166]** Con referencia a la Figura 10, una cascada como esa podría comprender un complejo de MNA que funciona en la detección de una diana, por ejemplo interactuando con la diana. En este camino, la diana actúa como facilitador del ensamblaje e inicia la cascada facilitando la formación de una MNAzima que se inicia. Esta MNAzima inicial (Mt en la Figura 10) podría modificar un sustrato. La modificación podría ser, por ejemplo, una división. En este caso la modificación tiene como resultado la generación de un primer facilitador del ensamblaje para la formación de una primera MNAzima en cascada (Mc1 en la Figura 10). La primera MNAzima en cascada podría entonces modificar un sustrato adicional para generar un facilitador adicional del ensamblaje para guiar la formación de una MNAzima adicional (Mc2 en la Figura 10). La MNAzima adicional podría entonces modificar el primer sustrato para generar otros facilitadores del primer ensamblaje para la primera MNAzima en cascada, y de esa forma se genera una reacción al estadio inicial de la cascada. En algunas representaciones, los facilitadores del ensamblaje podrían ser activadores facilitadores del ensamblaje.

15 **[0167]** Alguien experto en la materia reconocería que en esta cascada el primer sustrato, en su estado no dividido, podría actuar como inhibidor de la actividad de la primera MNAzima en cascada. De hecho, la primera MNAzima en cascada es una MNAi hasta el momento en que el primer sustrato es dividido por la MNAzima en inicio, cuando genera un primer facilitador activador del ensamblaje que entonces funciona para activar la primera MNAi en cascada del estado "desactivado" al estado catalíticamente activo "activado" de la primera MNAzima en cascada.

20 **[0168]** De forma similar, alguien experto en la materia reconocería que el sustrato adicional en su estado no dividido podría actuar como inhibidor de la actividad de la MNAzima adicional. De hecho, la MNAzima adicional es una MNAi hasta el momento en el que el sustrato adicional es dividido por la primera MNAzima en cascada que genera un facilitador del ensamblaje del activador adicional, que entonces funciona para activar la MNAzima adicional.

25 **[0169]** Alguien experto en la materia reconocería que la Figura 10 muestra que se necesitan tres componentes facilitadores del ensamblaje para facilitar el ensamblaje de la MNAzima activa. Podrían usarse más o menos componentes facilitadores del ensamblaje en un esquema similar.

30 **[0170]** A respecto de la Figura 11, las estructuras que se describen aquí y otros interruptores moleculares pueden formar una cascada de amplificación de la señal en la que una molécula diana facilita la formación de una primera MNAzima que tiene como resultado la división de un primer sustrato que genera dos productos de división (denominados Aa y Ab). Aa funciona como componente en una fase de ligado (representada en la casilla ii en la Figura 11) y las funciones Ab como componente de una amplificación SCUD (indicada en la casilla iii en la Figura 11). Aa normalmente tiene un fosfato 2', 3' - cíclico en su extremo 3' para permitir que funcione como sustrato para una ligasa de DNAzima.

35 **[0171]** En la fase de ligado, la ligasa de DNAzima liga Aa a un segundo sustrato para crear una partzima para la MNAzima adicional (la MNAzima adicional se representa en la casilla iv de la Figura 11).

40 **[0172]** En la fase de amplificación de SCUD (representada por la casilla iii en la Figura), Ab funciona como facilitador del ensamblaje de una segunda MNAzima que modifica el primer sustrato para generar más Aa y Ab. Las siguientes Aa y Ab se usan en las fases de amplificación de ligado y SCUD formando de forma respectiva una amplificación de retorno que tiene como resultado la acumulación de Aa y Ab.

45 **[0173]** El producto de ligado de la fase de ligado es una partzima para una MNAzima adicional que modifica un sustrato adicional, teniendo como resultado un efecto detectable indicativo de la presencia de la diana.

50 **[0174]** Preferentemente, la modificación de uno o más de los sustratos podría ser detectada por cualquiera o cualquier combinación de espectroscopia de fluorescencia, resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de masa, RMN, resonancia de espín electrónico, espectroscopia de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoensayo, cromatografía, métodos radiométricos, métodos electrónicos, UV, espectroscopio de luz visible o infrarrojo, métodos enzimáticos.

55 **[0175]** Alguien experto en esta técnica reconocerá que en esta cascada el primer sustrato, en su estado no dividido podría actuar como inhibidor de la actividad de la segunda MNAzima. Esta segunda MNAzima es, de hecho, un MNAi hasta que el primer sustrato es dividido por la primera MNAzima para generar un facilitador de ensamblaje que entonces actuará para encender el activar la segunda MNAi.

60 **[0176]** Las cascadas de amplificación mediadas por MNAzima podrían iniciarse por de dianas de ácido nucleico (ADN/ARN), u otros ligandos diana (proteínas, moléculas pequeñas, etc) si la estrategia estuviese ligada a un sistema de apta-MNAzima. Puesto que la reacción solo se inicia en presencia de ligandos u otros eventos de entrada, proporciona una técnica para la detección y/o identificación de analitos diana. Las cascadas de amplificación mediadas por MNAzima se basan en la activación de los complejos de ácido nucleico multicomponente. A diferencia de las técnicas de amplificación diana como la reacción en cadena de la polimerasa o la reacción en cadena de la ligasa, la replicación mediada por MNAzima y la amplificación de la señal no requieren ninguna enzima de proteínas para facilitar el proceso, lo que proporciona una ventaja importante sobre los protocolos utilizados más comúnmente. Además, la capacidad de controlar y regular la actividad catalítica de

65

MNAzimas usando varios componentes de oligonucleótidos, como componentes de brazo estabilizador o componentes de facilitador de ensamblaje permite que el ensamblaje de las MNAzimas se regule de forma estricta por las condiciones y componentes del microambiente.

5 [0177] Las cascadas de amplificación mediadas por MNAzima podrían aplicarse a una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas, en especial en el diagnóstico. Podrían permitir la detección de proteínas y ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades, facilitando la amplificación de la señal. Pueden usarse ácidos nucleicos catalíticos y/o reacciones en cascada para aplicaciones diferentes del diagnóstico, como por ejemplo en el campo del análisis computacional y la ingeniería biomolecular de dispositivos a nano-escala e interruptores que podrían usarse en técnicas terapéuticas.

10 **11. Métodos que permiten alternar entre estados activos e inactivos de complejos de MNA al retirar componentes como el inhibidor de la actividad o el facilitador del ensamblaje.**

15 [0178] Puede lograrse una transición entre MNAzimas activas y complejos MNA inactivos, o viceversa, mediante la provisión o eliminación de componentes complejos de MNA, incluyendo, entre otros, uno o más inhibidores de la actividad, facilitadores de ensamblaje, inhibidores de ensamblaje, partzimas o brazos estabilizadores o algunas de sus partes. En algunas representaciones, el inhibidor de la actividad puede incluir un enlazador lábil o divisible o un sustrato, que podría estar situado entre dos o más dominios dentro del inhibidor de la actividad, por ejemplo un dominio inhibidor de la actividad y un dominio facilitador de activador de ensamblaje. La división en la ubicación del enlazador puede permitir la separación de un dominio inhibidor de la actividad desde un dominio inhibidor activador del ensamblaje, que podría entonces funcionar como componente facilitador y guiar el ensamblaje de una MNAzima activa. La división del enlazador puede conseguirse por varios métodos, incluyendo, entre otros, la división de MNAzima, división de enzima de proteína o la hidrólisis inducida por los cambios en el pH y o la temperatura.

25 [0179] De forma alternativa, el inhibidor de ensamblaje y/o facilitador del ensamblaje podría eliminarse de forma selectiva mediante un proceso que implica la migración de la ramificación y/o complementariedad de los componentes oligonucleótidos. Los oligonucleótidos moduladores que funcionan a través de la complementariedad, pueden hacerlo alterando la estructura secundaria de oligonucleótidos a la que se unen. En algunas representaciones, esto podría tener como resultado una conformación alternativa donde una secuencia de activador ahora permite ensamblarse con otros componentes para formar MNAzimas activas. A modo de ejemplo, un dicho oligonucleótido modulador podría causar la interrupción de estructuras intramoleculares como horquillas que limitan las moléculas activadoras en configuraciones no funcionales.

35 [0180] En algunas representaciones, un componente de MNA como un inhibidor incluido, pero no solo, un inhibidor de la actividad o inhibidor del ensamblaje, podría unirse a otras entidades. En algunas representaciones, el componente se une a una nanopartícula de oro acoplada a un campo magnético de radiofrecuencia. Esto permite el control remoto electrónico de la hibridación, con el campo magnético de radiofrecuencia funcionando como antena que permite la desnaturalización termal reversible de oligonucleótidos específicos, mientras apenas afecta a las moléculas circundantes. En algunas representaciones, el componente puede estar marcado con biotina para facilitar la captura y el aislamiento físico del componente.

40 **12. Kits**

45 [0181] También se muestran kits para practicar los métodos descritos en el presente documento. Normalmente, los kits para poner en práctica estos métodos contienen todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la metodología. Por ejemplo, en una de las representaciones un kit podría comprender un primer contenedor que contendría un complejo de MNA inactiva, como una MNAi, mientras que la activación de dicho complejo de MNA para formar una MNAzima necesita la anulación de la inhibición de la actividad catalítica a través de la exposición del complejo inactivo de MNA a un activador, mientras dicho activador anula la influencia inhibitoria de un inhibidor. Por ejemplo, en una de las representaciones un kit podría comprender uno o más componentes para la formación del complejo inactivo de MNA en contenedores separados.

55 [0182] En una de las representaciones, un kit podría comprender un primer contenedor con componentes para un complejo de MNA inactivo, mientras que la activación de dicho complejo de MNA para formar una MNAzima necesita la activación de la actividad catalítica a través de la exposición del complejo de MNA a un activador por los métodos aquí descritos.

60 [0183] Normalmente, los kits también comprenden uno o más contenedores, con, por ejemplo, reactivos de lavado, y/o otros reactivos como los necesarios para poner en práctica los métodos del invento.

65 [0184] Un kit compartimentado incluye cualquier kit en el que los reactivos se incluyen en contenedores separados y podrían incluir contenedores pequeños de cristal, contenedores plásticos o tiras de plástico o papel. Dichos contenedores podrían permitir la transferencia eficiente de los reactivos de un compartimento a otro mientras se evita la contaminación cruzada de las muestras y los reactivos y la adición de agentes o soluciones de cada contenedor de un compartimento a otro de forma cuantitativa. Dichos kits podrían incluir también un contenedor que

aceptará la muestra de la prueba, un contenedor que tiene los reactivos que se usan en esta prueba, los contenedores que contienen reactivos de lavado y los contenedores que tienen un reactivo de detección. Normalmente, un kit también incluirá instrucciones para usar los componentes del kit para llevar a cabo los métodos adecuados. Los kits y los métodos pueden usarse en conjunto con los equipos y sistemas de análisis automatizado, que incluyen, entre otros, máquinas de PCR a tiempo real.

[0185] Para su aplicación para la detección, identificación o cuantificación de diferentes dianas o eventos, podría aplicarse un único kit o de forma alternativa podrían necesitarse kits diferentes, que por ejemplo contuviesen reactivos específicos para cada diana. Los métodos y los kits se aplican en cualquier circunstancia en la que se desee detectar, identificar o cuantificar cualquier entidad o evento.

[0186] El presente invento se describirá a continuación en más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos, lo que no podría en ningún caso interpretarse como limitador del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

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

[0187] En este ejemplo, las MNAzimas se ensamblaron en presencia de un facilitador del ensamblaje de la partzima A, y la partzima B que contenían dos componentes, en concreto un componente de partzima con un brazo sensor truncado y un componente que funciona como brazo estabilizador. El ensamblaje de la MNAzima se da a través de un sistema de reconocimiento de base Watson-Crick de los brazos sensores de la partzima y la secuencia del facilitador de ensamblaje. En el siguiente ejemplo, se demuestra el uso de un brazo truncado de partzima y un brazo estabilizador.

[0188] La estrategia de detección de la MNAzima que se usa en este ejemplo se ilustra en la Figura 2 (panel (ii)) y en la Figura 3.

[0189] A continuación se describen los oligonucleótidos que se necesitan:

- a) una partzima estándar A;
- b) una partzima B que comprende un primer componente que contiene un brazo de sustrato, un núcleo catalítico parcial y un brazo sensor truncado; y un segundo componente de brazo estabilizador, que se hibrida con el facilitador del ensamblaje, adyacente al brazo sensor truncado de la partzima. Este brazo estabilizador está diseñado para facilitar el ensamblaje de la MNAzima cuando el brazo sensor truncado de la partzima se hibrida con el facilitador del ensamblaje; y
- c) un sustrato, por ejemplo un sustrato de sonda marcadora.

[0190] El ensamblaje de la MNAzima activa también necesita la presencia de un facilitador del ensamblaje.

1.1. Oligonucleótidos de partzima y brazo estabilizador

[0191] En este ejemplo, el brazo sensor truncado de la partzima B solo tenía 5 nucleótidos de largo. Las secuencias de la partzima A y los dos componentes de partzima B se muestran a continuación (5' a 3'). En las siguientes secuencias las bases en **negrita** se hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, y las bases en *cursiva* se hibridan con el sustrato. La "-P" indica 3' fosforilación del oligonucleótido.

SEQ ID NO: 1 Partzima A4 Xd-P:

ACTGGATGTCCATCTGTCTGACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 2 Partzima B5 Xd-P componente 1:

TGCCAGGGAGGCTAGCTTATAC-P

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

CTTCGTGAGGGTGAG-P

1.2. Sustrato marcador

[0192] El sustrato marcador que se ha usado en este ejemplo es SubBi-2 marcado con una fracción de 6-FAM en el extremo de 5', una fracción de BHQ1 en el extremo de 3' y designado SubBi-2-FB. La división de SubBi-2-FB se ha supervisado a 520 nm (longitud de onda de emisión FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación FAM). La secuencia de SubBi-2-FB se indica a continuación (5' a 3'); las bases de la casilla inferior representan el

ARN y las casillas de base superior representan el ADN.

SEQ ID NO: 4 SubBi-2-FB:

5 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

1.3. Molécula facilitadora del ensamblaje

10 **[0193]** La secuencia del oligonucleótido sintético que se usa como facilitador de ensamblaje se muestra a continuación (5' a 3'). Este facilitador del ensamblaje se correspondía por completo con el brazo sensor de la partzima B. Se ha usado agua libre de nucleasa en lugar del facilitador del ensamblaje de la diana como control "sin diana".

15 SEQ ID NO: 5 Facilitador del ensamblaje Xd-T:

TGCCCCCTCACCTCACGAAGGTATACAGACAGATGGACATCCAGTTGGTGA

1.4 Condiciones de la reacción

20 **[0194]** Se ha medido la detección del facilitador del ensamblaje por un aumento en la señal fluorescente causado por la división del sustrato marcador por parte de la MNAzima activa catalíticamente. Se iniciaron las reacciones por 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 FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). La fluorescencia para cada una de las reacciones se leyó cada 2 segundos durante un total de 5 minutos. Todas las reacciones contenían 200 nM A4Xd-P, 200 nM B5Xd-P, 1 x PCR Buffer II (Biosistema Aplicado) y 25 mM MgCl₂. Además, las reacciones contenían oligonucleótidos como los que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos adicionales en las reacciones de MNAzima.

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

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

40 **[0195]** Cuando se incluyeron en la reacción tanto el facilitador del ensamblaje como un componente de brazo estabilizador de la partzima (Reacción (i): Figura 3), las MNAzimas activas ensamblaron y dividieron el sustrato, teniendo como resultado un aumento de la fluorescencia en el tiempo. En contraste, no ha habido ningún aumento en la fluorescencia en ausencia del facilitador del ensamblaje (Reacción (iii): Figura 3). Además, se ha demostrado que la presencia del brazo estabilizador es esencial para la formación de MNAzimas activas. Una reacción que contenga todos los componentes de la reacción, incluido el facilitador del ensamblaje, pero al que le faltase el componente de brazo estabilizador, no provocó ningún incremento de la fluorescencia en el tiempo (Reacción (ii): Figura 3). De esa forma, las 5 bases del brazo sensor de la partzima B fueron insuficientes para formar un complejo estable de MNAzima pero se demostró que la presencia de un componente de brazo estabilizador es capaz de compensar la corta longitud (truncamiento) del brazo sensor de la partzima y permite la formación estable de MNAzima bajo condiciones rigurosas de temperatura (55°C en este ejemplo). El componente de brazo estabilizador, de esa forma, es un oligonucleótido esencial para el ensamblaje de las MNAzimas activas al sistema, que usa una partzima con un brazo sensor truncado.

55 **[0196]** Además, cuando un facilitador de ensamblaje alternativo, que tenía un desajuste de nucleótido único con el brazo sensor de la partzima, se incluyó en una reacción que contenía la partzima A y los dos componentes de la partzima B, la señal fluorescente no aumentó en el tiempo (no se muestran los datos).

60 **[0197]** Este ejemplo demuestra que las MNAzimas solo podrían formarse en presencia de un facilitador de ensamblaje con correspondencia total de acuerdo con las condiciones del experimento. Alguien experto en la materia podría apreciar que la transición entre una MNAzima activa y el complejo de MNA inactivo puede regularse proporcionando facilitadores del ensamblaje con total correspondencia o no correspondientes. Además, el ejemplo demuestra el uso de partzimas de dos componentes, que comprenden una primera molécula que contiene un brazo sensor truncado y una molécula de segundo brazo estabilizador. El requisito de la presencia de una molécula de brazo estabilizador en dichos sistemas proporciona otra herramienta con la que se pueda regular el ensamblaje de las MNAzimas.

65

5 [0198] Se otorga gran nivel de flexibilidad a los sistemas de MNA que contienen componentes de oligonucleótidos múltiples, cuya secuencia puede adaptarse a respecto de la temperatura de fusión, la composición de la secuencia y la complementariedad o su falta con otros componentes de oligonucleótidos. Son especialmente útiles las secuencias más cortas, incluidos, entre otros, los componentes de partzima con brazos truncados, brazos de estabilizador y componentes de facilitador del ensamblaje.

Ejemplo 2: Regulación del ensamblaje y desensamblaje de los complejos de MNA usando la temperatura y su aplicación a la construcción de un instrumento de nanoescala de ADN para la medición de temperatura.

10 [0199] El ensamblaje y desensamblaje de la MNAzima también puede controlarse por medio de la temperatura. Un aumento o bajada de la temperatura puede proporcionar un mecanismo con el que pasar la actividad catalítica de la MNAzima a "activada" y "desactivada". La sensibilidad de una MNAzima a la temperatura podría usarse para construir termosensores y reóstatos.

15 [0200] Si la temperatura fuese demasiado alta o demasiado baja, para el ensamblaje (hibridación) de los componentes oligonucleótidos, y/o para la actividad catalítica, de una MNAzima, entonces el complejo activo que puede modificar (por ejemplo, dividir) un sustrato no se formaría. Si la temperatura fuese permisiva para el ensamblaje y/o actividad de una MNAzima, se modificaría un sustrato y se generaría una señal.

20 [0201] La capacidad de modificar la temperatura de fusión de los oligonucleótidos del componente (por ejemplo, las partzimas, incluyendo los componentes de brazo estabilizador y/o los facilitadores del ensamblaje) modificando la composición de base y/o la longitud del oligonucleótido, permite que se construyan sistemas que permiten un ajuste más fino de los sistemas de MNAzima. Esto permite que las MNAzimas no solo estén en un estado totalmente "activado" o totalmente "desactivado" sino que más bien permite una gradación de la actividad adecuada para su uso en sistemas de reóstatos. También permite la modulación de la gama de temperatura por encima de la que se da la respuesta de la MNAzima.

25 [0202] Una subida o bajada de la temperatura de una que es incompatible con la actividad de MNAzima a otra compatible con la actividad de MNAzima, sería detectada por una señal generada siguiendo la modificación del sustrato por parte de la MNAzima. La lectura podría ser, por ejemplo, fluorescente o colorimétrica.

30 [0203] Los complejos de MNAzima podrían responder a los cambios de temperatura dividiendo oligonucleótidos de puente, responsables de causar la agregación de nanopartículas de oro. Esto permitiría el desarrollo de un instrumento colorimétrico sencillo, capaz de detectar cambios de temperatura. Alguien experto en la materia apreciaría que los instrumentos sencillos que usan MNAzimas para la medición de temperatura podría aplicarse en muchas industrias incluyendo, por ejemplo, la farmacéutica, alimentaria o agrícola.

35 [0204] Una aplicación podría implicar co-empaquetar un sensor de temperatura de MNAzima con compuestos sensibles a la temperatura o otros. Si el paquete no se almacena de acuerdo con las condiciones adecuadas de temperatura (por ejemplo, refrigerado) las MNAzimas podrían formar y generar una señal, identificando los compuestos como dañados. De forma similar, los alimentos que tienen que permanecer dentro de los límites de temperatura establecidos, por ejemplo, la comida congelada, podrían controlarse con un sensor de temperatura de MNAzima, capaz de identificar la comida que se hubiese descongelado en alguna fase del almacenamiento.

40 [0205] Este ejemplo de uso de temperatura para controlar la actividad catalítica de las MNAzimas demuestra una estrategia general para activar y desactivar la actividad catalítica de las MNAzimas. De esa forma, el ensamblaje y desensamblaje de la MNAzima podría controlarse por varios de los factores que pueden ejercer influencia sobre la tasa catalítica. Dichos ejemplos incluyen, entre otros, la presencia o ausencia de partzimas de componente o facilitadores del ensamblaje, concentración de sal, pH, tipo y concentración de catión divalente, la presencia o ausencia de aditivos y temperatura.

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

45 [0206] Una MNAzima se compone de partzimas, que se ensamblan en presencia de uno o más componentes facilitadores del ensamblaje para formar una enzima activa (por ejemplo, las Figuras 1, 2, 4 (panel lateral derecho), Figura 5 (i) y (ii) y Figura 9 (estructuras del lateral izquierdo)). El facilitador (o facilitadores) del ensamblaje, que se une a los brazos sensores de la partzima, puede ser un analito diana, o una molécula (o moléculas) de ácido nucleico sintético añadido a la mezcla de la reacción para guiar el ensamblaje de la MNAzima. Además de su capacidad para contribuir al ensamblaje de la MNAzima activa, las partzimas pueden ensamblarse en un complejo inactivo, no catalítico, MNAi cuando se hibridan con una molécula "inhibidora de la actividad" (Figura 4 (panel lateral izquierdo), Figura 5 y Figura 9 (estructuras a la derecha de las estructuras de MNAzima)). Se han probado varias secuencias alternativas de oligonucleótidos por su capacidad de regular el ensamblaje de los complejos activos de MNAzima o MNAi.

60 [0207] En este ejemplo (se muestra en las Figuras 4 y 5), se ha examinado el ensamblaje de la MNAzima en presencia de (i) una única molécula (facilitador del ensamblaje F1/2), o (ii) dos moléculas (componente facilitador del

ensamblaje F1 y componente facilitador del ensamblaje F2), cuyas secuencias juntas comprenden las presentes en el facilitador F1/2. El facilitador F2 se une al brazo sensor completo de una partzima y se superpone para unir 4 pares base del brazo sensor de la segunda partzima. En otra reacción, una molécula "inhibidora de la actividad", que tiene una secuencia que incluye la del facilitador F2 más un dominio adicional inhibidor de la actividad, se probó por su capacidad de guiar la reacción hacia el ensamblaje de los complejos de MNAi.

3.1 Oligonucleótidos de partzima

[0208] En las siguientes secuencias, las bases en negrita se hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en cursiva se hibridan con el sustrato. La "-P" indica 3' fosforilación del oligonucleótido.

SEQ ID NO 6: Partzima A RO5A4/2-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTCAACGAGAGGAAACCTT-P

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

TGCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTCCACTTGC-P

3.2 Sustrato marcador

[0209] El sustrato marcador para este ejemplo es SubBi-2-FB con la secuencia, 5' a 3', como se indica. SubBi-2-FB Estaba marcado con una fracción 6-FAM en el extremo 5' y una fracción BHQ1 en el extremo 3'. La división de SubBi-2-FB se ha supervisado a 530 nm (largo de onda de emisión FAM) con excitación a 485 nm (largo de onda de excitación FAM). Las bases de la casilla más baja representan el ARN y la casilla superior representa el ADN.

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

3.3 Oligonucleótidos reguladores.

[0210] En este ejemplo se han probado varias moléculas por su capacidad para regular el ensamblaje de las MNAzimas y/o MNAi. La secuencia, que constituye el facilitador del ensamblaje F2, también se comprende dentro de las secuencias del facilitador F1/2 y el inhibidor de la actividad está en negrita y subrayado.

SEQ ID NO 8: Facilitador del Ensamblaje F1/2:

GCAAGTGGAAGGTGTAATCCGTCT**CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG**

SEQ ID NO: 9 Facilitador del Ensamblaje F1:GCAAGTGGAAGGTGTAATCCGTCT

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

SEQ ID NO: 11 Molécula inhibidora de la actividad:

AAGGTTTCCTCGTCCCTGGGCA**CCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG**

3.4 Componentes de reacción y seguimiento de la actividad de MNAzima.

[0211] El seguimiento a tiempo real de la actividad de MNAzima se llevó a cabo en un fluorómetro BMG LabTech FluoStar en un volumen total de reacción de 50 mL. Las reacciones se siguieron de forma isotérmica a 55°C durante 4 minutos. La reacción se inició por inyección del sustrato fluorescente SubBi-2-FB (10 ml de solución 1 mM) en la mezcla de la reacción que contiene 1x PCR Buffer II (Biosistemas Aplicados), 25 mM MgCl₂, 200 nM de Partzima A RO5A4/2-P 200 nM de Partzima B RO5B5/2-P y (i) 400 nM de Facilitador del Ensamblaje F1/2, o (ii) 400 nM de Facilitador del Ensamblaje F1 y 400 nM de componente Facilitador del Ensamblaje F2, o (iii) 400 nM de inhibidor de la actividad y 400 nM de componente Facilitador del Ensamblaje F1, o (iv) sin facilitador del Ensamblaje.

3.5 Resultados:

[0212] En la Figura 5 se muestran los resultados de las combinaciones de varios oligonucleótidos componentes regulatorios o estructurales. Un aumento rápido en la señal fluorescente, indicativo de una alto nivel de actividad de división de MNAzima, se ha visto en reacciones que contienen el facilitador de ensamblaje F1/2 (Figura 5 (i)), o componentes facilitadores del ensamblaje F1 y F2 (Figura 5 (ii)). No se ha observado ningún aumento en la fluorescencia en el tiempo en ausencia de un facilitador (Figura 5 (iv)). Esto demuestra que un facilitador del ensamblaje no tiene que ser siempre un oligonucleótido intacto, sino que puede dividirse en componentes múltiples del facilitador más pequeños, que podrían alinearse adyacentes unos a los otros en uno de los brazos sensores de

una partzima.

5 **[0213]** No se ha observado ningún aumento en la señal fluorescente en el tiempo en reacciones que contienen el inhibidor de la actividad y el facilitador F1 (Figura 5 (iii)). En vista de que la molécula inhibidora de la actividad incluye la secuencia del facilitador F2, la secuencia inhibitoria adicional no-complementaria unida al facilitador F2 es el elemento que guía el ensamblaje de los complejos de MNAi. La MNAi puede unirse a un sustrato pero no puede modificarlo catalíticamente. Como resultado, el sustrato no se ha dividido y la fluorescencia no ha aumentado en el tiempo en la presencia de complejos de MNAi (Figura 5 (iii)). La comparación entre reacciones que contienen los componentes facilitadores del ensamblaje F1 y F2 (Figura 5 (ii)), con los que contienen el facilitador del ensamblaje F1 y el inhibidor de actividad (que incorpora la secuencia F2)(Figura 5 (iii)), demuestra que la presencia de un dominio inhibitorio dentro de un inhibidor de la actividad puede proporcionar una herramienta con la que regular la actividad enzimática guiando el ensamblaje de complejos MNAi y evitando la formación de MNAzimas activas.

15 **[0214]** De esa forma una MNAzima, diseñada para formarse en presencia de un facilitador de ensamblaje F1/2, generó fluorescencia. El ejemplo demostró que el facilitador del ensamblaje F1/2 podría dividirse en dos partes (componentes facilitadores del ensamblaje F1 y F2) y retener la capacidad de guiar el ensamblaje de MNAzimas activas catalíticamente. Juntos, los dos componentes facilitadores del ensamblaje, pueden estabilizar la formación de MNAzima activa y provocar fluorescencia, en vista de que se unen adyacentes unas de las otras en el brazo sensor de la partzima. Los experimentos posteriores, que se llevan a cabo en condiciones de reacción idénticas, demostraron que no se ha observado ningún aumento en la fluorescencia en el tiempo en presencia solo del componente facilitador del ensamblaje F2 (no se muestran los datos). De esa forma, este ejemplo demuestra que el ensamblaje de las partzimas en MNAzimas activas puede necesitar de la presencia de múltiples componentes facilitadores del ensamblaje. Cuando se necesitan facilitadores del ensamblaje multi-componente, puede usarse la presencia o ausencia de uno o más de esos componentes para controlar el ensamblaje de las MNAzimas activas y de esa forma activarlas y desactivarlas.

25 **[0215]** También se ha descubierto que una molécula inhibidora de la actividad podría evitar el ensamblaje de MNAzima hibridándose a una partzima e interrumpiendo la estructura secundaria en la unión de los dos componentes facilitadores del ensamblaje de un brazo sensor de partzima que es necesario para la actividad enzimática (ver las Figuras 4 y 5 como ejemplos). Un experto en la materia apreciaría que se podría designar a una molécula inhibitoria para hibridarse a la partzima A o la B, y al sensor o al brazo de sustrato de la partzima.

35 **[0216]** Pueden usarse moléculas, entre las que se incluyen inhibidores de la actividad, componentes de brazo estabilizador de la partzima y facilitadores del ensamblaje de MNAzimas activas e inactivas como una MNAi. La transición entre los estados de activación ((MNAzima) y desactivación (como la MNAi) pueden proporcionar un mecanismo para crear un interruptor molecular, que puede regularse alternando entre las configuraciones activa e inactiva. Dichos interruptores moleculares podrían aplicarse al control de las cascadas de replicación del ácido nucleico (Figura 6, Ejemplo 4), o a la regulación de instrumentos autónomos terapéuticos, de diagnóstico o de escala molecular informática. En este documento se analizan varios protocolos que pueden usarse para inducir la disociación de un componente de oligonucleótido específico.

Ejemplo 4: Señal en cascada usando ADN (SCUD).

45 **[0217]** Uno de los mecanismos para la generación de una cascada de replicación de MNAzima diseñado para la detección de analito diana usa la estrategia de cascada SCUD. La estrategia SCUD puede incorporarse en cascadas de una amplia variedad de diseños como se ilustra, a modo de ejemplo, en la Figura 6, donde se incorporan dos complejos de MNA; en la Figura 10, donde se incorporan tres complejos de MNA; y en la Figura 11, donde se han incorporado tanto complejos de MNA como una DNAzima en una reacción en cascada.

50 **[0218]** El método SCUD depende de la capacidad de controlar el ensamblaje de las MNAzimas activas y MNAi a los componentes oligonucleótidos que están presentes en la mezcla. En la Figura 6 se detalla un formato de SCUD. Este ejemplo de SCUD describe un método general para la amplificación de la señal.

55 **[0219]** Un esquema del método, conocido como SCUD (Señal en cascada usando ADN), tal y como se ilustra en la Figura 6 contiene los siguientes componentes:

(i) un RIF doblemente marcado (Marcador-Inhibidor-Facilitador) que contiene tres áreas;

- 60 a. un dominio inhibidor/marcador (RI) de la actividad que tiene las funciones duales de inicialmente ser un inhibidor de la actividad cuando se incorpora a un RIF y en segundo lugar proporcionar una señal fluorescente cuando se divide el RIF y
- b. un componente facilitador del activador del ensamblaje F2b que forma un componente esencial de MNAzima 2a,
- 65 c. un dominio de sustrato ubicado entre los dominios de RI y F2b, que podría ser dividido por parte de la MNAzima 1a o la MNAzima 2a,

- 5 (ii) un componente facilitador del ensamblaje F2a
 (iii) partzimas capaces de formar estructuras activas de MNAzima 1a solo en presencia del facilitador del ensamblaje F1, que podría ser, a modo de ejemplo, un ácido nucleico diana presente en una muestra de test; al ser la MNAzima 1a activa capaz de dividir RIF en componentes RI y F2b, generando así fluorescencia, negando el efecto inhibitorio de la actividad de la MNAzima y en consecuencia generando un nuevo componente facilitador del activador del ensamblaje F2b.
- 10 (iv) partzimas capaces de formar complejos de MNAzima 2a activa solo cuando los brazos de la partzima unan el componente facilitador del ensamblaje F2a adyacente al componente facilitador del activador ensamblaje liberado F2b. La MNAzima 2a podría, a su vez, dividir más RIF liberando más RI y F2b, creando de esa forma una cascada de auto replicación de MNAzima 2a y como consecuencia la amplificación de señal fluorescente.

15 **[0220]** En ausencia de F1, que a modo de ejemplo podría ser un ácido nucleico diana, las partzimas para MNAzima 2a formarían un complejo inactivo, MNAi 2i, con RIF intacto. En presencia del analito diana, se formaría la MNAzima 1a activa, dividiendo así el RIF y liberando un componente facilitador del activador del ensamblaje F2b que entonces estaría libre para asociarse y convertirse en componente de una MNAzima 2a activa. Ya que la MNAzima 2a puede además liberar más RIF, esto iniciaría la cascada de replicación/amplificación de la señal.

20 **[0221]** Cada vez que una MNAzima 2a divide una molécula RIF, se generan más componentes (facilitadores del ensamblaje del activador F2b) necesarios para la formación de nuevas MNAzimas 2a. La cascada de la MNAzima tiene como resultado el ensamblaje de complejos de MNAzima 2a que son idénticos a la MNAzima matriz usando componentes que son los productos generados por la actividad catalítica de la MNAzima 2a. De esa forma, el producto de la división de la MNAzima (F2b) es capaz de guiar el ensamblaje de moléculas de MNAzimas (matriz) en sistema de auto replicación que es autocatalítico.

25 **[0222]** SCUD podría ser iniciado por medio de dianas de ácido nucleico (ADN/ARN) u otros analitos diana (proteínas, pequeñas moléculas, etc), si la estrategia de SCUD estuviese relacionada con un sistema de apta-MNAzima. Ya que la reacción solo se inicia en presencia de analitos diana, proporciona una técnica para la detección y/o identificación de analitos diana. El método se basa en la transición entre estados de inactivación y activación de complejos de ácido nucleico multicomponente. A diferencia de las técnicas de amplificación de diana como la reacción de cadena de polimerasa o la reacción de cadena de ligasa, la replicación de MNAzima y la amplificación de señal por SCUD no necesita enzimas de proteína para facilitar el proceso. Además, la capacidad de controlar y regular la actividad catalítica de MNAzima usando varios componentes oligonucleótidos, como componentes de brazo estabilizador o componentes de facilitador de ensamblaje permiten que el ensamblaje de las MNAzimas se regule de forma estricta por las condiciones y compuestos del microambiente.

30 **Ejemplo 5: Aplicación de MNAzimas para detectar analitos de ácido no-nucleico, incluidas pequeñas moléculas como el trifosfato de adenosina 5'.**

35 **[0223]** Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN de cadena única evolucionadas *in vitro* a partir de grandes reservas de oligonucleótidos de secuencia aleatoria por su capacidad para unir analitos diana con un alto nivel de alta afinidad y especificidad. Se han seleccionado los aptámeros por su capacidad para unirse específicamente a muchos tipos de analitos, entre los que se incluyen las proteínas, carbohidratos, lípidos, nucleótidos, células completas y virus. En este ejemplo, se incorporó una secuencia de aptámero al extremo de una partzima (apta-partzima) en una configuración mediante la cual una apta-MNAzima activa solo se formó en presencia del ligando activador. Hay varias maneras de conseguir este objetivo, incluida la estrategia usada en el ejemplo siguiente, que se ilustra en la Figura 7.

40 **[0224]** Los oligonucleótidos de ácido nucleico que se incluyen en esta estrategia de detección de apta-MNAzima a modo de ejemplo, se ilustran en la Figura 7 e incluyen;

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

50 **[0225]** En ausencia de un ligando activador (Figura 7, panel (i)), el oligonucleótido inhibidor del ensamblaje se une a la apta-partzima evitando que se una al sustrato. En presencia de un ligando activador (Figura 7, panel (ii)), el ligando activador puede interactuar con la secuencia de aptámero de la apta-partzima, evitando la unión del inhibidor de ensamblaje y permitiendo que se ensamble una apta-MNAzima activa, y a continuación se una y divida el

sustrato. De esa forma, las apta-MNAzimas solo pueden formar y provocar la generación de señal fluorescente en presencia de un ligando activador.

5 [0226] Se demostró la estrategia usando la detección de una pequeña molécula, ATP. La secuencia de aptámero con longitud de 27 nucleótidos que se usa en este ejemplo ha sido previamente calificada como altamente específica para la unión de ATP y dATP (Achenbach, 2005, Huizenga y Szostak, 1995).

5.1 Oligonucleótidos de partzima, oligonucleótidos facilitadores e inhibidores del ensamblaje

10 [0227] En este ejemplo, la secuencia de aptámero ATP se ha anexo al brazo de sustrato de una partzima, para producir una molécula de apta-partzima (Figura 7). Los brazos sensores de la apta-partzima y la partzima estándar se diseñaron para unirse a un facilitador sintético del ensamblaje, incluido en la reacción para guiar el ensamblaje de MNAzimas cuando estén presentes las dianas o analitos reguladores. Las secuencias de apta-partzima AtpA2/1 y partzima AtpB3/1 se muestran a continuación (5' a 3'). En las siguientes secuencias, las bases en **negrita** se hibridan con el facilitador del ensamblaje, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* se hibridan con el sustrato. Además, las bases en texto normal en la partzima AtpA2/1 indican una secuencia de aptámero de ADN que puede unirse a ATP o dATP.

20 SEQ ID NO: 12 Apta-Partzima A2 AtpA2/1:

AACGTACACTGCACGCGGTCGAAATAGTGAGTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT

SEQ ID NO: 13 Partzima B3 AtpB3/1:

25 *CATCTCTTCT*CCGAGCGTCTGTACCGTGTAC

[0228] A continuación se muestra la secuencia del facilitador del ensamblaje (5' a 3')

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

30 [0229] A continuación se muestra la secuencia del oligonucleótido "inhibidor del ensamblaje" (5' a 3').

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

35 5.2 Sustrato marcador

[0230] La actividad de apta-MNAzima se ha monitorizado por medio de la división de un sustrato de ácido nucleico marcador doblemente marcado. El sustrato marcador para este ejemplo es SubBi-1-FB con la secuencia 5' a 3' como se indica. La base de la casilla inferior representa el ARN y las bases de la casilla superior representan el ADN. Las bases subrayadas indican la posición de una fracción de 6-FAM en el extremo de 5' y una fracción de BHQ1 en el extremo de 3'. Los cambios en la fluorescencia debido a la división de SubBi-1-FB en el ribonucleótido entre FAM y BHQ1 se monitorizaron a 520 nm (longitud de onda de emisión FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación FAM).

45 SEQ ID NO: 16 SubBi-1-FB: ACTCACTATAGGAAGAGATG

5.3 Analitos diana o regulatorios y moléculas de control

50 [0231] Los ligandos activadores que se han usado para este ejemplo eran la adenosina 5'-trifosfato (ATP) y desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP). Se usó guanosina 5'-trifosfato (GTP) y citosina 5'-trifosfato (CTP) como moléculas de control negativo. Todas las moléculas se adquirieron a Bioline. Se usó agua libre de nucleasa como control de no analito.

5.4 Condiciones de la reacción

55 [0232] La presencia del ligando activador se midió por medio de un incremento de la señal fluorescente causada por la división del sustrato marcador por la apta-MNAzima activa catalíticamente. Las reacciones se iniciaron por medio de la adición de sustrato y el volumen total de todas las reacciones fue de 50 mL. Anterior a 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 FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). Se hizo una lectura de la fluorescencia para cada reacción cada 3 segundos durante un total de 10 minutos. Cada reacción contenía una concentración final de 200 nM AtpA2/1, 200 nM AtpB3/1, 200 nM AtpC/1, 200 nM AtpR/1, 200 nM SubBi-1-FB, 25 mM MgCl₂, 50 mM Tris HCl pH 7.5 y 2 mM de ATP, o dATP, o GTP, o CTP o ningún analito (control de agua).

65 5.5 Resultados: Detección y división de sustrato marcador de SubBi-1-FB

5 [0233] En ausencia de ATP o dATP se ha visto un nivel bajo de fluorescencia que no aumentaba en el tiempo, demostrando que en ausencia de ATP, el inhibidor de ensamblaje evitaba el ensamblaje de complejos activos de apta-MNAzima/sustrato. En presencia de ATP o dATP, la señal fluorescente fue mayor y aumentó con el paso del tiempo. Esto indica que el oligonucleótido inhibidor ha sido desplazado por dATP y ATP y se ha formado una apta-MNAzima activa. El ensamblaje de la apta-MNAzima ha sido dependiente del ligando. En presencia de GTP o CTP, se ha visto un bajo nivel de fluorescencia que no incrementó al pasar el tiempo. La fluorescencia que se ha observado en presencia de GTP o CTP ha sido similar a la observada en ausencia de ATP o dATP, por ejemplo en el control de agua sin ligando. Este ejemplo demuestra que las MNAzimas pueden adaptarse a los aptámeros para la detección de analitos en un enfoque que tiene un alto nivel de especificidad para el analito diana. Este ejemplo también demuestra que puede usarse una molécula inhibidora del ensamblaje para controlar el ensamblaje de las apta-MNAzimas y que ATP puede servir como ligando del activador o regulador molecular en este sistema.

15 [0234] Alguien experto en la materia reconocería 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 parciales del núcleo catalítico. De esa forma, el inhibidor del ensamblaje puede unirse al área del aptámero y al brazo de sustrato (que une el sustrato) o al brazo sensor (que une el facilitador del ensamblaje). El diseño anterior (Figura 7 y este ejemplo), el inhibidor bloquea la unión del sustrato. En el diseño posterior, el inhibidor evitaría la unión del facilitador del ensamblaje con la apta-partzima y por lo tanto evitaría el ensamblaje de las MNAzimas activas.

20 [0235] Los estudios contienen secuencias para un número mayor de aptámeros capaces de detectar muchos tipos de analitos. Estos incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos, priones, nucleótidos, células completas y virus. Los aptámeros de todos esos tipos de analitos podrían estar unidos a partzimas para detectar una gama muy amplia de moléculas. Las condiciones de reacción (regulador, temperatura, concentración de catión divalente, etc), que son compatibles tanto con la unión de analitos con aptámeros (o apta-partzimas) como con la división de un sustrato marcador por parte de una MNAzima, pueden determinarse por medio de pruebas empíricas.

25 [0236] La actividad de MNAzima puede modularse por medio de la retirada o adición del inhibidor del ensamblaje. La modificación de la secuencia de oligonucleótido, la temperatura de fusión y o la concentración pueden conseguir una regulación más ajustada. La hibridación del inhibidor del ensamblaje dentro de una MNA se ve afectada por muchos factores, incluyendo, entre otros, la concentración de sal, concentración de catión, temperatura y la presencia o ausencia de aditivos (por ejemplo, DMSO). De esa forma, las entidades que afectan a la hibridación pueden proporcionar una herramienta de control del ensamblaje y desensamblaje de los complejos de MNA.

30 [0237] El facilitador del ensamblaje, inhibidor del ensamblaje u otros componentes de MNA pueden retirarse por medio de manipulación física, por ejemplo, usando las propiedades físicas o las fracciones anexadas como "ganchos" moleculares, y/o usando las propiedades inherentes de los oligonucleótidos, por ejemplo, la carga negativa, o la complementariedad de la secuencia.

35 **Ejemplo 6: Un interruptor molecular, que usa DNAzima con actividad de ligasa y una MNAzima con actividad de división.**

40 [0238] Un interruptor molecular que usa las actividades catalíticas de dos enzimas de ADN se esquematiza en la Figura 8. La primera reacción se ve mediada por una MNAzima que puede dividir un ARN que contiene oligonucleótido en productos de 2',3'- fosfato cíclico y 5'-hidroxil. La segunda reacción está mediada por una ligasa de DNAzima, que puede ligar productos 2',3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxil. Se conocen ejemplos de dichas DNAzimas e incluyen, a modo de ejemplo, las ligasas "7Z81" y "7Z48" (Prior *et al*, 2004).

45 [0239] En el formato más sencillo, oligo ½ puede ser dividido por una MNAzima en productos de división oligo 1 y oligo 2, regenerando de este modo productos 2', 3'-cíclico fosfato y 5'-hidroxilo, que pueden participar en una ronda posterior de ligado. Una ligasa de DNAzima puede entonces usar los productos de división como sustratos para la ligación. Un DNAzima puede ligar el primer producto de oligonucleótido (oligo 1) a un segundo producto oligonucleótido (oligo 2) para crear un producto de ligación que tenga la misma secuencia que oligo 1/2.

50 [0240] En un formato múltiple, podrían escindirse varios oligonucleótidos, por ejemplo, cuatro oligonucleótidos, por medio de una MNAzima en productos con 2', 3'-fosfato cíclico y un término 5'-hidroxilo. Podrían ligarse por un conjunto de 16 ligasas de DNAzima en 16 nuevos productos de ligación única (es decir, cada combinación de oligonucleótidos 1, 2, 3 y 4).

55 [0241] Otras MNAzimas podrían dividir uno o más de los 16 productos de ligación oligos en ubicación (o ubicaciones) distintas de la unión original entre oligonucleótidos 1, 2, 3 y/o 4, siempre que se cumplan los requisitos mínimos de secuencia para la división de MNAzima. Por ejemplo, la MNAzima del ejemplo 1 necesita la presencia de un ribonucleótido de purina pirimidina en la ubicación de la división dentro del sustrato.

60 [0242] Un conjunto de MNAzimas podría usar un facilitador de montaje común y/o la MNAzima puede utilizar los

productos de ligación de rondas de ligación anteriores como facilitador de ensamblaje. De esa forma, la MNAzima puede reconocer "leer" nuevos datos (entrada) producidos por la unión de oligonucleótidos. La MNAzima entonces puede dividir la "escritura" para producir un nuevo producto de salida, y/o información. Los sistemas en los que las MNAzimas pueden leer los productos de ligación de entrada y luego dividir oligos de productos, diferentes de los que estaban originalmente en el grupo de moléculas de partida, pueden usarse para reescribir o recodificar nuevas secuencias de salida.

[0243] En algunas representaciones, la ligación por una DNAzima puede "escribir" datos de entrada, por ejemplo, haciendo nuevos facilitadores de ensamblaje o componentes de los mismos. Una MNAzima puede "leer" los datos, preguntando la información codificada en el facilitador de montaje usando los brazos sensores de partzima. La MNAzima puede entonces "escribir" los datos, por ejemplo, una nueva secuencia (un producto de división) creando así nuevos datos de salida que luego pueden ser "leídos" por una ligasa DNAzima (determinando la idoneidad de los productos de escisión de MNAzima para servir como sustratos para la ligasa DNAzima).

[0244] De esta forma, esta cascada de ligasa de MNAzima/DNAzima puede formar un autómata. Dichos dispositivos son capaces de convertir la información de una forma a otra, de acuerdo con un procedimiento definido. En este caso, los procedimientos se codifican y guían por los brazos de sustrato y/o los brazos sensores de las ligasas MNAzima y DNAzima.

[0245] Un autómata, capaz de resolver problemas informáticos fue desarrollado por Benenson *et al*, 2001, usando ADN y enzimas de proteína (una endonucleasa de restricción y una ligasa). La endonucleasa de restricción dividió el ADN de doble cadena y la ligasa de proteína ligó los productos de división en una reacción en cascada. Las enzimas de proteínas sirvieron como "hardware" y el ADN codificó el "software". La entrada y el autómata se programaron con la selección de las secuencias de software de ADN adecuadas. El autómata procedió a través de una cascada de división de restricción de endonucleasa, ciclos de hibridación y ligado, produciendo una molécula de salida detectable que codificaba el estado final del autómata y de esa forma se obtenía el resultado computacional (Benenson *et al*, 2001).

[0246] La cascada de ligasa de MNAzima/DNAzima podría usarse de forma similar a la cascada utilizada por Benenson *et al* (2001) y de esa forma proporcionar un dispositivo capaz de resolver problemas de cálculo. A diferencia del dispositivo de Benenson, una cascada de ligasa de MNAzima/DNAzima no necesita enzimas de proteínas para lograr los mismos resultados. Mientras que el dispositivo de Benenson se programó con ADN bicatenario, una cascada de ligasa de MNAzima/DNAzima sería codificada por las diversas secuencias, incluyendo, por ejemplo, el oligonucleótido (o oligonucleótidos) inicial de entrada, los brazos de sustrato y/o los brazos sensores de las MNAzimas y los brazos de sustrato de ligasas DNAzima.

[0247] En otra representación, la cascada de ligasa de MNAzima/DNAzima también podría usarse para "ordenar aleatoriamente" secuencias de oligonucleótidos como método de construcción y/o aumentar la diversidad de conjuntos moleculares.

[0248] En una representación, pueden usarse ligasas de DNAzima para crear o destruir componentes de MNAzima y o MNAs inactivas. A modo de ejemplo, una ligasa de ADN podría anexar un "inhibidor de la actividad" a un "componente facilitador del ensamblaje", teniendo como resultado el ensamblaje de MNAi (estado "desactivado"). De forma alternativa, una ligasa de DNAzima podría anexar un brazo sensor de sustrato a un componente de partzima para crear un interruptor "activado" para las MNAzimas promoviendo el ensamblaje tal y como se ilustra en la Figura 11 aspectos (ii) y (iv). En otra representación, la ligasa de DNAzima puede anexar una secuencia marcada con una fracción que permita la captura selectiva de los oligonucleótidos, por ejemplo usando un grupo de biotina o la fracción podría contener una radio de campo magnético de radio frecuencia para facilitar el control remoto electrónico de la hibridación. Este enfoque permitiría la retirada selectiva de componentes de moléculas que permitan la activación o inhibición de la actividad enzimática. Por ejemplo, el inhibidor de la actividad puede desnaturalizarse de forma selectiva de un complejo de MNAi permitiendo la transición al estado activo de MNAzima.

[0249] En algunas representaciones la ligación por parte de una DNAzima puede "escribir" datos de entrada, por ejemplo, haciendo nuevos facilitadores de ensamblaje, o componentes de los mismos. Una MNAzima puede "leer" los datos, preguntando la información codificada en el facilitador de ensamblaje por medio de los brazos sensores partzima. La MNAzima puede entonces "escribir" los datos, por ejemplo, una nueva secuencia (un producto de división) creando así nuevos datos de salida que a continuación pueden ser "leídos" por ligasas DNAzima adicionales al determinar la idoneidad de los productos de escisión de MNAzima para servir como sustrato.

Ejemplo 7: Una estructura a modo de ejemplo para una MNAzima e interruptor molecular MNAi.

[0250] El facilitador de ensamblaje necesario para la formación activa de MNAzima puede comprender dos o más componentes oligonucleótidos. La presencia o ausencia de un oligonucleótido inhibidor de la actividad puede promover la formación de estructuras de MNAi. Alguien experto en la materia, reconocerá que existen muchos diseños para dichas MNAzimas y MNAis. Se muestran algunos ejemplos de estructuras de MNAzima activa en la Figura 9 (Paneles A a D; estructuras del lado izquierdo). Se muestran ejemplos de estructuras de MNAi en la Figura

9 (Paneles A a D; estructuras a la derecha de las MNAzimas activas). Este ejemplo demuestra las estructuras ilustradas in la Figura 9 panel B estructuras c (MNAzima) y d (MNAi).

5 **[0251]** La MNAzima que se usa en este experimento se ha hecho a partir de las partzimas RO5A4/2 y 5FAC2B5(6)/2(16), que están diseñadas para dividir el sustrato marcador SubBi-2-FB siguiendo el ensamblaje guiado por dos oligonucleótidos llamados Facilitador del Ensamblaje 1 (FAC2) y Facilitador del Ensamblaje 2 (d6p-1). Este experimento también muestra que la formación de complejos que comprenden un inhibidor de la actividad produce complejos MNAi.

10 **7.1 Oligonucleótidos de partzima**

15 **[0252]** En las siguientes secuencias, las bases en **negrita** se hibridan con la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico diana (o facilitador del ensamblaje), las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, y las bases en *cursiva* se hibridan con el sustrato.

SEQ ID NO: 17 Partzima A RO5A4/2:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT

20 SEQ ID NO: 18 Partzima B 5FAC2B5(6)/2(16):

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCTGTCCGAGGCGTGAT

25 **7.2 Sustrato marcador**

30 **[0253]** El sustrato marcador de este ejemplo fue SubBi-2-FB con la secuencia 5' a 3', como se indica. SubBi-2-FB estaba marcado con una fracción 6-FAM en el extremo 5' y una fracción BHQ1 en el extremo 3'. La división de SubBi-2-FB se monitorizó a 530 nm (longitud de onda de emisión FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación FAM). Las bases en minúscula representan el ARN y las bases en mayúscula representan el ADN.

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

35 **7.3 Oligonucleótidos facilitadores e inhibidores de la actividad.**

40 **[0254]** Las secuencias de los facilitadores del ensamblaje que se han utilizado se detallan entre 5' a 3'. Las bases en minúscula representan el ARN y las bases en mayúscula representan el ADN. La secuencia en común entre el Facilitador del Ensamblaje 2 y el Inhibidor de la Actividad están en **negrita**.

[0255] El Inhibidor de la Actividad SubBi-6-TRB se marcó en el extremo con una fracción Texas Red en el extremo 5' y con una fracción BHQ2 en el extremo 3'.

SEQ ID NO: 19 Facilitador del ensamblaje 2 (F2) d6p-1: ATCACGCCTCg

SEQ ID NO: 20 Facilitador del Ensamblaje 1 (F1) FAC2:

GACAGAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

SEQ ID NO: 21 Inhibidor de la Actividad SubBi-6-TRB:

ATCACGCCTCguTCCTCCAG

50 **7.4 Componentes de la reacción y seguimiento de la actividad de MNAzima.**

55 **[0256]** Se llevó a cabo el seguimiento a tiempo real de la actividad de la MNAzima en el SmartCycler (Cepheid) en un volumen total de reacción de 25 mL. Las reacciones se siguieron de forma isotérmica a 52°C durante 30 minutos. Las reacciones se iniciaron con la inyección del sustrato fluorescente SubBi-2-FB (5 ml de solución 1 mM) en la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción contenía 1x PCR Buffer II (Biosistemas aplicados), 50 mM MgCl₂, 200 nM de cada Partzima RO5A4/2 y 5FAC2B5(6)/2(16), 200 nM de facilitador FAC2 y 200 nM del facilitador del ensamblaje 2 (d6p-1) o 200 nM del inhibidor de la actividad (SubBi-6-TRB).

60 **7.5 Resultados:**

65 **[0257]** En este ejemplo, el facilitador del ensamblaje se ha fabricado a partir de dos componentes de oligonucleótidos. La Figura 9 muestra una representación esquemática de la estructura formada por la MNA, en concreto la MNAzima activa (panel B estructura c) y MNAi (panel B estructura d). La MNAzima necesita dos facilitadores del ensamblaje (F1 y F2) y dos partzimas para el ensamblaje. De forma alternativa, el inhibidor de la

actividad (I) puede unirse a las partzimas y formar una estructura de MNAi.

5 **[0258]** En este experimento, la incubación de las partzimas y dos facilitadores el ensamblaje F1 y F2 tuvieron como resultado la formación de MNAzimas activas, que dividieron un sustrato marcador y tuvieron como resultado un aumento de la fluorescencia con el tiempo de aproximadamente 500 unidades (de 400 a 900 unidades). En
10 contraste, la incubación de las partzimas con un facilitador del ensamblaje (F1) y un inhibidor de la actividad (tuvo como resultado la formación de estructuras de MNAi, que no podían dividir el sustrato marcador. Como resultado, solo se observó un nivel bajo de incremento de fondo de la fluorescencia en el tiempo con movimiento de la línea base de aproximadamente 20 unidades (de 390 a 410 unidades). El facilitador del ensamblaje (F2) y el inhibidor de
15 la actividad (I) se unen a las mismas áreas de la partzima ya que contienen secuencias comunes. De todas formas, la secuencia inhibitoria adicional, que está presente en el inhibidor de la actividad, pero no en el facilitador del ensamblaje F2, tiene como resultado la formación de estructuras de MNAi. La retirada de esta secuencia adicional inhibitoria del inhibidor de la actividad puede tener como resultado la generación de un facilitador del activador del ensamblaje F2. De esa forma, la adición o retirada de secuencias inhibitorias proporciona un mecanismo para pasar de MNAzimas activas a MNAi o viceversa.

Ejemplo 8: Una MNAzima y un interruptor molecular MNAi.

20 **[0259]** El facilitador del ensamblaje necesario para la formación de MNAzima activa puede comprender dos o más oligonucleótidos componentes. La presencia o ausencia de un oligonucleótido inhibidor de la actividad puede promover la formación de estructuras de MNAi. Alguien experto en la materia reconocerá que existen varios diseños para dichas MNAzimas y complejos de MNAi. Se muestran ejemplos de estructuras de MNAzima activa en la Figura 9 (Paneles A a D; estructuras del lado izquierdo). Se muestran ejemplos de estructuras MNAi en la Figura 9
25 (Paneles A a D; estructuras a la derecha de las MNAzimas activas). Este ejemplo demuestra las estructuras ilustradas en la Figura 9 panel C estructuras e (MNAzima) y f (MNAi).

30 **[0260]** La MNAzima producida en este experimento se ensambló a partir de dos partzimas (FACA4/6(22) y 5FAC2B5(2)/6(33)) y tres componentes facilitadores del ensamblaje, Facilitador 1 (F1) y Facilitador 2 (F2) y Facilitador 3 (F3). Este experimento también muestra que la formación de complejos que comprenden un inhibidor de la actividad (SubBi-2-FB) y Facilitadores 1 (F1) y (F3) puede producir complejos de MNAi.

8.1 Oligonucleótidos de partzima

35 **[0261]** En las siguientes secuencias las bases en **negrita** se hibridan con secuencia (o secuencias) de ácido nucleico diana (o facilitador del ensamblaje), las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* se hibridan al sustrato.

40 SEQ ID NO: 22 Partzima A FACA4/6(22):

CAAACGAGTCCTGGCCTTGCTACAACGAGAGGCGTGAT

SEQ ID NO: 23 Partzima B 5FAC2B5(2)/6(33):

45 *CTGGGAGGAAGGCTAG*CTGTCCGAGGAAACCTTCGTCCAGACTGCG

8.2 Sustrato marcador

50 **[0262]** El sustrato marcador para este ejemplo fue SubBi-6-TRB con la secuencia 5' a 3' a continuación. SubBi-6-TRB se marcó en el extremo con una fracción de Texas Red en el extremo 5' y con una fracción de BHQ2 en el extremo 3'. La división de SubBi-6-TRB se monitorizó a 610 nm (longitud de onda de emisión de Texas Red) con excitación a 585 nm (longitud de onda de excitación de Texas Red). Las bases en minúscula representan el ARN y las bases en mayúscula representan el ADN.

55 SEQ ID NO: 21 SubBi-6-TRB: ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

8.3 Oligonucleótidos facilitador e inhibidor de la actividad.

60 **[0263]** Las secuencias de los facilitadores del ensamblaje que se usan se indican a continuación de 5' a 3'. La secuencia en común entre el Facilitador del Ensamblaje F2 y el Inhibidor de la Actividad están en **negrita**. Las bases en minúscula representan el ARN y las bases en mayúscula representan el ADN. El Inhibidor de la Actividad SubBi-2-FB estaba marcada en el extremo con una fracción 6-FAM en el extremo 5' y una fracción BHQ1 en el extremo 3'.

65 SEQ ID NO: 24 Facilitador del Ensamblaje F1 STAB: CGCAGTCTGGACGACG

SEQ ID NO: 25 Facilitador del Ensamblaje F2 d2p-1: **AAGGTTTCCTCg**

SEQ ID NO: 4 Inhibidor de la Actividad SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCg_uCCCTGGGCA

5

SEQ ID NO: 20 Facilitador del Ensamblaje F3 FAC2:

GACAGAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

10 **8.4 Componentes de la reacción y seguimiento de la actividad de MNAzima.**

[0264] La supervisión en tiempo real de la actividad de la MNAzima se ha llevado a cabo en el SmartCycler (Cepheid) en un volumen total de reacción de 25 mL. Se hizo el seguimiento isotérmico de las reacciones a 52°C durante 30 minutos. Las reacciones se iniciaron por la inyección del sustrato fluorescente SubBi-6-TRB (5 ml de solución de 1 mM) en la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción contenía 1x PCR Buffer II (Biosistemas aplicados), 50 mM MgCl₂, 200 nM de cada Partzima FACA4/6(22) y 5FAC2B5(2)/6(33), 200 nM del Facilitador F1 STAB, 200 nM del facilitador F3 FAC2 y 200 nM del facilitador de ensamblaje F2 (d2p-1) o 200 nM del inhibidor de actividad (SubBi-2-FB).

15

20 **8.5 Resultados:**

[0265] En este ejemplo, el facilitador del ensamblaje está compuesto de tres componentes oligonucleótidos. La Figura 9 muestra una representación esquemática de la estructura formada por los complejos de MNA, en concreto la MNAzima activa (panel C estructura e) y MNAi (panel C estructura f). La MNAzima necesita tres componentes facilitadores del ensamblaje (F1, F2 y F3) y dos partzimas para el ensamblaje de complejos activos catalíticamente. De forma alternativa, el inhibidor de la actividad (I) puede unirse a las partzimas y formar una estructura MNAi.

25

[0266] En este experimento, la incubación de las partzimas y tres componentes facilitadores del ensamblaje F1, F2 y F3 tuvo como resultado la formación de MNAzimas activas que dividieron un sustrato marcador y tuvo como resultado un aumento de la fluorescencia en el tiempo de aproximadamente 330 unidades (de 140 a 470 unidades). En contraste, la incubación de las partzimas con dos facilitadores del ensamblaje (F1 y F3) y un inhibidor de la actividad (I) tuvo como resultado la formación de estructuras de MNAi, que no consiguieron dividir el sustrato marcador. Como resultado, solo se observó un nivel bajo de aumento de fondo de la fluorescencia en el tiempo y con un flujo de base de aproximadamente 40 unidades (de 80 a 120 unidades). El componente facilitador del ensamblaje (F2) e inhibidor del ensamblaje se unen a las mismas áreas de las partzimas ya que contienen secuencia común. De todas formas, la secuencia inhibitoria adicional que está presente en el inhibidor de la actividad, pero no en el componente facilitador del ensamblaje F2, tiene como resultado la formación de estructuras MNAi. La retirada de esta secuencia inhibitoria adicional del inhibidor de la actividad puede tener como resultado la generación de un componente activador del facilitador del ensamblaje F2. De esa forma, añadir o retirar secuencias de inhibición proporciona un mecanismo para pasar de las MNAzimas activas a las MNAis o viceversa.

30

35

40

Ejemplo 9: Otra MNAzima e interruptor molecular de MNAi.

[0267] El facilitador del ensamblaje necesario para la formación de MNAzima activa puede comprender dos o más componentes oligonucleótidos. La presencia o ausencia de un inhibidor oligonucleótido de la actividad puede promover la formación de estructuras de MNAi. Alguien experto en la materia reconocerá que existen muchos diseños para dichas MNAzimas y complejos de MNAi. En la Figura 9 se muestran ejemplos de estructuras de MNAzima activa (Paneles de A a D; estructuras del lateral izquierdo). En la Figura 9 se muestran estructuras de MNAi (Paneles de A a D; estructuras a la derecha de las MNAzimas activas). Este ejemplo demuestra las estructuras ilustradas en la Figura 9 panel D estructuras g (MNAzima) y h (MNAi).

45

50

[0268] La MNAzima en este experimento estaba conformada por partzimas diseñadas para ensamblarse en presencia de dos componentes facilitadores del ensamblaje F1 y F2 y dividir el sustrato marcador SubBi-2-FB. El brazo sensor de una de las partzimas (4SYNTB6/2(8)) está truncado a 8 bases. Otro oligonucleótido, el Brazo Estabilizador sA (B6/tag(13)), se hibrida con el facilitador del ensamblaje F1 adyacente al brazo sensor truncado de la partzima (4SYNTB6/2(8)) estabilizando el complejo de MNAzima. El facilitador del ensamblaje tiene dos componentes F1 y F2.

55

60 **9.1 Oligonucleótidos de partzima**

[0269] En las siguientes secuencias las bases en **negrita** se hibridan con la secuencia(s) del ácido nucleico diana (o facilitador del ensamblaje), las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada, y las bases en *cursiva* se hibridan con el sustrato.

65

SEQ ID NO: 26 Partzima A 4SYNTA5/2(22):

CAAACGAGTCCTGGCCTTCGAGTACAACGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 27 Partzima B 4SYNTB6/2(8):

5

TGCCAGGGAGGCTAGCGAAACCTT

9.2 Sustrato marcador

10 **[0270]** El sustrato marcador para este ejemplo fue SubBi-2-FB con la secuencia 5' a 3' como se ve a continuación. SubBi-2-FB estaba marcado en el extremo con una fracción 6-FAM en el extremo de 5' y una fracción BHQ1 en el extremo de 3'. La división de SubBi-2-FB se supervisó a 530 nm (longitud de onda de emisión FAM) con excitación a 485 nm (longitud de onda de excitación FAM). Las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN.

15

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

9.3 Oligonucleótidos Facilitador, Inhibidor de la Actividad y Brazo Estabilizador.

20 **[0271]** Las secuencias de los componentes facilitadores del ensamblaje que se usan se encuentran entre 5' y 3'. Las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN. La secuencia en común entre el Facilitador del Ensamblaje 1 y el Inhibidor de la Actividad se muestran en negrita.

25

SEQ ID NO: 28 Facilitador del Ensamblaje F2 (RO5/cA(18)): AAGGCCAGGACTCGTTTG

SEQ ID NO: 29 Facilitador del Ensamblaje F1 (r2p-SYNT/cB(25)):

GGGAAGGTGTAATAAGGTTTCCTCg

30

SEQ ID NO: 30 Inhibidor de la Actividad (2-SYNT/cB(25)):

GGGAAGGTGTAATAAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

35

SEQ ID NO: 31 Brazo Estabilizador sA (B6/tag(13)): ATTACACCTTCCC

9.4 Componentes de la reacción y seguimiento de la actividad de la MNAzima.

40 **[0272]** Se ha llevado a cabo el seguimiento de la actividad de MNAzima en el fluorómetro BMG LabTech FluoStar en un volumen total de reacción de 50 ml. Se hizo un seguimiento isotérmico de las reacciones a 40°C durante 3 minutos. Las reacciones se iniciaron por medio de la inyección del sustrato fluorescente SubBi-2-FB (10 ml de solución de 1 mM) a la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción contenía 1x PCR Buffer II (Biosistemas Aplicados), 25 mM MgCl₂, 200 nM de cada Partzima 4SYNTA5/2(22) y 4SYNTB6/2(8), 200nM de Brazo Estabilizador B6/tag(13), 200nM del Facilitador F2 RO5/cA(18) y 200 nM del Facilitador del Ensamblaje F1 (r2p-SYNT/cB(25)) o del Inhibidor de la Actividad (2-SYNT/cB(25)).

45

9.5 Resultados:

50 **[0273]** En este ejemplo el facilitador de ensamblaje está conformado por dos componentes oligonucleótidos. La Figura 9 muestra una representación esquemática de la estructura formada por la MNA, en concreto la MNAzima activa (panel D estructura g) y MNAi (panel D estructura h). La MNAzima necesita dos componentes facilitadores del ensamblaje (F1 y F2), dos partzimas y un brazo estabilizador para el ensamblaje de los complejos activos catalíticamente. De forma alternativa, el inhibidor de la actividad (I) pueden unirse a las partzimas y formar una estructura de MNAi.

55 **[0274]** En este experimento, la incubación de dos partzimas, dos componentes facilitadores del ensamblaje F1 y F2 y un brazo estabilizador tuvieron como resultado la formación de MNAzimas activas que dividieron un sustrato marcador y tuvieron como resultado un aumento de la fluorescencia en el tiempo de aproximadamente 28.000 unidades (de 12.000 a 40.000 unidades). En contraste, la incubación de las partzimas de un facilitador de ensamblaje (F2), un brazo estabilizador y un inhibidor de la actividad (I) tuvieron como resultado la formación de estructuras de MNAi que no pudieron dividir el sustrato marcador. Solo se observó un bajo nivel de aumento de la fluorescencia de fondo en el tiempo con un flujo de base de aproximadamente 1.500 unidades (de 12.000 a 13.500 unidades). El componente facilitador del ensamblaje (F1) e inhibidor de la actividad (I) se unen a las mismas áreas de la partzima y el brazo estabilizador, ya que contienen una secuencia común. De todas formas, la secuencia inhibitoria adicional que está presente en el inhibidor de la actividad pero no en el componente facilitador del ensamblaje F1, tiene como resultado la formación de estructuras MNAi. La retirada de esta secuencia inhibitoria adicional del inhibidor de la actividad puede tener como resultado la generación de un componente facilitador del

65

activador del ensamblaje F1. De esa forma, la adición o retirada de las secuencias inhibitorias proporciona un mecanismo para pasar de MNAzimas activas a MNAi o viceversa.

Ejemplos 10: Una cascada SCUD

[0275] Un mecanismo para la generación de una cascada de replicación de MNAzima diseñada para la detección de analitos usa la estrategia de cascada de SCUD. La estrategia SCUD puede incorporarse en cascadas en una gran variedad de diseños como que se ilustran, a modo de ejemplo, en la Figura 6, donde se incorporan dos complejos MNA; en la Figura 10, donde se incorporan tres complejos MNA; y en la Figura 11 donde se incorporan tanto los complejos de MNA como una DNAzima en una reacción de cascada.

[0276] El método SCUD depende de la capacidad de controlar el ensamblaje de MNAzimas activas y MNAi de los componentes oligonucleótidos presentes en la mezcla. En la Figura 10 se ilustra un esquema a modo de ejemplo de la cascada SCUD. En esta estrategia, una MNAzima (Mt) inicial se forma en presencia de una diana (T). Esta MNAzima inicial divide un sustrato (S1) creando uno de los componentes facilitadores del activador del ensamblaje (S1f) necesarios para la formación de MNAzima 1 (Mc1) en cascada. Entonces, la MNAzima 1 divide el sustrato (S2) creando así un componente facilitador del activador del ensamblaje adicional, necesario para la formación de MNAzima 2 (Mc2) en cascada. Entonces, la MNAzimas 2 divide el sustrato (S1) iniciando así una reacción en cascada.

[0277] El siguiente ejemplo experimental demuestra la capacidad de una MNAzima (Mt) inicial de dividir un sustrato (S1) en dos fragmentos en presencia de una diana. Además, demuestra que la MNAzima (Mt) inicial puede dividir el sustrato S1 en fragmentos, uno de los cuales (S1f) puede funcionar como componente facilitador del activador del ensamblaje que, junto con otros componentes facilitadores (F1 y F2), puede formar una MNAzima Mc1, capaz de dividir un segundo sustrato (S2).

[0278] En este experimento, la MNAzima Mt inicial estaba compuesta de partzimas R05A5/2-P y R05B6/2-P, que están diseñadas para detectar una sección del gen humano RPLPO (R05Target) y dividir el sustrato S1 SubBi-2h-FB. Un fragmento dividido de SubBi-2h-FB (S1f) junto con los componentes F1 y F2 facilitadores del ensamblaje FAC5 y FAC6 se unen a los brazos sensores de la Mc1 MNAzima 1 en cascada, que comprenden las partzimas CasA4(2h)/6 y CasB5(2h)/6. La MNAzima 1 en cascada activa, completamente ensamblada, se diseñó para dividir el sustrato SubBi-6-TRB.

10.1 Oligonucleótidos de partzima

[0279] En las siguientes secuencias, las bases en **negrita** se hibridan con secuencia/s de ácido nucleico diana (o facilitador del ensamblaje), las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en *cursiva* se hibridan al sustrato. La "-P" indica la fosforización 3' del oligonucleótido.

SEQ ID NO: 51 Partzima A R05A5/2-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 32 Partzima B R05B6/2-P:

GCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEQ ID NO: 33 Partzima A CasA4(2h)/6:

GTATCGTGTGTTCTTGCCCTCGTGCCACAACGAGAGGCGTGAT

SEQ ID NO: 34 Partzima B CasB5(2h)/6:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTAGGGACGCACTCCTACCTCT

10.2 Sustrato Marcador

[0280] Los sustratos marcadores S1 y S2 para este ejemplo fueron SubBi-2h-FB y SubBi-6-TRB, con las secuencias 5' a 3', como se muestra a continuación. SubBi-2h-FB estaba marcado en el extremo con una fracción de 6-FAM en el extremo 5' y está marcado internamente con una fracción de BHQ1 en el extremo 3'. SubBi-6-TRB estaba marcado en el extremo con una fracción de Texas Red en el extremo 5' y con una fracción BHQ2 en el extremo 3'. Las bases subrayadas indican la posición de los fluoróforos. La división de SubBi-2h-FB se supervisó en 530 nm (longitud de onda de emisión de FAM) con excitación en 485 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La división de SubBi-6-TRB se supervisó a 610 nm (longitud de onda de emisión de Texas Red) con la excitación de 585 nm (longitud de onda de excitación de Texas Red). Las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN.

SEQ ID NO: 35 SubBi-2h-FB: AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCACACGAGG

SEQ ID NO: 21 SubBi-6-TRB: ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

5 **10.3 Oligonucleótidos facilitadores.**

[0281] Se usaron dos moléculas en este ejemplo como componentes facilitadores del ensamblaje para hibridarse a los brazos sensores de las partzimas CasA4(2h)/6 y CasB5(2h)/6. Las secuencias de los facilitadores F1 y F2 del ensamblaje FAC5 y FAC6 se indican por debajo de 5' a 3'.

10

SEQ ID NO: 36 Facilitador del Ensamblaje F1 FAC5: GCAAGAACACACGATAC

SEQ ID NO: 37 Facilitador del Ensamblaje F2 FAC6: TAGAGGTAGGAGTGCG

15 **10.4 Secuencias diana.**

[0282] La secuencia diana para este ejemplo fue un oligonucleótido sintético RO5Target con la secuencia 5' a 3', tal y como se indica a continuación. Esta secuencia diana tiene la misma secuencia que la sección del gene humano RPLPO, exón 5.

20

SEQ ID NO: 38 RO5Target:

GAAGGTGTAATCCGCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

25 **10.5 Componentes de la reacción y seguimiento de la actividad de MNAzima.**

[0283] El seguimiento a tiempo real de la actividad de MNAzima se llevó a cabo en SmartCycler (Cepheid) en un volumen total de la reacción de 25 mL. Se hizo un seguimiento isotérmico a 50°C durante 12 minutos. Las reacciones se iniciaron por medio de la inyección de sustratos fluorescentes SubBi-2h-FB y SubBi-6-TRB (5 ml de solución de 2.5 mM de cada sustrato para una concentración final de 0.5 mM cada uno) en la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción contenía 1x PCR Buffer II (Sistemas Bioaplicados), 25 mM MgCl₂, 500 nM de cada Partzima RO5A5/2-P, RO5B6/2-P, CasA4(2h)/6 y CasB5(2h)/6, 500 nM de cada componente facilitador FAC5 y FAC6 o 100 nM de RO5Target o control sin diana (H₂O).

30

35 **10.6 Resultados:**

[0284] En presencia de la secuencia de diana RO5, las partzimas RO5A5/2-P y RO5B6/2-P formaron una MNAzima Mt inicial, que dividió el sustrato S1 SubBi-2h-FB, teniendo como resultado un aumento de la fluorescencia FAM de aproximadamente 1250 unidades (de 1200 a 2450 unidades). El sustrato dividido S1 tuvo como resultado la generación de un fragmento facilitador de S1f que entonces funcionó en conjunto con los componentes facilitadores F1 y F2 FAC5 y FAC6 y, las partzimas CasA4(2h)/6 y CasB5(2h)/6 para formar la MNAzima 1 en cascada Mc1. Esta MNAzima 1 dividió entonces el segundo sustrato S2 SubBi-6-TRB causando así un aumento de la fluorescencia de Texas Red de aproximadamente 900 unidades (de 250 a 1150 unidades). De esa forma, un aumento de la fluorescencia tanto de FAM como de Texas Red es indicativo de la presencia de la secuencia de diana en esta reacción en cascada de MNAzima.

40

45

[0285] En la ausencia de la secuencia de diana de RO5, no se ha observado ningún aumento en el tiempo de la fluorescencia de FAM y solo se ha observado un nivel bajo de aumento de fondo de la fluorescencia de para Texas Red con un flujo de base de aproximadamente 100 unidades (de 240 a 340 unidades). Cuando la diana no está presente, las partzimas RO5A5/2-P y RO5B6/2-P no pueden formar una MNAzima Mt inicial y por lo tanto el sustrato S1 de SubBi-2h-FB no se divide y la fluorescencia FAM no aumenta. En ausencia del sustrato S1 dividido, no hay ningún fragmento facilitador S1f para guiar la formación de una MNAzima 1 en cascada Mc1. Mientras el sustrato S1 de SubBi-2h-FB no dividido todavía puede unirse al complejo que comprende los facilitadores FAC5 y FAC6 y las partzimas CasA4(2h)/6 y CasB5(2h)/6 esto tiene como resultado una estructura de MNAi que no puede dividir el sustrato S2 de SubBi-6-TRB. En consecuencia, el nivel de fluorescencia de Texas Red se mantiene bajo. La ausencia de un aumento significativo de la fluorescencia tanto de FAM como de Texas Red es indicativa de la ausencia de la secuencia diana en la reacción en cadena de esta MNAzima.

50

55

Ejemplo 11: Detección de diana usando un evento de MNAzima inicial, seguido de una amplificación de cascada respuesta de SCUD y a continuación ligasa de DNAzima mediada por una lectura de división de MNAzima.

60

[0286] La estrategia que se usa en este ejemplo se ilustra en la Figura 11. Este ejemplo demuestra aspectos de la estrategia como los ilustrados en las secciones de (i) a (iv) de la figura.

65

(ii) Un ácido nucleico diana (F1) guía la formación de una MNAzima 1a que divide un sustrato A y genera dos

productos de división, el producto Aa que es necesario como componente en una reacción de ligado (sección ii) y un segundo producto Ab que es necesario como activador del facilitador del ensamblaje en el aspecto que se indica en la sección (iii).

5 (iii) El producto Aa tiene un fosfato cíclico a 2', 3' en su extremo 3' y de esa forma es adecuado para funcionar como sustrato para DNAzima 2a, que tiene actividad de ligasa. La ligasa de DNAzima 2a liga el producto Aa que se genera en el aspecto de la sección (i) a otro sustrato de ligado oligonucleótido B creando así una nueva partzima para MNAzima 4a.

10 (iv) El producto Ab funciona como activador del ensamblaje que guía la formación de una MNAzima 3a activa a partir de componentes de partzima. La MNAzima 3a divide el sustrato A generando dos productos Aa y Ab. El producto Ab puede entonces funcionar como activador del facilitador del ensamblaje, que guía la formación de más MNAzima 3a activa. Este sistema de MNAzima 3a tiene como resultado una cascada de amplificación de respuesta de auto replicación autocatalítica. Esta cascada SCUD tiene como resultado una acumulación mayor de Ab, que puede funcionar como activador del facilitador del ensamblaje para una MNAzima 3a, y en la acumulación de Aa, que puede funcionar como sustrato para DNAzima 2a.

15 (v) El producto de ligado generado por ligado de Aa y Sustrato B forma una nueva partzima ligada para MNAzima 4a. MNAzima 4a se forma conjuntamente con el facilitador F4 y divide el sustrato C entre un fluoróforo y un par colorante quencher, lo que tiene como resultado un aumento de la señal fluorescente indicativa de la presencia de ácido nucleico diana F1.

20 **[0287]** En este ejemplo los aspectos (i), (ii) y (iii) se dieron de forma coincidente en una única probeta a una única temperatura. El paso de detección de la lectura (aspecto iv) se llevó a cabo por medio de la adición a la reacción de nuevos reactivos. La ligasa de DNAzima que se ha usado en este ejemplo ha ligado anteriormente ARN por medio de la formación de una unión de fosfodiéster de 2'-5' de un fosfato cíclico 2', 3' y un grupo de hidroxilo 5' (Silverman *et al*). Aparte de la necesidad de un sustrato 5' con un extremo de fosfato cíclico 2', 3', la ligasa de DNAzima que se usa en este ejemplo también hace necesaria una secuencia específica en la unión del ligado, que quedaría como UA*G(A o G) (donde * denota la ubicación del ligado).

11.1 Ligasa B de DNAzima

30 **[0288]** La secuencia de oligonucleótido de ADN, que actúa como ligasa de DNAzima se indica a continuación.

SEQ ID NO 39: Ligasa de DNAzima 7Z81-10/10:

35 CCTCTCGTTGACGGCGGAGTGATTGGGAGGTTAGCTCTAGTGAGTGC

11.2 Oligonucleótidos de partzima

40 **[0289]** En las siguientes secuencias, las bases en **negrita** se hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana, las bases subrayadas forman parte del núcleo catalítico de la MNAzima ensamblada y las bases en cursiva se hibridan al sustrato.

[0290] Las siguientes son secuencias de las partzimas, que forman componentes de MNAzima 1a:

45 SEQ ID NO: 40 Partzima A miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAA*ATAGTGAGT*

SEQ ID NO: 41 Partzima B miR20B3/1:

50 *CATCTCTTCT*CCGAGCTAAGCACTTTA

[0291] La siguiente secuencia corresponde a la partzima, que se asocia con el producto de ligado/partzima para formar un componentes de MNAzima 4a.

55 SEQ ID NO: 42 Partzima B STB5/2(21):

*TGCCCAGGGAGGCTAGCT***CTGTCGTCGGAGTGGTCGTCG**

[0292] Las siguientes son secuencias de las partzimas, que forman componentes de SCUD MNAzima 3a:

60 SEQ ID NO: 43 Partzima A 4SYNTA2/li-10HP:

GGATGGGCACTAACGTGCCATCCCATCTCCGGTCGAA*ATAGTGAGT*

65 **[0293]** SEQ ID NO: 44 Partzima B 4SYNTB3/li-12HP:

CATCTCTTCTCCGAGCTTCCCATCTCACGACGATAACGTCGTGAGATG

11.3 Sustrato de MNAzima A (sustrato para MNAzima 1a y 3a)

5 [0294] En la siguiente secuencia, las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN.

SEQ ID NO: 45 preSub5: CTGTAGCACTCACTAuaGGAAGAGATG

11.4 Sustrato de ligasa de DNAzima B

10 [0295] En la siguiente secuencia, las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN. El sustrato de ligasa 3' DNAzima se sintetizó para tener la siguiente secuencia y un grupo de hidroxilo 5':

15 SEQ ID NO: 46 preSub3:

gGAACAACGAGAGGAAACCTT

11.5 Sustrato de MNAzima C (Sustrato Marcador Fluorescente para MNAzima 4a)

20 [0296] El sustrato marcador que se usa en este ejemplo es SubBi-2. En el ejemplo actual, SubBi-2 estaba marcado en el extremo con una fracción 6-FAM en el extremo 5', y una fracción BHQ1 en el extremo 3' y marcado como SubBi-2-FB. Se hizo el seguimiento de la división de SubBi-2-FB a 520 nm (longitud de onda de emisión FAM) con excitación a 490 nm (longitud de onda de excitación de FAM). La secuencia de SubBi-2-FB se indica a continuación (5' a 3'); las minúsculas representan el ARN y las mayúsculas representan el ADN.

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

11.6 Secuencia de diana F1 para MNAzima 1a

30 [0297] La secuencia de diana reconocida por la MNAzima 1a era un oligonucleótido sintético de ADN homólogo a la secuencia de miR-20 RNA. Tenía la siguiente secuencia:

35 SEQ ID NO: 47 D-20 diana (diana MNAzima 1a):

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

11.7 Facilitador del ensamblaje para MNAzima 4a.

40 [0298] El facilitador del ensamblaje F4 necesario para la formación de MNAzima 4a era un ADN de oligonucleótido sintético con la siguiente secuencia:

45 SEQ ID NO: 48 Facilitador del Ensamblaje F4 para MNAzima 4a:

CGACGACCACTCCGACGACAGTCCTATAGTGAGTGCTACAG

11.8 Condiciones de la reacción

50 [0299] Todas las reacciones se llevaron a cabo en un instrumento SmartCycler® SmartCap tube (Cepheid) único, como se describe a continuación. La división de la MNAzima 1a, la ligación de la DNAzima 2a y la amplificación de cascada SCUD MNAzima 3a (aspectos (i), (ii) y (iii), respectivamente) se llevaron a cabo de forma concurrente en un volumen inicial de reacción de 15 ml, a través de la incubación termal en el sistema termal SmartCycler® (Cepheid) a 40°C durante 2 horas. La reacción contenía 200 nM preSub5, 100 nM preSub3, 100 nM de ligasa de DNAzima 7Z81-10/10, partzimas para MNAzima 1a (50 nM miR20A2/1 y 300 nM miR20B3/1), 20 nM de partzimas para MNAzima 3a (Partzima A 4SYNTA2/li-10HP y Partzima B 4SYNTB3/li-12HP), 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9.0 at 25°C) y 50 mM MgCl₂ y 100 nM de diana D-20, o 100 pM de diana D-20, o 100 fM de diana D-20, o ninguna diana (únicamente control dH₂O).

60 [0300] A las reacciones de control les faltaban los componentes de la partzima SCUD MNAzima 3a y de esa forma solo se llevaron a cabo los aspectos (i), (ii) y (iv). Estas reacciones contenían 200 nM preSub5, 100 nM preSub3, 100 nM de ligasa de DNAzima 7Z81-10/10, partzimas para MNAzima 1a (50 nM miR20A2/1 y 300 nM miR20B3/1), 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris HCl (pH 9.0 a 25°C) y 50 mM MgCl₂ y 100 nM de diana D-20, o 100 pM de diana D-20, o 100 fM de diana D-20, o ninguna diana (únicamente control dH₂O).

65 [0301] A continuación de la incubación de las reacciones SCUD y de control, se añadió una alícuota de 10 ml de reactivos de detección al SmartCap System para dar unos niveles de concentración final de 300 nM de partzima STB5/2(21), 100 nM del facilitador del ensamblaje F4 para la MNAzima 4a, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Tris

HCl (pH 9.0 a 25°C), 50 mM MgCl₂ y 100 nM del sustrato SubBi-2-FB en un volumen total de reacción de 25 ml. Las reacciones se termociclaron durante 90 ciclos de 55°C a 80°C (55°C para 80 segundos, 80°C para 20 segundos) y se hizo el seguimiento de la fluorescencia a 55°C en el dispositivo SmartCycler® (Cepheid).

5 **[0302]** El aumento de la fluorescencia debido a la división del sustrato C de la MNAzima (SubBi-2-FB) se controló en el tiempo para las reacciones de SCUD y de control. Se estableció un umbral de fluorescencia de 100 unidades de fluorescencia y se midió la cantidad de tiempo que necesitó cada reacción para conseguir el umbral de fluorescencia.

10 **11.9 Resultados**

15 **[0303]** Se ha medido la fluorescencia durante la fase de termociclado (aspecto (iv)), que siguió a la fase inicial isotérmica (que incluyó los aspectos (i) y (ii) para las reacciones de control y los aspectos (i), (ii) y (iii) para las reacciones que incluyen la cascada de amplificación SCUD). En la reacción que contiene los componentes de la cascada SCUD y 100nM de diana, se alcanzó el umbral de fluorescencia dentro de un ciclo y la reacción alcanzó una meseta de 10 ciclos (Tabla 4). En la reacción que contiene los componentes de la cascada SCUD y and 100pM de diana, el umbral de la fluorescencia se alcanzó en el ciclo 19° y la reacción todavía no había alcanzado una meseta después de 80 ciclos. En la reacción que contiene los componentes de cascada de SCUD y 100fM de diana, se alcanzó el umbral de fluorescencia a 18 ciclos y la reacción todavía no había alcanzado una meseta después de 80 ciclos.

20 **[0304]** En contraste, la reacción que contenía los componentes de la cascada SCUD pero a la que le faltaba la diana, no consiguió alcanzar un valor de umbral después de 80 ciclos de termociclado. De esa forma, la consecución del umbral de fluorescencia era indicativa de la presencia de diana de ácido nucleico en estas reacciones.

25

Tabla 4. Tiempo necesario para llegar al umbral de fluorescencia

Tiempo (minutos) para alcanzar el umbral de 100 unidades (NS - no hay señal por encima del umbral)		
Concentración inicial	SCUD	Control
100 nM	1 ciclo	1 ciclo
100 pM	19 ciclos	59 ciclos
100 fM	18 ciclos	NS
Sin diana	NS	NS

30

35

40 **[0305]** En las reacciones de control, a las que les faltaban los componentes de cascada SCUD, pero que contenían 100 nM de diana, se alcanzó el umbral de fluorescencia en el interior de un ciclo y la reacción alcanzó su meseta a 34 ciclos (Tabla 4). En la reacción de control que contiene 100pM de diana, el umbral de fluorescencia se alcanzó a 59 ciclos y la reacción no había alcanzado todavía una meseta después de 80 ciclos. En la reacción de control que contenía 100fM de diana, el umbral de fluorescencia no se alcanzó después de 80 ciclos. De manera similar, la reacción de control a la que le faltaba la diana, no pudo alcanzar un valor de umbral después de 80 ciclos. De esa forma, el hecho de que se alcanzase el umbral de fluorescencia era indicativo de la presencia de ácido nucleico diana en esas reacciones. Las observaciones anteriores son coherentes con los siguientes pasos de amplificación enzimática de las reacciones que contienen todos los componentes para los aspectos (i), (ii), (iii) y (iv) (Figura 11). En primer lugar, la MNAzima 1a divide el sustrato A en presencia de una diana específica de F1 (D-20), produciendo dos fragmentos (Aa y Ab) (aspecto (i)). El fragmento de Aa era el fragmento de 5' (CTGTAGCACTACTAua) (SEQ ID NO:49) que tenía un extremo de fosfato cíclico de 2', 3'. En segundo lugar, el producto de Ab funciona como componente facilitador del activador de ensamblaje, que dirige la formación de MNAzima 3a activa. La MNAzima 3a divide el sustrato A generando dos productos Aa y Ab. El producto Ab puede entonces funcionar como facilitador, que guía la formación de más MNAzima 3a activa. De esa forma, el sistema de MNAzima 3a tiene como resultado una cascada de amplificación de respuesta de SCUD autocatalítico que se auto replica (aspecto (iii)). Esta cascada SCUD también tiene como resultado una mayor acumulación de Aa, que también puede funcionar como sustrato para DNazima 2a. En tercer lugar, el fragmento 5' Aa se liga a un segundo sustrato de ligasa B presente en la mezcla de reacción y esto tiene como resultado la formación de un nuevo oligonucleótido (producto de ligado Aa/B) con la secuencia de CTGTAGCACTACTAuagGAACAACGAGAGGAAACCTT (SEQ ID NO:50) (donde las mayúsculas representan las bases de ADN y las minúsculas representan las bases de ARN) (aspecto (ii)). Este producto de ligado, a su vez, funciona como componente de partzima para la MNAzima 4a. Finalmente, esta partzima de nueva creación se asocia con una segunda partzima (STB5/2(21)) y un facilitador de ensamblaje F4 para crear una MNAzima 4a (aspecto (iv)). La MNAzima 4a divide entonces el sustrato C de MNAzima (SubBi-2-FB) y tiene como resultado la separación de un fluoróforo y un par de colorante quencher causando así un aumento de la fluorescencia.

45

50

55

60

65

[0306] En el control, las reacciones que contenían solo componentes para los aspectos (i), (ii) y (iv) (Figura 11) las observaciones anteriores son coherentes con los eventos que se detallan a continuación. En primer lugar, la MNAzima 1a divide el sustrato A de MNAzima en presencia de una diana específica de F1 (D-20) produciendo dos

fragmentos (Aa y Ab)(aspecto (i)). El fragmento Aa es el fragmento 5' (CTG- TAGCACTCACTAua) (SEQ ID NO:49) que tenía un extremo de fosfato cíclico 2', 3'. El fragmento Aa de 5' se liga a un segundo sustrato B de ligasa presente en la mezcla de la reacción y esto tiene como resultado la formación de un nuevo oligonucleótido (producto de ligado (Aa/B)(aspecto (ii)). Este producto de ligado, a su vez, funciona como componente de partzima para MNAzima 4a. Finalmente, esta partzima de nueva creación se asocia con una segunda partzima (STB5/2(21)) y un facilitador del ensamblaje F4 para crear una MNAzima 4a (aspecto (iv)). Entonces, la MNAzima 4a divide el sustrato C de MNAzima (SubBi-2-FB), teniendo como resultado la separación de un par de fluoróforo colorante quencher causando así un aumento de la fluorescencia.

5
10
15
20
[0307] Las reacciones que carecían de diana demuestran que el desarrollo de una señal de fluorescencia en las reacciones, que o bien contenían o carecían de los componentes de SCUD MNAzima, dependía de la presencia de ácido nucleico diana. En las reacciones que contenían componentes de SCUD MNAzima pero que carecían de diana, no se formó ningún fragmento facilitador Ab y por lo tanto el sustrato A intacto se unía a las partzimas para MNAzima 3 A y formaba un complejo de MNAi. La Figura 9 muestra una representación esquemática de las estructuras formadas por los complejos de SCUD MNA, en concreto la MNAzima 3a activa (panel A estructura a) y MNAi (panel A estructura b). La MNAzima necesita un facilitador del ensamblaje (F1 en el panel A estructura a de la Figura 9); o un facilitador del activador del ensamblaje (Ab en la Figura 11 aspecto (iii)), que puede generarse por medio de la división de un sustrato. El sustrato intacto puede unirse a la estructura de MNAi y funcionar como inhibidor de la actividad (I), tal y como se muestra en la Figura 9 panel A estructura b. Las partzimas que se usan en este experimento para crea MNAzima 3 a tenían brazos sensores con áreas de auto complementariedad en el extremo de las dos partzimas. El facilitador den ensamblaje se une a las áreas que se encuentran entre el área de complementariedad (Figura 9 panel A estructura a y Figura 11 (iii) MNAzima 3a).

25
30
35
40
[0308] La comparación de los límites de detección de las reacciones que o bien contenían o bien carecían de los componentes de la MNAzima SCUD demuestra que la presencia de los componentes SCUD tiene como resultado la amplificación de la señal que permite la detección de cantidades más pequeñas de diana. Las reacciones que carecían de los componentes de la partzima SCUD MNAzima 3a tenían un límite de detección de 1×10^9 moléculas (100pM al inicio de la concentración). En comparación, la reacción que contenía los componentes de SCUD podían detectar moléculas de 1×10^6 (100fM al inicio de la concentración). Además, la señal por encima del umbral se detectaba para moléculas de 1×10^9 después de 19 ciclos en la reacción que contienen componentes de SCUD comparados con 59 ciclos para reacciones carentes de componentes de la partzima SCUD para la MNAzima 3a. De esa forma, la presencia de los componentes SCUD (partzimas para la MNAzima 3a) en conjunto con una MNAzima inicial (1a) era capaz de generar el componente facilitador del activador del ensamblaje Ab rebajando así tanto el tiempo de la detección como el límite de detección. El mecanismo se basa en la retroalimentación con cada una de las MNAzima 3a SCUD generando más facilitadores para más MNAzima 3a proporcionando un mecanismo para la amplificación de la señal (aspecto (iii) Figura 11). Este método de amplificación de la señal SCUD permite la amplificación de la señal por medio de un mecanismo que depende únicamente de la actividad catalítica de las enzimas de ácido nucleico y no de las enzimas de proteína como las usadas en otros métodos de diana de ácido nucleico, como el PCR. Además, la amplificación de SCUD se dio de forma isotérmica durante la primera fase del experimento, en la que se incubaron los reactivos a 40°C. En conclusión, SCUD es capaz de auto replicarse de forma autocatalítica, causando la amplificación de la señal bajo condiciones isotérmicas. SCUD permite el aumento de la sensibilidad y velocidad de la detección en un formato que no necesita enzimas de proteína.

45 **Ejemplo 12: Sumador completo utilizando complejos de MNA.**

[0309] Los complejos de MNA, incluidas las MNAzimas, pueden usarse para desarrollar sumadores completos moleculares. En la Figura 12 se presenta un esquema de diseño a modo de ejemplo de cómo podría construirse un sumador completo basado en MNAzimas.

50 [0310] Un sumador completo recibe la entrada por tres canales (A,B,C) y produce una salida en dos canales (X,Y) basándose en la entrada, de acuerdo con la siguiente tabla, Tabla 5;

Entrada A	Entrada B	Entrada C	Salida X	Salida Y
On			On	
	On		On	
		On	On	
On	On			On
On		On		On
	On	On		On
On	On	On	On	On

- 5 **[0311]** Para una mayor claridad, las señales ausentes (o "off") se indican en la tabla con una casilla vacía. En resumen, la salida X se activa en presencia de una o las tres entradas a la vez y la salida Y se activa en presencia de dos o tres entradas. Mientras que un sumador completo normalmente se aplica en lógica de circuito con señales eléctricas como entrada y salida, el sistema puede ponerse en marcha usando procesos biológicos, donde las entradas se representan por medio de eventos detectables y las salidas se representan por medio de eventos o efectos detectables.
- 10 **[0312]** Como se puede ver en esta tabla, además de los nullos (ninguna entrada), hay 7 combinaciones posibles de entradas. Tres de ellas son los casos en los que hay solo una entrada presente (representada por la lógica NANDNAND), tres de ellas son los casos en los que hay dos entradas (representadas por la lógica AND) y una en la que están presentes las tres entradas (representada por la lógica ANDAND).
- 15 **[0313]** En el sistema representado en la Figura 12, estas siete puertas lógicas se diseñan para su uso en un único tubo de ensayo donde cualquier combinación de entradas que se añada al tubo producirá un resultado esperado (por ejemplo, fluorescencia). Todas las puertas se construyen por separado antes de añadirlas al recipiente de reacción. En la Figura 12, los oligonucleótidos negros se han preconfigurado antes de agrupar las puertas, y comprenden las puertas reales, los sustratos azul y verde representan los sustratos que tienen anexados diferentes fluoróforos y comprenden las dos señales de salida y las moléculas FAC ('facilitadoras') constituyen las entradas. Las partzimas de cada una de las puertas están comprendidas de una secuencia única, excepto donde tanto el brazo marcador como el brazo sensor use el mismo sustrato y FAC o oligonucleótido C. En esos casos, la misma partzima puede usarse para la construcción de dos puertas separadas, como las partzimas B de las puertas AND 2 y 3, las partzimas B de las puertas NANDNAND 2 y 3 y las partzimas B de la puerta NANDNAND 1 y la puerta ANDAND que se muestra en la Figura 12. Los oligonucleótidos FAC1 y FAC2 actúan como facilitadores del ensamblaje, mientras que FAC3 actúa como estabilizador de brazo, mientras que en estratos que tienen anexados diferentes fluoróforos y comprenden las dos señales de salida y las moléculas FAC ('facilitadoras') de este esquema, todos los oligonucleótidos FAC sirven al mismo propósito, que es el de activar/desactivar las puertas lógicas. Los oligonucleótidos 'C' (C1, C2, C3) son complementarios a sus oligonucleótidos FAC correspondientes y se han preconfigurado con las partzimas. Cuando se añaden al recipiente de reacción, las FACs se despegarán de sus oligonucleótidos complementarios C por medio de un proceso de migración de la ramificación, desactivando las puertas que contienen el oligonucleótido C complementario. Este proceso se hace posible por medio del alargamiento de los oligonucleótidos C y sus correspondientes oligonucleótidos FAC. Los oligonucleótidos FAC1 y FAC2 actúan como facilitadores del ensamblaje, mientras que FAC3 actúa como estabilizador de brazo, sin embargo integrándose para proporcionar una secuencia libre cuando pueda iniciarse la migración de la ramificación.
- 20 **[0314]** En este diseño, la suma de cualquiera, pero solo una FAC, proporcionará un primer color fluorescente (en este ejemplo, como se muestra en la Figura 12, una fluorescencia 'azul'), cualquier combinación de 2 FACs producirá un segundo color fluorescente (fluorescencia 'verde' en la Figura 12), y cuando se introducen las tres FACs en el recipiente de reacción se producen los dos colores fluorescentes ('azul' y 'verde' en la Figura 12).
- 25 **[0315]** Se proporciona la siguiente explicación en referencia a la Figura 12. Si, por ejemplo, no hubiese ninguna molécula FAC presente, todos los complejos permanecerían inactivos, ya que no todos los componentes necesarios para que cada complejo se active estarían disponibles. No se daría ninguna fluorescencia.
- 30 **[0316]** Por ejemplo, si FAC1 fuese solo una entrada:
- FAC1 activa la primera puerta NANDNAND de la Figura 12 cuando se une a las partzimas preconfiguradas, los oligonucleótidos C2 y C3 y el sustrato, produciendo fluorescencia azul. También se libera del oligonucleótido C1 de las puertas NANDNAND 2ª y 3ª, que en cualquier caso están inactivas porque FAC2 y FAC3 no están disponibles para formar una MNAzima activa.
 - Cuando solo está disponible FAC1 y las puertas ANDAND y AND no están activas porque necesitan otras moléculas FAC para permitir la activación.
- 35 **[0317]** Si, por ejemplo, FAC1 y FAC2 fuesen entradas, ocurriría lo siguiente:
- La 3ª puerta AND de la Figura 12 está activa, porque los dos oligonucleótidos necesarios están disponibles para formar una MNAzima activa, produciendo fluorescencia verde.
 - Las otras dos puertas AND de la Figura 12 no se activarán, porque necesitan FAC3.
 - La puerta ANDAND no estará activa, ya que solo hay disponibles dos de las moléculas FAC necesarias.
 - FAC1 y FAC2 están disponibles para los complejos de las puertas 1ª y 2ª NANDNAND de la Figura 12, respectivamente. De todas formas, FAC1 se deshará de su oligonucleótido C1 complementario en la 2ª puerta NANDNAND de la Figura 12, de forma que no estará activa. FAC2 se deshará de su oligonucleótido C2 complementario en la 1ª puerta NANDNAND de la Figura 12, de forma que no estará activa. La tercera puerta NANDNAND no está activa porque necesita de FAC3 (y porque C1 también C2 serán desechadas por parte de
- 40 **[0318]** FAC1 y FAC2, respectivamente).
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- De esa forma, no hay fluorescencia azul en ninguna de las puertas.
- Solo la puerta AND relevante proporciona fluorescencia verde.

5 [0319] Si, por ejemplo, estuviesen presentes los tres oligonucleótidos FAC:

- Las puertas AND y la puerta ANDAND están activadas, produciendo fluorescencia verde y azul, respectivamente.
- Las puertas NANDNAND no se activarán, debido al hecho de que los oligonucleótidos 'C' serán desechados por sus oligonucleótidos FAC respectivos.

10 [0320] Un experto en la materia reconocería que un esquema como este puede aplicarse de forma análoga a cualquier otra combinación de oligonucleótido o oligonucleótidos FAC.

15 [0321] Un experto en la materia entenderá que la salida de un sumador completo puede usarse como entrada para otro sumador completo.

Referencias

20 Patentes y Publicaciones de Patentes:

[0322]

25 PCT International Publication No. WO 99/45146
 PCT International Publication No. WO 99/50452
 Patente de los EEUU nº 6.140.055
 Patente de los EEUU nº 6.201.113
 Patente de los EEUU nº 6.365.724

30 Otras Citas:

[0323]

35 Achenbach, J., Nutiu, R. and Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymes (*Conmutación de estructura de desoxirribosimas alostéricas*). *Analytica Chimica Acta*. 534(1): 41-51.

Barany, F. (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase (*Detección de enfermedades genéticas y amplificación del ADN usando ligasas termoestables clonadas*). *PNAS*, 88: 189-193.

40 Benenson, Y., Paz-Elizur, T., Adar, R., Keinan, E., Livneh, Z. and Shapiro, E. (2001) Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules (*Instrumentos informáticos programables y autónomos a base de biomoléculas*). *Nature*. Nov 22; 414(6862):430-4

45 Benenson, Y., Gil, B., Ben-Dor, U., Adar, R. and Shapiro, E. (2004) An autonomous molecular computer for logical control of gene expression (*Un ordenador molecular autónomo para el control lógico de la expresión genética*). *Nature*. May 27;429(6990):423-9

50 Beyer, S. and Simmel, F.C (2006) A modular DNA signal translator for the controlled release of a protein by an aptamer (*Traductor de señal modular de ADN para la liberación controlada de una proteína por medio de un aptámero*). *Nucleic Acids Research*, 34: 1581-1587

Breaker, R. (1997) DNA enzimas (*Enzimas de ADN*). *Nat Biotech*. 15: 427-431.

55 Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1994) A DNA enzima that cleaves RNA (*Una enzima de ADN que divide ARN*). *Chem Biol*. Dec;1(4): 223-9.

Brown, A., Li, J., Pavot, C. and Lu, Y. (2003) A lead-dependent DNAzima with a two-step mechanism (*Una DNAzima plomo-dependiente con un mecanismo de dos pasos*). *Biochem*. Jun 17;42(23): 7152-61.

60 Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA (*Análisis de mutación de ácido nucleico con ADN catalítico*). *Nucl Acids Res*. 28(3): e9.

65 Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2003) Optimisation of the 10-23 DNAzima-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purinecytosine target sites (*Mejora de las interacciones de sincronización 10-23 entre DNAzima-sustrato para la actividad de división de ARN en ubicaciones de diana purinectosina*). *Nucl Acids Res*. Jun 1;31(11): 2883-9.

- Carmi, N., Shultz, L.A. and Breaker, R.R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs (*Selección in vitro de ADNs auto-divisibles*). Chem Biol. 3(12): 1039-46.
- 5 Cox, J.C. and Ellington, A.D. (2001) DNA computation function (*Función computacional del ADN*). Curr Biol. May 1;11(9):R336.
- Cruz, R.P., Withers, J.B. and Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme (*Versatilidad en la división de la unión de dinucleótidos de 8-17 desoxirribosimas*). Chem Biol. Jan;11(1): 57-67.
- 10 Cuenoud, B. and Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzima with DNA ligase activity (*Una metalloenzima de ADN con actividad de ligasa de ADN*). Nature. 375(6532): 611-4.
- Elghanian, R., Storhoff, J., Mucic, R., Letsinger, R. and Mirkin, C. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles (*Detección colorimétrica selectiva de polinucleótidos basada en las propiedades ópticas dependientes de la distancia de las nanopartículas de oro*). Science. 277: 1078-1079.
- 15 Emilsson, G.M. and Breaker, R.R. (2002) Deoxyribozymes: new activities and new applications (*Desoxirribosimas: nuevas actividades y nuevas aplicaciones*). Cell. Mol. Life Sci. 59, 596-647.
- 20 Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities (*Enzimas sencillas de ARN con actividades nuevas y altamente específicas de endorribonucleasa*). Nature. Aug 18; 334(6183): 585-91.
- 25 Huizenga, D. and Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP (*Un aptámero de ADN que une adenosina con ATP*). Biochemistry. 34: 656-665.
- Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. and Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA (*Síntesis de aminoacil-ARN catalizada por una ARN*). Science. 267(5198): 643-7.
- 30 Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A. and Ellington, A.D. (2004) Aptamer Database (*Base de datos de Aptámeros*). Nucl Acids Res. 32(90001): D95-100.
- Li, Y. and Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation [letter] (*Un ADN catalítico para la metalación de porfirina [carta]*). Nat Struct Biol. 3(9): 743-7.
- 35 Liu, J. and Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor (*Ensamblaje dependiente de las adenosinas de nanopartículas de oro funcionalizadas para aptazimas y su aplicación como biosensor colorimétrico*). Analytical Chemistry. 76: 1627-1632.
- 40 Lohse, P.A. and Szostak, J.W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions (*Reacciones de transferencia de aminoácidos catalizadas con ribosimas*). Nature. 381(6581): 442-4.
- 45 Mirkin, C., Letsinger, R., Mucic, R. and Storhoff, J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials (*Método basado en ADN para ensamblar racionalmente nanopartículas en materiales macroscópicos*). Nature. 382: 607-609.
- Paul, N. and Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems (*Sistemas mínimos de auto-replicación*). Current Opinion in Chemical Biology. 8(6): 634-639.
- 50 Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. and Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis (*Relaciones entre hidroxilos de 2' y magnesio de unión en el dominio de ARN con forma de martillo: un modelo para la catálisis de ribosimas*). Biochemistry. 30(16): 4020-5.
- 55 Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleótidos with catalytic activity (*Mezcla de desoxirribo y ribo-oligonucleótidos con actividad catalítica*). Nature. 344(6266): 565-7.
- 60 Prior, T.K., Semlow, D.R. Flynn-Charlebois, Rashid, I. And Silverman, S.K. (2004) Structure-function correlations derived from faster variants of a RNA ligase deoxyribozyme (*Correlaciones estructura-función derivadas de las variantes más rápidas de una ligasa de ARN de desoxirribosima*). Nucleic Acids Research, 32, 1075-1082.
- 65 Raillard, S.A. and Joyce, G.F. (1996) Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozyme (*Localización de diana dentro de HIV-1 cADN con una ribozima de división de ADN*). Biochemistry. 35(36): 11693-701.

- Sando, S., Sasaki, T., Kanatani, K. and Aoyama, Y. (2003) Amplified Nucleic Acid Sensing Using Programmed Self-Cleaving DNAzyme (*Medición de Ácido Nucleico Amplificado por medio de DNAzima de auto-división programada*). J. Am. Chem. Soc.; (Communication); 125(51); 15720-1572.
- 5 Santoro, S. and Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzyme (*División de enzima de ADN por parte de ARN de uso general*). Proc Natl Acad Sci USA. 94: 4262-4266.
- Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme (*Mecanismo y utilidad de la división de una enzima de ADN por parte de ARN*). Biochem. 37(38): 13330-42.
- 10 Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozymes (*Conseguir acceso a la diana de desoxirribosimas*). J Mol Biol. May 28;339(2): 355-63.
- Schweitzer, B. and Kingsmore, S. (2001) Combining nucleic acid amplification and detection (*Combinación de amplificación y detección de ácido nucleico*). Current Opinion in Biotechnology, 12: 21-27.
- 15 Sidorov, A., Grasby, J. and Williams, D. (2004) Sequence-specific cleavage of RNA in the absence of divalent metal ions by a DNAzyme incorporating imidazolyl and amino functionalities (*División específica de secuencia de ARN en ausencia de iones de metal divalente por parte de una DNAzima que incorpora funciones de imidazolil y amino*). Nucl Acids Res. Mar 5;32(4): 1591-601.
- 20 Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA) (*Romper es fácil (si eres una enzima de ADN que divide ARN)*). Chem Biol. Jan;11(1): 7-8.
- 25 Stojanovic, M.N. and Stefanovic, D. (2003) A Deoxyribozyme-Based Molecular Automaton (*Un autómatas molecular basado en desoxirribosima*). Nature Biotechnology 21,1069-1074.
- Tabor, J.J., Levy, M. and Ellington, A.D. (2006) Deoxyribozymes that recode sequence information (*Desoxirribocimas que recodifican la información de una secuencia*). Nucleic Acids Res. 34(8): 2166-2172.
- 30 Tarasow, T.M., Tarasow, S.L. and Eaton, B.E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation (*Formación de unión de ARN catalizado y carbono-carbono*). Nature. 389(6646): 54-7.
- 35 Todd, A.V., Fuery, C.J., Impey, H.L., Applegate, T.L. and Haughton, M.A. (2000) DzyNA-PCR: Use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid in a fluorescent real time format (*Uso de DNAzimas para detectar y cuantificar ácido nucleico en formato de tiempo real fluorescente*). Clinical Chemistry 46:5 625-630.
- Warashina, M., Kuwabara, T., Nakamatsu, Y. and Taira, K. (1999) Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome (*Actividad extremadamente alta y específica de enzimas de ADN en células con un cromosoma Filadelfia*). Chem Biol. Apr;6(6): 237-50.
- 40 Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme (*Necesidades de la secuencia para el núcleo catalítico de la enzima de ADN "10-23"*). J Biol Chem. 277(43): 240617-22.
- 45 LISTA DE SECUENCIAS
- [0324]**
- 50 <110> JOHNSON & JOHNSON RESEARCH PTY LIMITED
- <120> INTERRUPTORES MOLECULARES Y MÉTODOS DE USO
- <130>780920C
- 55 <140>
- <141>
- <150> 60/828,451
- 60 <151> 2006-10-06
- <160> 51
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- 65 <210> 1

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de una Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (38)
 <223> Timina fosforilada

<400> 1
 15 actggatgct catctgtctg acaacgagag gaaacctt 38

<210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (23)
 <223> Citosina fosforilada

<400> 2
 30 tgcccagga ggctagctta tac 23

<210> 3
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)
 <223> Guanina fosforilada

45 <400> 3
 cttcgtgagg gtgag 15

<210> 4
 <211> 22.
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> Descripción de Molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido Sintético

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

60 <400> 4
 aaggttcct cguccctggg ca 22

<210> 5
 <211> 52
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 5
 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

<210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (40)
 <223> Timina fosforilada

20 <400> 6
 caaacgagtc ctggcctgt ctacaacgag aggaaacctt 40

<210> 7
 <211> 47
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (47)
 <223> Citosina fosforilada

35 <400> 7
 tgcccagga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc cacttgc 47

40 <210> 8
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 8
 gcaagtggga aggtgtaatc cgtctccaca gacaaggcca ggactcgttt g 51

50 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

60 <400> 9
 gcaagtggga aggtgtaatc cgtct 25

<210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 10
 ccacagacaa ggccaggact cgtttg 26

5 <210> 11
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 11
 15 aaggttctct cgtcctggg caccacagac aaggccagga ctcgtttg 48

<210> 12
 <211> 59
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 12
 25 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtg gtagctgggg gagtattgag gaggaaggt 59

<210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 13
 35 catctcttct ccgagcgtct gtaccgtgta c 3

<210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 14
 45 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacgtt 30

<210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 15
 55 ccaggtactc actatt 16

60 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

- <223> Descripción de Moléculas Combinadas de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 5 <400> 16
actcactata ggaagagatg 20
- 10 <210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 17
caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40
- 20 <210> 18
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 18
tgcccagggga ggctagctct gtccgaggcg tgat 34
- 30 <210> 19
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<223> Descripción de Molécula Combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
- 40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 19
atcacgcctc g 11
- 45 <210> 20
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 20
gacagagaca aggccaggac tcgtttg 27
- 55 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Descripción de Molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
- 65 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

- <400> 21
atcacgcctc gutcctcca g 21
- 5 <210> 22
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 22
caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggcgtgat 39
- 15 <210> 23
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 25 <400> 23
ctgggaggaa ggctagctct gtccgaggaa accttcgtcg tccagactgc g 51
- <210> 24
<211> 16
<212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 24
cgcagtctgg acgacg 16
- 40 <210> 25
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de Molécula Combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido Sintético
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 50 <400> 25
aaggttctc cg 12
- 55 <210> 26
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 26
caaacgagtc ctggccttcg agtacaacga gaggaaacct t 41
- 65 <210> 27
<211> 25
<212> ADN

- <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 5 <400> 27
tgcccaggga ggctagcgaa acctt 25
- 10 <210> 28
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 28
aagccagga ctcgttg 18
- 20 <210> 29
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
- 30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético
- <400> 29
gggaagggtg aataaggttt cctcg 25
- 35 <210> 30
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de Molécula combinada de DNA/RNA: Oligonucleótido Sintético
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético
- 45 <400> 30
gggaagggtg aataaggttt cctcgucct gggca 35
- 50 <210> 31
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 31
attacacctt ccc 13
- 60 <210> 32
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 65 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (38)
 <223> Citosina fosforilada
 5
 <400> 32
 tgcccagga ggctagcgtg gagacggatt acaccttc 38
 10
 <210> 33
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 gtatcgtgtg ttcttgcct cgtgccaca acgagaggcg tgat 44
 20
 <210> 34
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 34
 ctgggaggaa ggctagctag ggacgcactc ctacctta39
 30
 <210> 35
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleótido
 40
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 35
 aaggttct cguccctggg cacacgagg 29
 45
 <210> 36
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 36
 gcaagaacac acgatac 17
 55
 <210> 37
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 37
 tagagtagg agtgcg 16
 65

<210> 38
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 38
 10 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43
 <210> 39
 <211> 47
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 20 <400> 39
 cctctcgttg acggcggagt gattgggagg ttagctctag tgagtgc 47
 <210> 40
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <400> 40
 tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt 28
 <210> 41
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 41
 catctcttct ccgagctaag cacttta 27
 45 <210> 42
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético
 <400> 42
 55 tgcccaggga ggctagctct gtcgtcggag tggctcgtc 39
 <210> 43
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 43
 65 ggatgggcac taacgtgcc atcccatctc cggtcgaaat agtgagt 47

<210> 44
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 44
 10 catctcttct ccgagcttcc catctcacga cgataacgtc gtgagatg 48
 <210> 45
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 45
 25 ctgtagcact cactauagga agagatg 27
 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
 <220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 46
 ggaacaacga gaggaaacct t 21
 40 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 50 taaagtgctt atagtcagg ta 22
 <210> 48
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 48
 60 cgacgaccac tccgacgaca gtcctatagt gagtgtaca 41
 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 520 023 T3

<220>
<223> Descripción de Molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 49
ctgtagcact cactaua 17

10 <210> 50
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 50
ctgtagcact cactauagga acaacgagag gaaacctt 38

25 <210> 51
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (41)
35 <223> Timina fosforilada

<400> 51
caaacgagtc ctggccttgt ctacaacga gaggaaacct t 41

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una proenzima inactiva de ácido nucleico multi-componente (MNAi) que comprende dos o más componentes oligonucleótidos y por lo menos una molécula inhibidora de la actividad, en la que por lo menos un primer componente del oligonucleótido y un segundo componente del oligonucleótido son capaces de auto-ensamblarse en presencia de por lo menos un inhibidor de la actividad de complejo de MNA donde cada uno de dichos componentes primero y segundo de oligonucleótido comprenden una porción de brazo de sustrato, una porción de núcleo catalítico y una porción de brazo sensor;
- 10 Donde a continuación del auto-ensamblaje, la porción del brazo sensor de dichos primer y segundo componentes oligonucleótidos actúan como brazos sensores, la porción de brazo de sustrato del primer y segundo componente oligonucleótido actúan como brazos de sustrato y la porción de núcleo catalítico de los componentes primero y segundo oligonucleótido del núcleo catalítico no-funcional; y
- 15 Donde a continuación del auto-ensamblaje por lo menos uno de los brazos sensores interactúa con dicho inhibidor de la actividad y dichos primer y segundo componentes oligonucleótidos se mantienen cerca por la asociación de sus respectivas porciones del núcleo catalítico para formar un núcleo catalítico no funcional.
2. La MNAi de la reivindicación 1, cuando el inhibidor de la actividad sea un sustrato.
- 20 3. La MNAi de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, cuando por lo menos un componente de la MNAi comprenda un aptámero o porción suya donde dicho aptámero o porción suya una un ligando elegido 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 de metales, priones o cualquier derivado, porción o combinaciones de los mismos.
- 25 4. El uso de la MNAi de la reivindicación 1 como interruptor molecular, donde dichas transiciones de MNAi transiciona de un complejo inactivo a uno activo de MNA en respuesta a un evento de entrada.
- 30 5. El uso de la reivindicación 4 cuando el evento de entrada se seleccione del grupo que comprende cambios e la temperatura, concentración de sal, fuerza iónica, pH, presencia o ausencia de catión divalente, tipo o concentración, carga eléctrica, carga magnética, manipulación física y cambios en la concentración de una MNA o componentes de modulador o componentes del microambiente o cualquier combinación de los mismos.
- 35 6. El uso de las reivindicaciones 4 o 5 siempre que la transición tenga como resultado un cambio en la señal de salida.
7. El uso de la reivindicación 6 siempre que se amplifique la señal de salida.
- 40 8. Un método de detección de diana usando cascada, cuando dicha cascada comprenda una MNAzima inicial que se forma en presencia de dicha diana; una primera MNAzima formada en presencia de un producto de dicha MNAzima inicial; y una MNAzima adicional que se ha formado en presencia de un producto de dicha primera MNAzima; donde dicho método comprenda los siguientes pasos:
- 45 (i) Modificación de un primer sustrato con dicha MNAzima inicial para generar un primer facilitador del ensamblaje;
- (ii) Ensamblaje de dicha primera MNAzima con dicho primer facilitador del ensamblaje,
- (iii) Modificación de un sustrato adicional con dicha primera MNAzima para generar un facilitador del ensamblaje adicional;
- 50 (iv) Ensamblaje de dicha MNAzima adicional con dicho facilitador del ensamblaje adicional;
- (v) Modificación de dicho primer sustrato con dicha MNAzima adicional para generar dicho primer facilitador del ensamblaje;
- (vi) Ensamblaje de dicha primera MNAzima con dicho primer facilitador del ensamblaje liberado de (v), formando así una cascada de amplificación
- 55 Donde dicha modificación de como mínimo uno de dichos sustratos primero o adicional produzca un efecto detectable indicativo de dicha diana.
- 60 9. El método de la reivindicación 8 donde dicha MNAzima primera o adicional comprenda dos partzimas que se vuelven activas catalíticamente cuando están en presencia de como mínimo dos componentes facilitadores del ensamblaje.
- 65 10. El método de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9 donde dicho efecto detectable es detectado, como mínimo, por uno de los siguientes métodos: espectroscopio de fluorescencia, resonancia plasmónica de superficie, espectroscopio de masa, NMR, resonancia de espín electrónico, espectroscopio de fluorescencia de polarización, dicroísmo circular, inmunoanálisis, cromatografía, radiometría, fotometría, escintigrafía, métodos electrónicos, UV, espectroscopio de luz visible o infra roja, métodos enzimáticos o cualquier combinación de

ellos.

- 5 11. Un método para la detección de un facilitador del ensamblaje usando una cascada de señal que comprende una primera MNAzima, un complejo de MNA inicialmente presente en una forma sustancialmente catalíticamente inactiva (MNAi), un inhibidor de la actividad capaz de ser modificado por dicha primera MNAzima para proporcionar un efecto detectable, donde dicho inhibidor de la actividad es tanto un inhibidor de la actividad como un sustrato potencial y
- 10 Donde la asociación de dicho facilitador del ensamblaje con partzimas para dicha primera MNAzima en condiciones que permitan la actividad catalítica de dicha primera MNAzima facilite la actividad catalítica de dicha primera MNAzima proporcionando así la modificación de dicho inhibidor de la actividad para liberar un dominio facilitador del activador del ensamblaje y un dominio inhibidor de la actividad de dicho inhibidor de la actividad y donde dicha liberación proporcione dicho efecto detectable y
- 15 Donde dicho dominio facilitador del activador del ensamblaje, liberado, facilite el ensamblaje de una segunda MNAzima de los componentes de dicho complejo de MNA y
- 20 Donde la actividad catalítica de dicha segunda MNAzima modifique dicho inhibidor de la actividad para liberar más dominios inhibidores de la actividad y más dominios facilitadores del activador del ensamblaje y donde dicha liberación proporcione un mayor efecto detectable y;
- 25 Donde dichos otros dominios facilitadores del activador del ensamblaje faciliten el ensamblaje de las segundas MNAzimas adicionales, proporcionando así dichas segundas MNAzimas activas catalíticamente, proporcionando así un mayor efecto detectable, indicativo de la presencia de dicho facilitador del ensamblaje y
- 30 Donde el ensamblaje de las MNAzimas activas catalíticamente se regula por medio de un evento de entrada seleccionado de entre los siguientes: cambio de la temperatura, concentración de sal, fuerza iónica, pH, presencia o ausencia de catión divalente, tipo o concentración, carga eléctrica, carga magnética, manipulación física y cambio en la concentración de una MNA o de componente modulador o de componente del microambiente o cualquier combinación de los anteriores.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

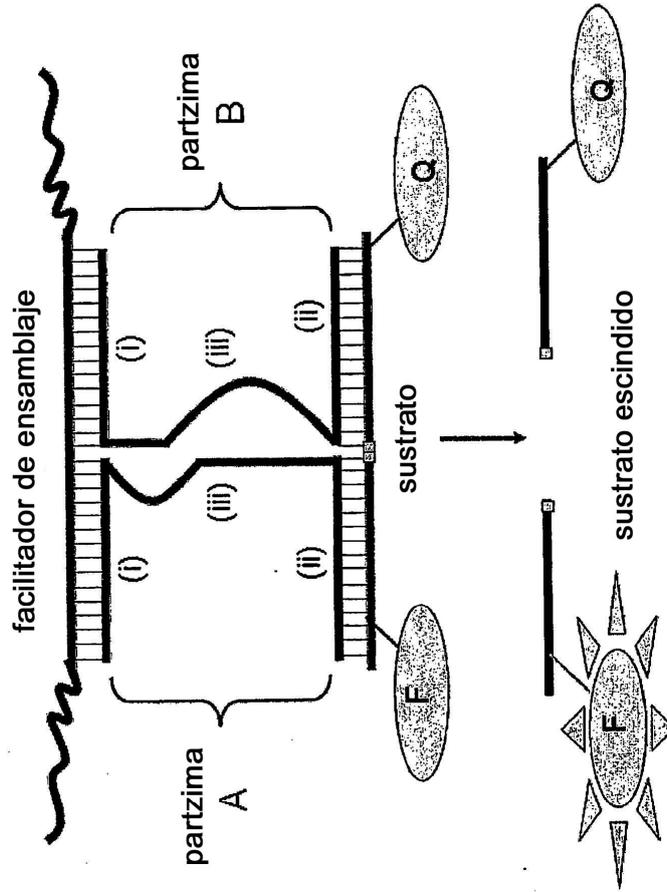


Figura 2

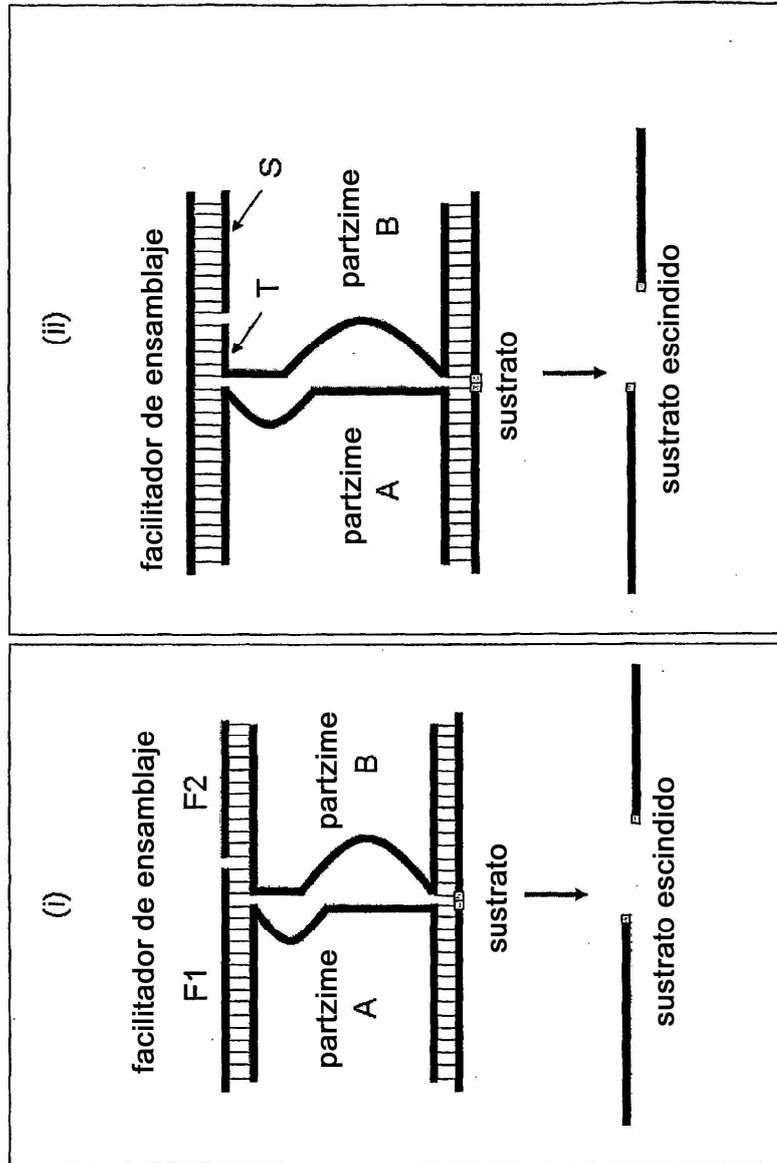


Figura 3

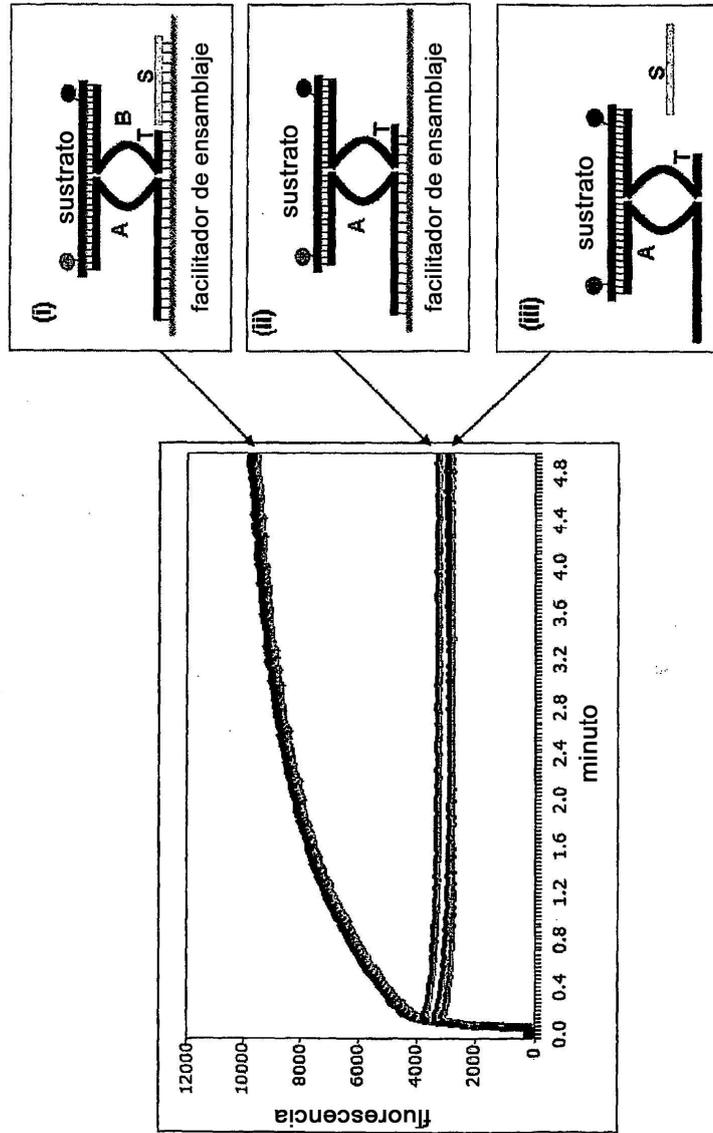


Figura 4

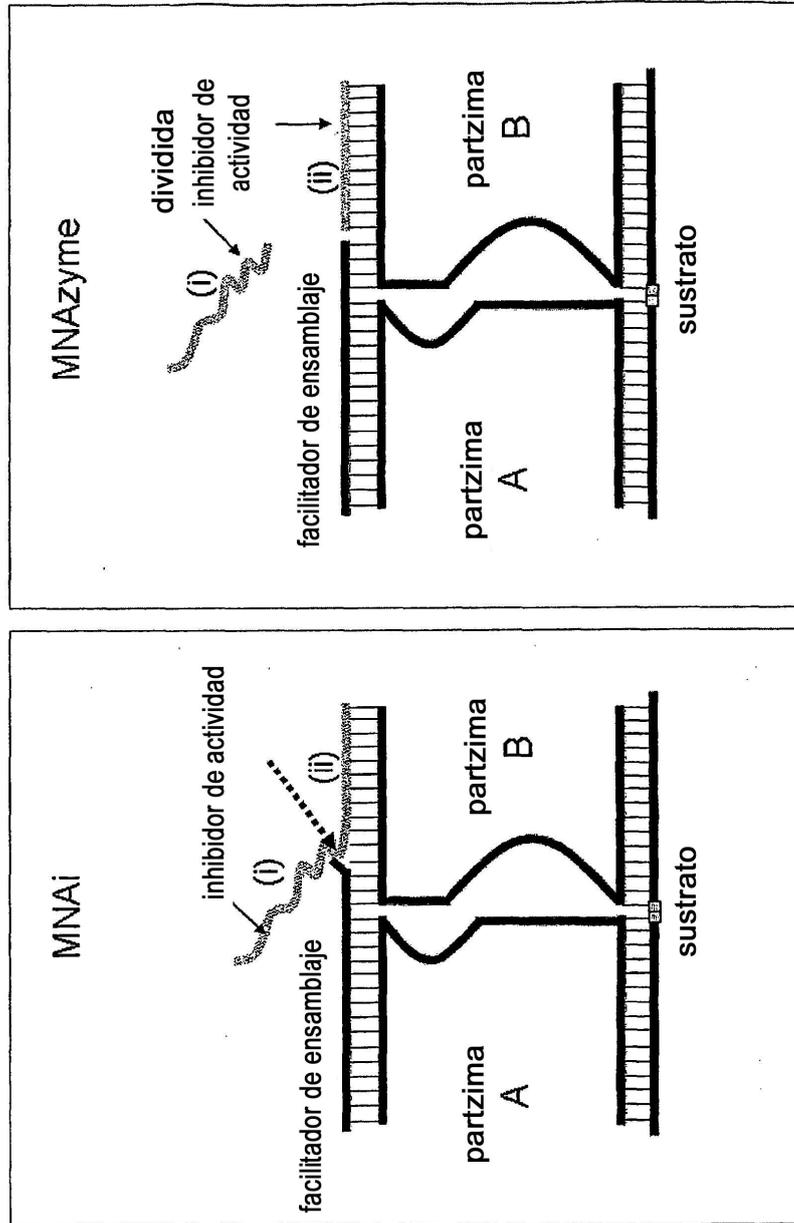


Figura 5

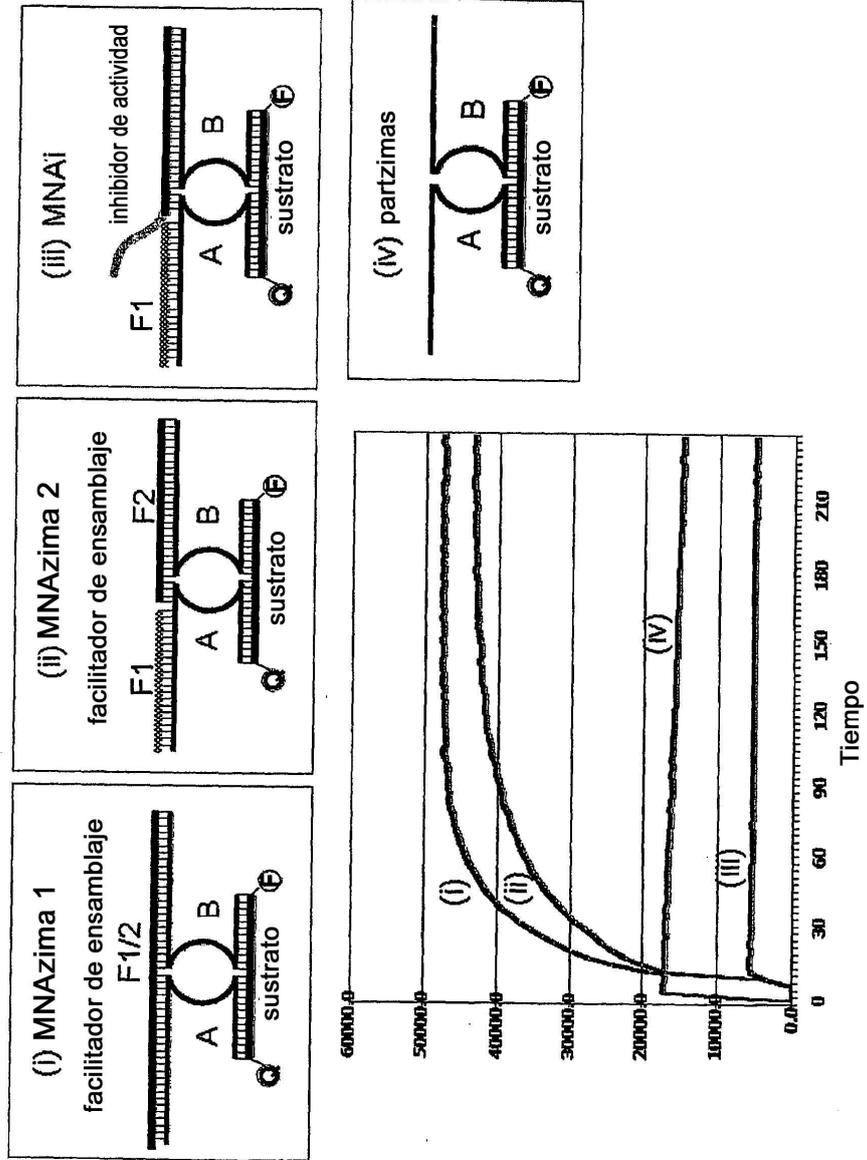


Figura 7

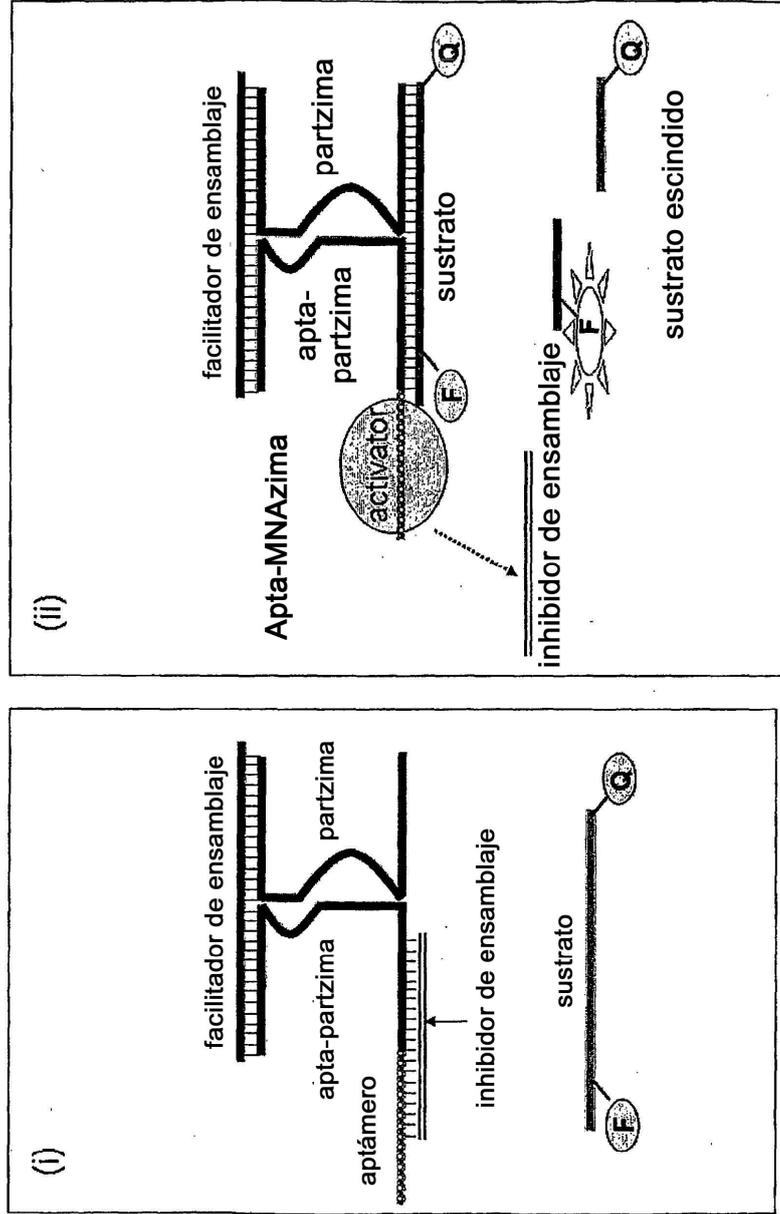


Figura 8

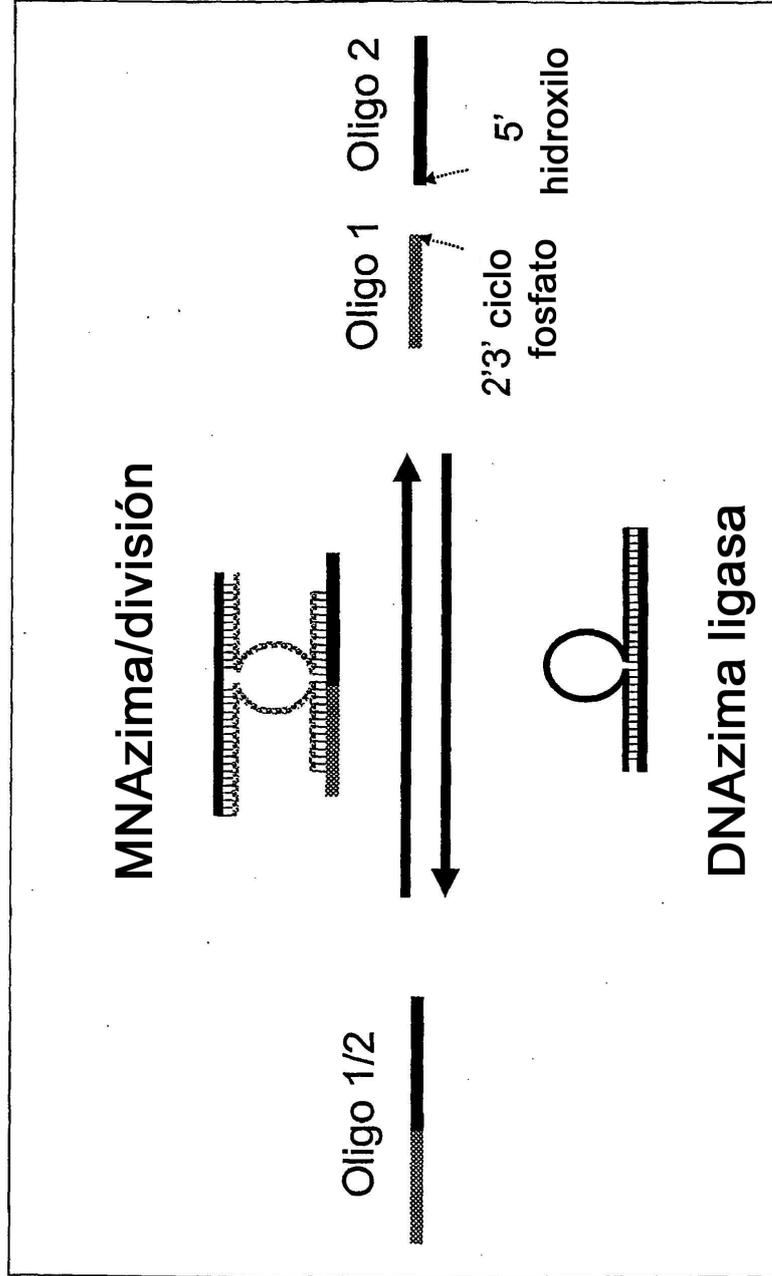


Figura 9

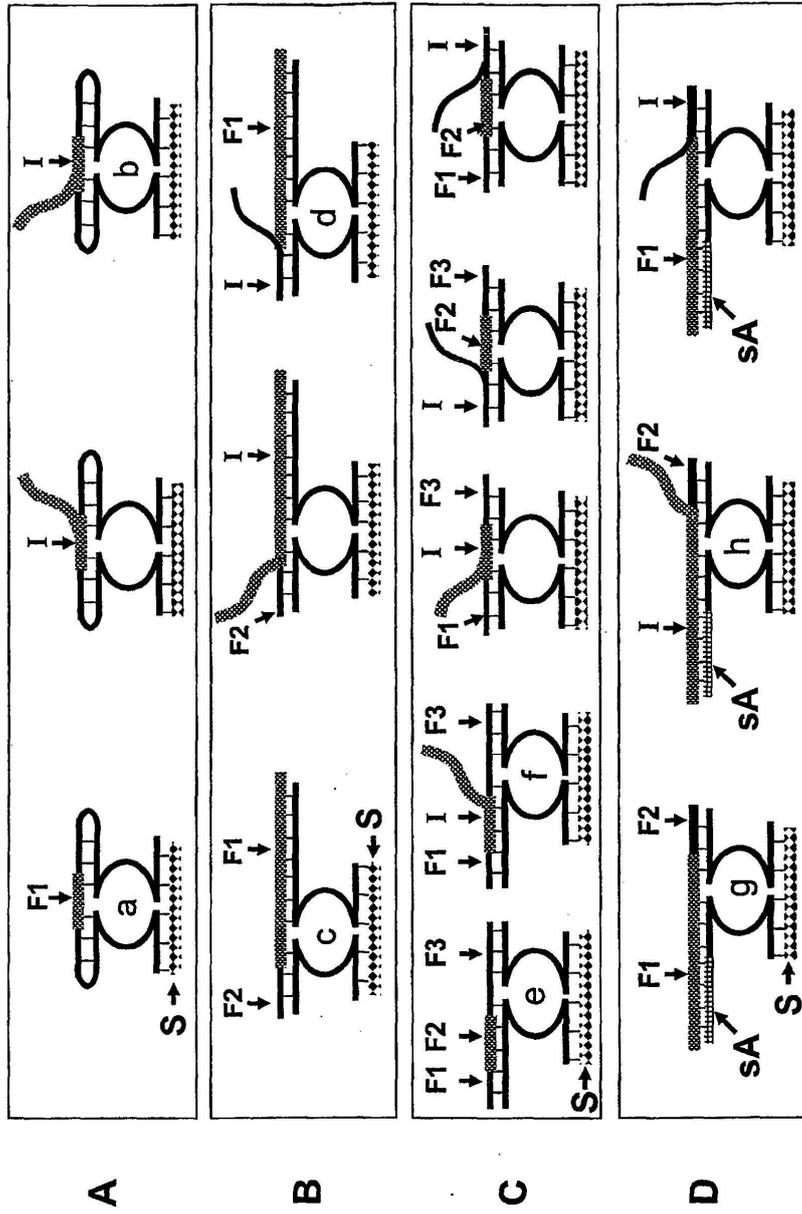


Figura 10

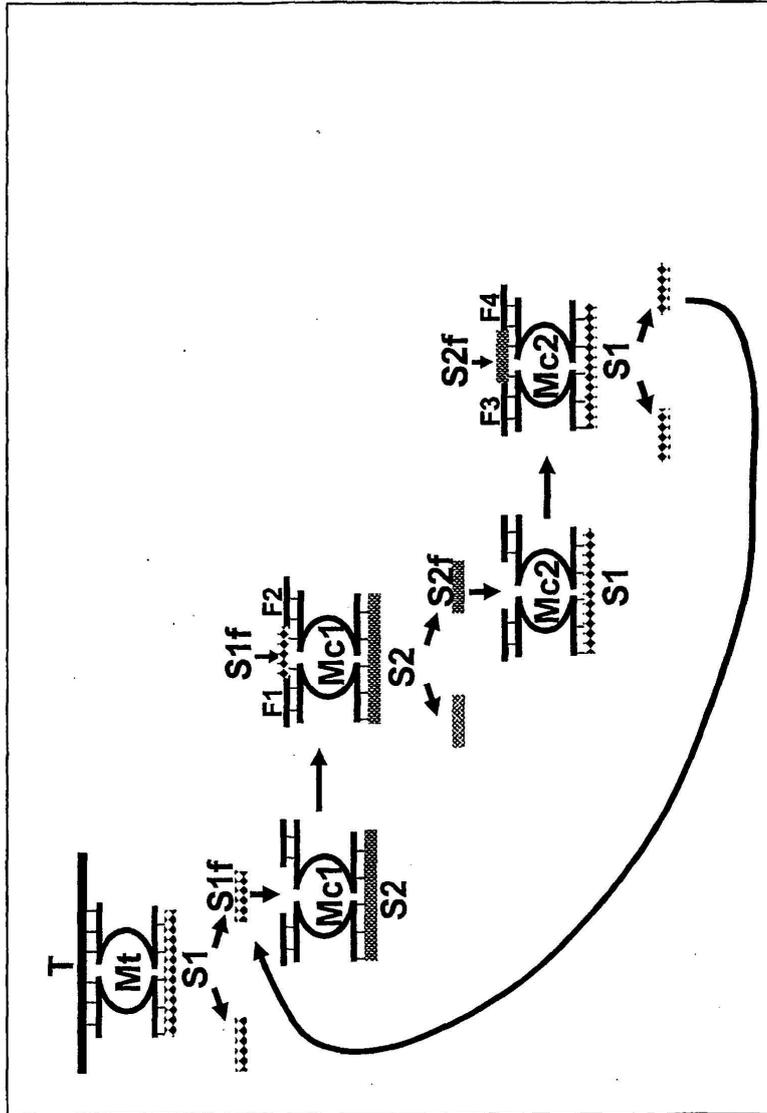


Figura 11

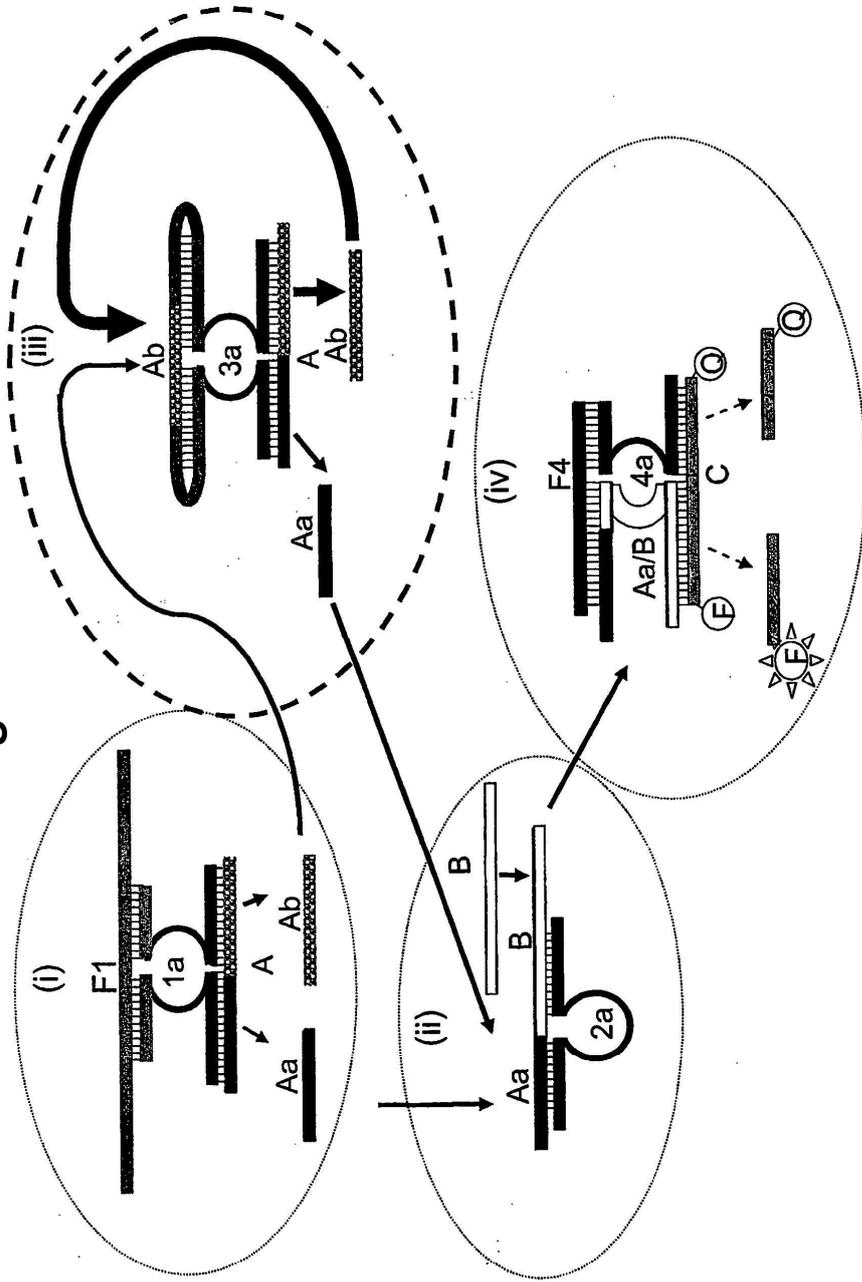


Figura 12

