

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 480**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G06F 19/20 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2014 PCT/US2014/011782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14113531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2014 E 14740468 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2946021**

54 Título: **Traductores secuestrados rotatoriamente**

30 Prioridad:

18.01.2013 US 201361754339 P
13.03.2013 US 201313801762

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.09.2018

73 Titular/es:

EMERALD THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
844 Dubuque Ave
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

KLEINBAUM, DANIEL J.;
FREZZA, BRIAN M.;
BOND, BRAD;
LEUNG, JONATHAN y
FRASER, GEORGE W.

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 682 480 T3

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

DESCRIPCIÓN

Traductores secuestrados rotatoriamente

ANTECEDENTES

5 [0001] La producción de ordenadores a nano-escala con moléculas ofrece un potencial sustancial, en parte porque dichos ordenadores pueden ser apropiados para solucionar ciertos problemas de computación. En concreto, los ordenadores que emplean biomoléculas pueden ser compatibles con entornos biológicos, haciéndolos propicios para el empleo en el diagnóstico de enfermedades complejas e incluso tratamientos.

10 [0002] La capacidad de traducir una secuencia de ácido nucleico en otra, en principio, permite a una de ellas construir puertas y redes lógicas con ácidos nucleicos. Estas puertas y redes son llevadas a cabo por dos acontecimientos, hibridación y desplazamiento de cadena, ambos son generalmente termodinámicamente favorables, p. ej., implican una transición de un estado superior - a un estado de energía inferior. Ambos acontecimientos pueden ocurrir espontáneamente en un sistema.

[0003] La hibridación implica tramos libres monocatenarios de ácidos nucleicos. En consecuencia, una red de ácido nucleico puede ser regulada por la disponibilidad de estas cadenas libres.

15 [0004] Un "acontecimiento secuestrado" permite a ciertas secuencias estar disponibles condicionalmente al resto de la red. Dichos acontecimientos autorizan la construcción de los traductores, que convierten una secuencia de ácido nucleico monocatenaria en una secuencia diferente de ácido nucleico monocatenaria. Estos traductores son la fundación sobre la cual se pueden construir, con ácidos nucleicos, operadores lógicos básicos como AND, NOT, OR, NAND, NOR, XOR, Y XNOR. De estos y otros componentes lógicos, se pueden construir redes más grandes
20 que incluyen componentes como amplificadores. En consecuencia, estos acontecimientos de traducción son importantes para el procesamiento de información con ácidos nucleicos y computación molecular.

RESUMEN

25 [0005] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, siempre y cuando sea una composición que se componga de un primer y un segundo compuesto de ácido nucleico cada uno compuesto por una primera, segunda, tercera, y cuarta cadenas de ácido nucleico, cada una de las cadenas compuestas secuencialmente por, un primer, un segundo y un tercer fragmentos, donde las cadenas nucleicas son definidas como B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$ y F-Y-C para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del primer compuesto, respectivamente, y $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, E-Y-D, F-Z-G, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del segundo compuesto, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cadena de letras conectadas por "-" indica una cadena, y donde: cada uno de los primeros y los segundos compuestos comprenden una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena ($X::\bar{X}$ y $\bar{Y}::Y$, en los primeros y segundos compuestos, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena ($Y::\bar{Y}$ y $Z::\bar{Z}$), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena ($D::\bar{D}$ y $\bar{F}::F$), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena ($\bar{C}::C$ y $E::\bar{E}$); en cada uno de los primeros y segundos compuestos, el primer fragmento (B y \bar{C} , en el primer y segundo compuesto, respectivamente) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A} y D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento (F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios; la tercera cadena del primer compuesto ($\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$) contiene una secuencia de complementariedad apropiada con respecto a la segunda cadena del segundo compuesto (E-Y-D) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del primer compuesto (F-Y-C) contiene una secuencia de complementariedad apropiada con respecto a la primera cadena del segundo compuesto ($\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

45 [0006] En un aspecto, la composición se compone más adelante de un tercer compuesto de ácido nucleico que consta de una primera y una segunda cadenas de ácidos nucleicos, cada una de las cadenas se compone, secuencialmente de, un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde la primera y segunda cadenas son definidas como E-Z-H y $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$ respectivamente, donde el tercer compuesto de ácido nucleico se compone de una región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadenas ($Z::\bar{Z}$) y el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento de la segunda cadena (\bar{F}) son monocatenarios, y donde:

50

La tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) contiene una secuencia de complementariedad apropiada con respecto a la segunda cadena del tercer compuesto ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación;

5 Y la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) contiene una secuencia de complementariedad apropiada con respecto a la primera cadena del tercer compuesto (E-Z-H) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

10 **[0007]** En algunos aspectos, el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto y el primer fragmento (E) de la primera cadena del tercer compuesto contienen una secuencia de complementariedad, pero no establece la unión entre ellas en condiciones normales de hibridación debido a la modificación química de uno o ambos fragmentos; y el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto y el tercer fragmento (\bar{F}) la primera cadena del tercer compuesto contiene una secuencia de complementariedad, pero no establece la unión entre ellos en condiciones normales de hibridación debido a la modificación química de uno o ambos fragmentos.

15 **[0008]** Las modificaciones químicas convenientes para practicar la presente tecnología incluyen, sin restricción, la sustitución de azúcar-fosfodiéster de la estructura de un fragmento de ácido nucleico con un mini-PEG-conjugado, serina-derivada gamma-APN. En algunos aspectos, la modificación química comprende la sustitución de un análogo de citosinas tricíclicas para la base nitrogenada de al menos un nucleósido en un fragmento de ácido nucleico. En un aspecto, la modificación química comprende la introducción de un heteroátomo en la posición 2' de una fracción de azúcar en un nucleótido

20 **[0009]** Las ilustraciones de los compuestos y sus relaciones se encuentran en la **FIG. 6A**, donde el traductor **102** concuerda con el primer compuesto, el traductor **103** concuerda con el segundo compuesto, y el traductor **104** concuerda con el tercer compuesto. De la misma manera, las **FIG. 10-13, 14A-D, y 15-16**, también ilustran a traductores (compuestos de ácido nucleico) en la amplitud del presente descubrimiento, incluyendo cada traductor individual y sus combinaciones como conjuntos de traductores (o en forma de una composición).

25 **[0010]** En un aspecto, cada fragmento tiene una longitud de 5 a 50 bases aproximadamente. En otro aspecto, cada fragmento monocatenario mide aproximadamente de 5 bases a 30 bases de longitud.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011] Presentamos como inclusiones de este descubrimiento dibujos que ilustran sólo a modo de ejemplificación, y no como limitación, donde:

30 La **FIG. 1A** ilustra la implementación de secuestro en fase sólida de un traductor de ácido nucleico, donde secciones individuales (A, B, etc.) representan períodos de oligonucleótidos de longitud y secuencia arbitrarias;

La **FIG. 1B** ilustra como la implementación de secuestro en fase sólida de un traductor de ácido nucleico secuestra también períodos de oligonucleótidos;

35 La **FIG. 2A** ilustra la implementación de "un punto de apoyo" (*toe-hold*) secuestrado de un traductor de ácido nucleico. Además, secciones individuales representan períodos de oligonucleótidos de longitud y secuencia arbitrarias;

La **FIG. 2B** ilustra como la aplicación del punto de apoyo secuestrado mostrada en la **FIG. 2A** secuestra períodos de oligonucleótidos;

40 **FIG. 3A** muestra un sistema de tres puntos de apoyo secuestrados de traductores de ácido nucleico. Las reacciones mostradas son todas reacciones de desplazamiento de cadena que continúan por el mismo mecanismo de migración ramificada que en la **FIG. 2A**;

45 La **FIG. 3B** muestra un sistema con los mismos oligonucleótidos mostrados en la **FIG. 3A**, pero, en lugar de reacciones de desplazamiento de cadena, se muestran puntos de apoyo "enfrentados" (*toe-hold "clashes"*), donde el punto de apoyo está unido por una secuencia que no puede producir una reacción de desplazamiento de cadena. Esta unión ocupa el punto de apoyo de manera que la unión de la cadena deseada no es posible;

50 La **FIG. 4a-b** muestra reacciones de intercambio con (a) o sin puntos de apoyo (b) en tampón PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) a 37°C. Señales fluorescentes se convirtieron en concentraciones a través del uso de una curva estándar. a) 50 nM [F-(A₂₄)::(\bar{A}_{24})-Q]₀ doble fue incubado con una valoración de 10-200 nM [(A₂₄)₀] por los incrementos de 10 nM (azul a rojo) y las concentraciones de [F-(A₂₄)_t] libre fueron supervisadas por resonancia de fluorescencia de transferencia de energía (FRET), b) 50 nM [F-(A₂₄)::(\bar{A}_{24})-Q]₀ doble fueron mezclados con una valoración de 10-200

$nM [(A_{24})::(\bar{A}_{24})]_0$ por los incrementos de 10 nM (de inferior a superior) y concentraciones de $[F-(A_{24})::(\bar{A}_{24})]_t$ fueron supervisadas vía FRET;

La **FIG. 5** ilustra una aproximación a partir del intercambio de puntos de apoyo para el diseño de traductores;

5 La **FIG. 6A-6B** ilustra compuestos nucleicos (traductores) empleados por un sistema rotatorio secuestrado;

10 La **FIG. 7** muestra estructuras de médulas modificadas para ácidos nucleicos análogos, donde "B" representa una nucleobase arbitraria, y (a) muestra una estructura natural de fosfodiéster encontrada en el ADN, (b) muestra ácidos nucleicos peptídicos, (c) muestra ácidos nucleicos peptídicos de guanidina, (d) muestra L-serina derivado de gama-APNs, (e) muestra fosfordiamidatos (aquí con un morfolino de azúcar), y (f) y (g) muestran mini-PEG conjugada, serina derivada de gama-APNs;

15 La **FIG. 8** ilustra estructuras modificadas de azúcar para ácidos nucleicos análogos, donde "B" representa una nucleobase arbitraria, y (a) muestra una desoxirribosa natural de azúcar encontrada en el ADN, (b) muestra morfolinos, (c) muestra ácidos nucleicos cerrados, y (d) muestra derivado de flúor modificado de ARN;

La **FIG. 9** ilustra estructuras de nucleobase modificadas para los ácidos nucleicos análogos metilcitosina (a), diaminopurina (b), fenoxazina (c), y G-clamp (d);

La **FIG. 10** representa un adaptador mARN;

La **FIG. 11** muestra un adaptador ARNi;

20 La **FIG. 12** ilustra un adaptador antisentido;

La **FIG. 13** muestra un conjunto de traductores de carga de entrada (*fan-in translator set*);

25 La **FIG. 14A-14D** representa cuatro conjuntos de traductores de carga de salida (*fan-out translator sets*). Dos de estos conjuntos producen dos o más traductores aún más idénticos, trabajando así como amplificadores (**A y B**), mientras otros dos conjuntos generan dos o más traductores diferentes en fases posteriores (**C y D**);

La **FIG. 15** ilustra un conjunto de traductores compuesto condicional;

La **FIG. 16** muestra un inversor;

30 La **FIG. 17A-M** presenta los resultados de simulación tanto para las redes Rotatorias de Traductores Secuestrados (RST) como para las redes de Traductores Secuestrados de Punto de Apoyo (THST), tanto en lo que concierne a señales de primer plano como a señales de fondo, para diferentes tamaños de puntos de apoyo, oscilando de 3 nucleótidos (nt) a 15 nt (como indicado). Todas las simulaciones fueron realizadas con traductores 100 nM para 3 etapas;

35 La **FIG. 18A-D** muestra los resultados de simulación para las redes RST y THST en profundidades diferentes de las redes. (p. ej., el número de transistores/etapas involucrados, como ya indicado). Todas las simulaciones fueron realizadas con un punto de apoyo de 8 nt en concentraciones de traductores de 100 nm; y

La **FIG. 19A-N** presenta los resultados de simulación con redes de tamaño moderado (5 etapas) para ambos, largos (13 nt) y cortos (8 nt) puntos de apoyo y muestran como el comportamiento de las redes cambió con la variación de las concentraciones indicadas de los traductores.

40 **[0012]** Algunas o todas las figuras son representaciones esquemáticas a modo de ejemplificación; de ahí que no necesariamente representan los tamaños reales relativos o las posiciones de los elementos mostrados. Las figuras son presentadas con el objetivo de ilustrar una o varias inclusiones con la comprensión explícita que éstos no serán utilizados para limitar el ámbito o el significado de las reivindicaciones que se especifican a continuación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0013]** El secuestro en fase sólida, puntos de apoyo secuestrados, e intercambio de puntos de apoyo son los diferentes enfoques que pueden ser utilizados en la traducción de secuencias de ácido nucleico para construir operadores y redes lógicas. Como se describirá más detalladamente a continuación, estas tres aproximaciones específicas son ejemplificadas con geometrías triples, reacciones de migración mediante puntos de apoyo. Para obtener reacciones de migración de ramificación también son posibles mecanismos adicionales, incluyendo, pero

no limitados a migraciones de 4 ramificaciones, migración cuádruple acelerada, y migración compleja de multi-filamentos.

[0014] De este modo, mientras hay inclusiones como las descritas más adelante que utilizan la migración de triple ramificación con intención ilustrativa, la presente invención contempla puertas y redes lógicas de ADN construidas para utilizar otras secuencias de migración de ramificación. A la inversa, las inclusiones de esta invención pueden ser aplicadas a cualquier reacción de migración de ramificación.

[0015] A lo largo de esta revelación de información y en las figuras adjuntas, las letras mayúsculas, p.ej., A, B, C, X, Y, Z, opcionalmente con subíndices o superíndices, se utilizan para representar un tramo, también denominado "fragmento", de oligonucleótidos de longitud arbitraria. Las correspondientes A', B', C', X', Y', Z' o de manera intercambiable \bar{A} , \bar{B} , \bar{C} , \bar{X} , \bar{Y} , \bar{Z} representan el complemento opuesto correspondiente.

[0016] Los términos "oligonucleótidos", "polinucleótidos" y "ácidos nucleicos" se utilizan aquí para abarcar todas las formas de moléculas de ácido nucleico. Esta categoría incluye, sin ninguna restricción, ácidos ribonucleicos (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ácidos péptido-nucleicos (APN), y sus derivados, con y sin modificaciones, respectivamente.

15 **Secuestro en Fase sólida**

[0017] El secuestro en fase sólida implica la separación física de las secuencias/cadenas relevantes en el espacio por medio de microesferas, nanopartículas, o superficies. Esta aproximación emplea principios de aislamiento del sitio, que han encontrado un uso extenso en la química orgánica. El ritmo de desplazamiento de estos acontecimientos en geometrías secuestradas en fase sólida puede ser controlado regulando si las cadenas necesarias se encuentran tanto en la fase de solución o en la fase sólida del sistema.

[0018] La **FIG. 1A** muestra la configuración de secuestro de una fase sólida básica para un traductor, un componente que permite a un sistema substituir una secuencia de ácido nucleico por otra. Para la cadena A'-X', cada uno de ellos A y X representa un tramo de oligonucleótidos de longitud y secuencia arbitrarias, y X' y A' representan sus respectivos complementos opuestos. Unida a un punto de apoyo sólido, la cadena A'-X' se hibrida inicialmente a Y-B-X, formando una estructura de ácido nucleico en forma de doble base par incompleta, que puede funcionar como un traductor. En esta configuración la cadena Y-B-X es una fase sólida secuestrada y, por consiguiente, no puede interactuar con el resto del sistema. Además, en la presencia de la cadena X-A, denominada como una "molécula de desplazamiento polinucleótido," la cadena Y-B-X puede ser desplazada del soporte sólido y expuesta a la fase de solución del sistema, mientras la cadena X-A está unida al soporte. Esta operación implica dos pasos; el primero es la hibridación de secuencias complementarias A and A' (a menudo denominada como " punto de apoyo de unión "). En el segundo paso la región X de cadena X-A une a la región X' de A'-X', desplazando la región X de Y-B-X y liberando esta cadena en la solución mientras deja X-A unida al soporte sólido (este paso es denominado normalmente como una "reacción de migración de ramificación"). Este proceso de dos pasos permite eficientemente la traducción de una cadena libre X-A en una cadena libre Y-B-X.

[0019] La **FIG.1B** muestra un sistema que contiene una cadena de entrada X-A que interactúa con una base par doble incompleta, "Traductor 1. " La salida incluye una base par doble completa A'-X'/X-A, que es considerado como un producto "residuo", y una cadena de salida Y-B-X, que es denominada como " Salida 1 " y puede ser utilizada como " Entrada 2 " en una reacción posterior. La "Entrada 2" interactúa con "Traductor 2 " y produce la "Salida 2 " y otro producto residuo. En esta figura, la región B de la cadena Y-B-X ilustra el secuestro de secuencias en esta red. Al principio, Y-B-X no puede hibridarse con la región B' del Traductor 2 porque ambos están secuestrados en soportes sólidos separados. Cuando la Entrada 1 une al Traductor 1 y libera Y-B-X en la solución, Y-B-X puede entonces interactuar con el Traductor 2. Por lo tanto, la capacidad de Y-B-X y el Traductor 2 para interactuar es condicional con la presencia de Entrada 1.

[0020] Las cadenas unidas a una superficie sólida interactúan extremadamente despacio con cadenas en otra superficie sólida debido a efectos estéricos. Por consiguiente, las cadenas en la fase de solución son los únicos componentes que pueden interactuar con los operadores de fase sólida.

Punto de apoyo secuestrado

[0021] El punto de apoyo secuestrado logra las mismas operaciones que los traductores de fase sólida, pero funciona manteniendo los tramos de secuencia estrechamente vinculados a un doble. Del mismo modo que en el traductor de fase sólida, un desplazamiento puede liberar la secuencia de interés. Todas las cadenas pueden estar juntas en la solución, cuya consecuencia es que los desplazamientos son regulados por la disponibilidad de puntos de apoyo. El término "punto de apoyo" hace referencia aquí a los tramos cortos de secuencias de ácido nucleico monocatenario que proporcionan un punto de partida para un desplazamiento.

[0022] La **FIG. 2A** muestra un traductor secuestrado de punto de apoyo similar al de la **FIG. 1A**, pero basado en un punto de apoyo más bien que en un secuestro en fase sólida. En este ejemplo, la región A' del traductor es el punto de apoyo que une la cadena de entrada y permite la reacción de desplazamiento de la cadena.

[0023] La **FIG. 2B** muestra un sistema basado en punto de apoyo que contiene una cadena de entrada A-X-B que interactúa con una base par doble incompleta, "Traductor 1." La salida incluye un producto residuo, p. ej., una base par doble completa, B'-X'-A'/A-X-B, y "Salida 1" cadena X-B-Y-C, que puede ser utilizada como "Entrada 2" en una reacción posterior. "Entrada 2" interactúa con "Traductor 2" y produce "Salida 2" y otro producto residuo. En esta figura, la región de B de X-B-Y-C está secuestrada en el Traductor 1 por hibridación a una región B' complementaria y por lo tanto incapaz de interactuar con la región B' del Traductor 2. La capacidad de X-B-Y-C para interactuar con el Traductor 2 está condicionada en presencia de Entrada 1 (A-X-B) en el sistema.

[0024] Aunque potencialmente muy útiles, las aplicaciones de las geometrías de punto de apoyo han sido limitadas hasta el momento por el índice en el cual un sistema que contiene dichas geometrías de punto de apoyo puede propagar información. Con frecuencia las limitaciones inherentes en aproximaciones convencionales de punto de apoyo secuestrado pueden ralentizar la propagación resultante en una escala de tiempo biológicamente útil. Más específicamente, los traductores secuestrados de punto de apoyo trabajan a velocidades razonables sólo en un rango dinámico estrecho de concentraciones como consecuencia de las interacciones de enfrentamiento. Al ajustar la longitud de los puntos de apoyo, las interacciones de enfrentamiento pueden hacerse reversibles en concentraciones menores. Sin embargo, a medida que la concentración aumenta el enfrentamiento dominaría, y el sistema se detendría por completo. Si la concentración disminuye, por otra parte, el desplazamiento de punto de apoyo transmitido también se detendría por completo. En este contexto, cabe destacar que, en un contexto biológico, las concentraciones pueden variar ampliamente; de ahí que dichos traductores son poco apropiados para su uso en el contexto real biológico. Se cree que los obstáculos cinéticos son el resultado de reacciones improductivas, denominadas aquí como puntos de apoyo "enfrentados," esto ocurre cuando un punto de apoyo es unido por una molécula teniendo una secuencia complementaria o "cadena incompatible" que no puede producir una reacción de desplazamiento.

[0025] Por ejemplo, la **FIG. 3A** muestra un sistema de tres puntos de apoyo secuestrados de traductores de ácido nucleico, con más similitud con el de la **FIG. 2A**. Sin embargo, si las tres cadenas se encuentran juntas en la solución, hay otras uniones que pueden tener lugar. La **FIG.3B** ilustra algunas de las uniones no productivas o enfrentamientos que pueden tener lugar. Al implicar "una molécula polinucleótida enfrentada," estos acontecimientos no conducen a una reacción de desplazamiento, pero puede ralentizar el sistema, ya que la incidencia de una cadena incompatible bloquea la unión de cadenas que pueden producir una reacción de desplazamiento. Dichas incompatibilidades pueden presentarse de modo más dominante cuando las concentraciones de los traductores de ácidos nucleicos aumentan en un sistema.

[0026] Otra limitación de esta aproximación es la toxicidad potencial que resulta de la exposición de las grandes regiones monocatenarias de los traductores. Por ejemplo, cuando una región monocatenaria se une a ADN endógeno o a ARN en una célula, esto puede alterar la transcripción, traducción, o cualquier otra función de la molécula de ADN o ARN. Dicho acontecimiento "no objetivo" puede conducir a consecuencias indeseadas en la célula.

[0027] Otra limitación es la pérdida de señal potencial debido a las reacciones de fondo de los traductores en ausencia de puntos de apoyo expuestos, hecho que también puede conducir a consecuencias indeseadas. Por ejemplo, la **FIG. 4a** muestra que la reactividad entre un traductor y un punto de apoyo asciende con el aumento de concentración del punto de apoyo. Sin embargo, en ausencia del punto de apoyo, también se observó reactividad de fondo (**FIG. 4b**).

[0028] Una solución propuesta es mantener puntos de apoyo cortos para mitigar el efecto de los enfrentamientos en el sistema: cuanto más corto es el punto de apoyo, más rápido puede ser el ritmo on/off de la secuencia complementaria. De este modo, son comunes cinco o seis puntos de apoyo largos de nucleótidos porque en estas longitudes, si tiene lugar una unión no productiva, el tiempo empleado en el estado bicatenario, "incompatible" es corto.

[0029] Sin embargo, esta aproximación crea los ya mencionados obstáculos cinéticos, porque la unión productiva está restringida por los mismos parámetros termodinámicos; de ahí, que la cadena de entrada no pueda unirse fuertemente a estos puntos de apoyo. En consecuencia, el desplazamiento deseado no siempre ocurre cuando la cadena de entrada correcta se une, ya que tiene que estar en estado de unión el tiempo suficiente para iniciar la reacción de desplazamiento. El empleo de puntos de apoyo cortos aumenta de esta manera la cantidad de tiempo requerida para una operación dada para provocar y producir una salida. Dicho de otro modo, la reacción de desplazamiento no puede tener lugar antes de muchos acontecimientos obligatorios, tanto por cadenas incompatibles como por cadenas deseadas. Esta ineficiencia limita la utilidad del sistema al ralentizar la propagación de información a plazos de tiempo demasiado prolongados para ser útiles.

[0030] Puntos de apoyo más cortos, junto con regiones monocatenarias más cortas en los traductores, también pueden ayudar a reducir toxicidades. Sin embargo, los puntos de apoyo más cortos no solucionan el problema con la pérdida de señal.

Intercambio de punto de apoyo

[0031] "El intercambio de punto de apoyo," utiliza interacciones de unión similares al de punto de apoyo secuestrado, pero con diferentes geometrías. El intercambio de punto de apoyo intentó solucionar el problema de conflicto de punto de apoyo planteado por la aproximación de punto de apoyo secuestrado. Referente a la **FIG. 5**, el punto de apoyo inicial, A-B, es sólo parcialmente complementario a una región monocatenaria en el doble justo debajo del punto de apoyo (p. ej., A:: \bar{A}). De la misma manera, cuando el punto de apoyo B-C-D es generado a través de una reacción de intercambio con el punto de apoyo A-B, el punto de apoyo B-C-D es sólo parcialmente complementario a la región monocatenaria del doble también bajo el mismo. Y de esta manera, ningún conflicto de punto de apoyo ocurriría.

[0032] Pese a todo, la aproximación de intercambio de punto de apoyo también tiene limitaciones inherentes. En primer lugar, como en el punto de apoyo secuestrado, las regiones monocatenarias largas de los traductores pueden causar un efecto tóxico indeseado debido a las uniones no objetivo a ácidos nucleicos endógenos en una célula.

[0033] Otra cuestión se relaciona con el rango dinámico de la traducción que es similar, aunque no igual, a las cuestiones encontradas en el punto de apoyo incompatible. Sin embargo, esta cuestión es menos severa con el intercambio de punto de apoyo, ya que éste impacta en la velocidad de traducción incluso más que ceder. En este caso las longitudes de los puntos de apoyo determinan el índice de disociación espontánea, que es más rápida con puntos de apoyo más cortos. Por otra parte, también determinan el índice de desplazamiento delantero, pero puntos de apoyo más largos aceleran el desplazamiento delantero. Por lo tanto, hay un equilibrio entre estas restricciones en una concentración dependiente.

[0034] Una limitación importante en la aproximación de intercambio de punto de apoyo es el bajo rendimiento, como todas las reacciones son bidireccionales, sin hacer ningún favoritismo de producto final a menos que, por ejemplo, la traducción en su totalidad esté unida al final de una reacción irreversible.

Traductores secuestrados rotatoriamente

[0035] El presente descubrimiento proporciona una serie de traductores que solucionan los problemas planteados por las aproximaciones detalladas anteriormente. Con estos traductores, los efectos tóxicos no-objetivo y los antecedentes de reactividad se minimizan, los conflictos de punto de apoyo pueden evitarse, el rendimiento global está cerca de completarse, y la velocidad de traducción todavía mejora considerablemente.

[0036] La **FIG. 6A** ilustra ciertos componentes básicos en un sistema "traductor secuestrado rotatoriamente". En la parte superior se encuentra un ácido nucleico compuesto (**101**) formado entre dos cadenas, A-X-C y $\bar{D} - \bar{X} - \bar{B}$. En virtud de su secuencia de complementariedad, se forma una región doble X:: \bar{X} , mientras que A, C, \bar{D} , y \bar{B} permanecen monocatenarias. Este doble parcial es denominado entonces como un "punto de apoyo dual."

[0037] El segundo ácido nucleico compuesto (**102**) mostrado en la **FIG.6A** está compuesto por cuatro cadenas nucleicas, B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$, y F-Y-C. Como se indica, estas cadenas forman cuatro regiones dobles entre ellas, y dejan cuatro regiones monocatenarias en los extremos. Una de estas cuatro cadenas, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, es complementaria de una de las cadenas, A-X-C, en el primer compuesto, mientras que otra cadena, B-X-D, es complementaria de $\bar{D} - \bar{X} - \bar{B}$, la otra cadena del primer compuesto,

[0038] En virtud de la secuencia de complementariedad en las regiones monocatenarias colgantes, el primer compuesto (**101**) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para ser capaz de unirse al segundo compuesto (**102**), que inicia una reacción de desplazamiento de cadena que implica seis cadenas. La salida de la reacción de desplazamiento de cadena incluye dos dobles recodados completamente (**105** y **106**) y un nuevo punto de apoyo dual (**107**), teniendo una región doble en el centro y cuatro regiones monocatenarias separadas (**FIG. 6B**).

[0039] La **FIG. 6B** muestra que la salida de compuestos nucleicos (**105**, **106** y **107**) están en un estado de energía inferior, debido a dos dobles completos, A-X-C:: $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$ (**105**) y B-X-D:: $\bar{D} - \bar{X} - \bar{B}$ (**106**). En otras palabras, dicho desplazamiento de cadena favorece fuertemente la dirección hacia adelante y, de ahí, que no sea fácilmente reversible.

[0040] El punto de apoyo dual recién formado, que se compone de $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$ y F-Y-C (**107**), entonces puede iniciar otra reacción de desplazamiento de cadena con el tercer compuesto nucleico (**103**) en la **FIG. 6A** (véanse las flechas), y continuar con el proceso de traducción. De la misma manera, un nuevo punto de apoyo dual generado de esta reacción de desplazamiento puede dirigirse al cuarto compuesto (**104**), etc.

[0041] Tal y como se ha explicado anteriormente, en esta aproximación las reacciones de desplazamiento de cadena alcanzan un índice de alto rendimiento porque cada una de las reacciones genera productos de salida en un estado de energía mucho inferior que la entrada de moléculas de ácido nucleico. Como se muestra en la **Tabla 1**, además, datos experimentales muestran que dichas reacciones de puntos de apoyo duales mediados también

pueden ser bastante rápidos. Compare la columna de " Puntos de Apoyo Duales " con estos identificados como " Punto de apoyo 3' " o " Punto de apoyo 5' " .

Tabla 1. Comparación de la velocidad de reacción entre reacciones de desplazamiento de cadenas de punto de apoyo único - y punto de apoyo dual medicinal

5

Longitud del Punto de Apoyo (nt)	Observado el periodo de vida media de una reacción de [50 nM] ₀				
	Intercambio de cadena		Intercambio doble		
	Punto de Apoyo 3'	Punto de Apoyo 5'	Punto de Apoyo 3'	Punto de Apoyo 5'	Puntos de Apoyo Duales
25	-30 minutos	-30 minutos	-2 horas	-1 hora	-15 minutos
20	45 minutos	-30 minutos	-2 horas	-1 hora	-15 minutos
15	-30 minutos	-30 minutos	-2 horas	-1 hora	-15 minutos
10	-15 minutos	-15 minutos	> 15 horas	> 15 horas	-15 minutos
9	-15 minutos	-15 minutos	> 15 horas	> 15 horas	-15 minutos
8	-15 minutos	-15 minutos	> 15 horas	> 15 horas	-15 minutos
7	-15 minutos	-15 minutos	> 15 horas	> 15 horas	-30 minutos
6	-15 minutos	-3 horas	> 15 horas	> 15 horas	-5 horas
5	45 minutos	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	-2 horas
4	-3 horas	-9 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas
3	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas
2	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas
1	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas
0	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas	> 15 horas

[0042] De acuerdo con estos hallazgos, el presente descubrimiento proporciona un número de traductores y conjuntos de traductores, a veces denominados "adaptadores". Un traductor o conjunto de traductores toma una molécula de ácido nucleico como entrada (p.ej., el ácido nucleico monocatenario, dobles ácidos nucleicos completos o parciales, o estructuras de ácido nucleico o traductores más compuestos) y realiza una o varias reacciones de desplazamiento de cadena para producir una o varias moléculas de ácido nucleico como salidas. Cada una de estas entradas o salidas puede servir como salidas o entradas a otros traductores o conjuntos de

10

traductores en un sistema. Cada uno de estos traductores y conjuntos de traductores funcionan por lo tanto como un operador lógico y, en combinación, realizan el cómputo deseado y la transmisión de información.

[0043] Por ejemplo, en la FIG. 6B el traductor 102 toma un doble parcial, el punto de apoyo 101 como una entrada y experimenta una serie de reacciones de desplazamiento de cadena, conduciendo a la liberación de tres moléculas diferentes de ácido nucleico, los dobles 105 y 106 y un nuevo punto de apoyo 107. Aquí, el nuevo punto de apoyo 107 (p. ej., el distal/medio derecho de traductor 102) puede servir como una entrada a otros traductores. La producción del compuesto doble 105 y 106, debido a su alta estabilidad, ayuda a conducir las reacciones de desplazamiento a su fin en la dirección deseada.

[0044] Por consiguiente, en una incorporación el presente descubrimiento proporciona una composición que se compone de un primer y un segundo compuestos de ácidos nucleico, cada uno compuesto por la primera, segunda, tercera, y cuarta cadenas de ácido nucleico. Cada una de las cadenas se compone secuencialmente de (p. ej., de 5' a 3', consecutivamente o separado con nucleótidos intermedios) un primer fragmento, un segundo fragmento y un tercer fragmento, donde las cadenas de nucleico son definidos como:

B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$ y F-Y-C para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del primer compuesto respectivamente y

$\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, E-Y-D, F-Z-G, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del segundo compuesto respectivamente.

Cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena.

[0045] En un aspecto, cada uno de los primeros y segundos compuestos se compone de una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de las primera y segunda cadenas ($X::\bar{X}$ y $\bar{Y}::Y$, en el primer y segundo compuestos, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadenas ($Y::\bar{Y}$ y la $Z::\bar{Z}$), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena (la $D::\bar{D}$ y la $\bar{F}::F$), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena ($\bar{C}::C$ y $E::\bar{E}$).

[0046] En cada uno de los primeros y segundos compuestos, el primer fragmento (B y \bar{C} , en los primeros y segundos compuestos, respectivamente) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A} y D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento (F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios.

[0047] Además, la tercera cadena del primer compuesto ($\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la segunda cadena del segundo compuesto (E-Y-D) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del primer compuesto (F-Y-C) contiene la secuencia de complementariedad adecuada para la primera cadena del segundo compuesto ($\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

[0048] En un aspecto, la composición también se compone de un tercer compuesto de ácido nucleico compuesto de una primera y un segunda cadenas de ácido nucleico, cada una de estas cadenas se compone, secuencialmente, de un primer, un segundo y un tercer fragmentos, donde la primera y segunda cadenas son definidas como E-Z-H y $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$ respectivamente, donde el tercer compuesto de ácido nucleico se compone de una región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadenas ($Z::\bar{Z}$) y el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento del segunda cadena (\bar{F}) que son monocatenarios, y donde: la tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) contiene la secuencia de complementariedad adecuada para la segunda cadena del tercer compuesto ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la primera cadena del tercer compuesto (E-Z-H) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

Modificaciones químicas para evitar punto de apoyo incompatible

[0049] El presente descubrimiento también proporciona una metodología para prevenir el punto de apoyo incompatible. Como se ha mostrado en la FIG. 6A, el punto de apoyo incompatible todavía puede tener lugar entre, p.ej., el punto de apoyo (101) y el compuesto (103) debido a las regiones monocatenarias expuestas, C/ \bar{D} y \bar{C} /D.

[0050] En un método como este, cada fragmento de ácido nucleico que puede ser expuesto potencialmente como monocatenario durante el proceso de traducción es sujeto potencialmente a la modificación química. Además de su estado natural (estado N, anotada como subíndice en, p.ej., C_N), cada uno de dichos fragmentos puede ser

modificado para formar dos estados, estado R (p.ej., en la parte derecha) y L (en la parte izquierda), respectivamente, tanto tiempo como dichas modificaciones lo permitan (o promuevan) y prohíban (o inhiban) la unión entre las cadenas de complemento de ciertos estados como mostrado en la **Tabla 2** que se encuentra a continuación.

5

Tabla 2. Uniones Objetivas para las modificaciones químicas

Modificación de una cadena	Modificación de la cadena de complemento	Unión Permitida /Limitada
N	N	Permitida
N	R	Permitida
N	L	Permitida
R	R	Permitida
R	L	Limitada
L	L	Permitida

- 10 **[0051]** Con dichas modificaciones, en un aspecto el fragmento final (\bar{E}_L) de la tercera cadena del primer compuesto (**102**) contiene la secuencia de complementariedad inversa al fragmento delantero (E_R) del primer fragmento de la primera cadena del tercer compuesto (**104**), pero no establece la unión a ésta. De la misma manera, en otro aspecto el fragmento delantero (F_L) de la cuarta cadena del primer compuesto (**102**) contiene la secuencia de complementariedad inversa al fragmento de cola (\bar{F}_R) del primer fragmento de la primera cadena del tercer compuesto (**104**), pero no establece la unión a ésta. En consecuencia, ningún punto de apoyo incompatible tendría lugar y dichas modificaciones aseguran que las reacciones de desplazamiento aparezcan en un modo controlado. En un aspecto, por lo tanto, el término "rotatorio" es utilizado para referirse a las modificaciones (L y R) que modulan el secuestro, en lugar de las reacciones de intercambio empleadas.
- 15 **[0052]** Tal y como se utiliza aquí el término " sin unión estable " indica que dos cadenas de ácido nucleico no forman una estructura doble estable, aunque compartan la secuencia de complementariedad. En algunos aspectos, una estructura doble "estable" hace referencia a un doble que puede existir en un modo no transitorio en una concentración que es más alta que 0.1 %, o 1 %, o 5 %, o 10 % de la concentración total de cada cadena individual en una solución de reacción.
- 20 **[0053]** Tal y como se describe más adelante, se sabe que las modificaciones químicas pueden alcanzar los objetivos vinculantes definidos en la **Tabla 2**. "La modificación química " en este contexto no está limitada a la modificación química de una molécula de ácido nucleico después de que es producida; más bien la frase también abarca la incorporación de nucleótidos modificados químicamente mientras producen la molécula de ácido nucleico.
- 25 **[0054]** Hay muchas modificaciones de ácido nucleico bien caracterizadas que pueden ser utilizadas para modular las propiedades termodinámicas de unión al ADN o ARN natural. Éstos incluyen cambios en la estructura, azúcar, o nucleobase del oligonucleótido. Las modificaciones también pueden ser empleadas separada o conjuntamente entre ellas; es decir, el uso de una estructura modificada no impide el uso de una nucleobase modificada en la misma cadena.
- 30 **[0055]** Las estructuras de ácido nucleico análogas pueden ser utilizadas para mejorar la unión de cadenas capaces de producir una reacción de desplazamiento. Hay un número de diferentes analogías que podrían ser utilizadas, todas ofrecen afinidades de unión más firmes al ADN y ARN que ácidos nucleicos naturales. Estas analogías incluyen, pero no están limitadas a aquellas estructuras neutras (ácidos nucleicos peptídicos o fosfordiamidatos), médulas con cargas positivas (ácidos nucleicos peptídicos de guanidina), y enlaces de hidrógeno que tienen la pre-organización (ácidos nucleicos peptídicos gamma). En un aspecto, las médulas incluyen mini-PEG-conjugados, gama-APNs derivados de serina, como ilustrado en la **FIG. 7f-g**.
- 35 **[0056]** En la **FIG. 7** se muestran estructuras generales para ciertas analogías. Todas estas analogías mejoran la termodinámica de las reacciones de hibridación del ácido nucleico, permitiendo uniones de puntos de apoyo más

firmer y por lo tanto desplazamientos más rápidos. Con el uso de estas analogías en lugares específicos de la red lógica, las reacciones de desplazamiento deseadas pueden ser favorecidas en comparación con las interacciones incompatibles, acelerando así el índice de reacciones de desplazamiento de cadena deseables.

5 **[0057]** El empleo de anillos de azúcar modificados también puede alterar la termodinámica de uniones del ADN o ARN para un oligonucleótido. Las analogías más utilizadas son morfolinos, ácidos nucleicos bloqueados (LNAs), y derivados de LNA. También está documentado que otros azúcares modificados podrían producir un resultado similar, en términos de alteración de termodinámica obligatoria. Este hecho lo encontramos en azúcares con modificaciones en la posición 1', 2', 3' o 4' y azúcares con diferentes átomos substituidos por el oxígeno en el anillo de ciclopentano de ribosa. Estas analogías son ilustradas en la **FIG. 8**.

10 **[0058]** Las modificaciones de nucleobases también puede ser utilizadas para alcanzar el mismo efecto que la estructura y analogía del azúcar; específicamente, cambiando la termodinámica de reacciones de hibridación específicas. Estas bases incluyen metilcitosina, diaminopurina, G-clamp, y fenoxazina (**FIG. 9**), todo lo cual mejora la afinidad obligatoria de una cadena para su complemento opuesto. Otra oportunidad que existe con la modificación de nucleobases implica bases pseudo-complementarias. Esta categoría de analogías base forma pares de bases débiles entre ellos, pero forma pares de bases fuertes con bases estándar. Un par de bases tal es 2-amino-adenina (nA) y 2-thiothymina (sT). Estas bases podrían ser utilizadas para favorecer una unión de cadena y desfavorecer a otra, un ejemplo del aumento de la probabilidad de una unión productiva mientras disminuye la probabilidad de un conflicto al mismo tiempo.

20 **[0059]** Otra modificación química que podría ser utilizada para alterar la termodinámica de interacciones obligatorias es la incorporación de polímeros cargados como el chitosán, del que se ha documentado que acelera el índice de reacciones de desplazamiento. Sin embargo, dado que estos polímeros aceleran reacciones no específicamente, tendrían que ser utilizados en la conjugación con alguna de las otras modificaciones mencionadas anteriormente para permitir la discriminación entre las uniones deseadas e indeseadas.

25 **[0060]** Diferentes aproximaciones pueden ser utilizadas para sintetizar las moléculas con las modificaciones químicas analizadas anteriormente. Por ejemplo, la estructura química puede considerarse del diseño de las moléculas modificadas. La estructura química es lo que se utiliza para unir monómeros individuales en una cadena más larga. Las modificaciones que implican el nucleobase o el azúcar que mantienen la estructura del fosfodiéster natural de ADN/ARN puede ser sintetizado mediante química fosforamídita estándar, como el empleado para monómeros naturales. Podemos encontrar ilustraciones de estos métodos en, por ejemplo, Beaucage, S., and R. Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223 (1992), en Brown, D. M. A., "*Breve historia de síntesis oligonucleotida*," **MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR (Protocolos para Oligonucleótidos y Analogías)** 1-17 (1993), en Reese, Colin B., *Química Orgánica y Biomolecular* 3: 3851 (2005), y en Iyer, R. P.; y S.L. Beaucage, "*7.05. Síntesis Oligonucleotido*," **7 COMPRENSIVA NATURAL PRODUCTOS QUÍMICOS (ADN y Aspectos de Biología Molecular)** 105-52 (1999).

35 **[0061]** Si se cambia la estructura en una modificación particular, una química diferente será utilizada. Dicha modificación química se describe en la literatura científica. Así, ácidos nucleicos peptídicos (APNs) y sus derivados dependen de enlaces de amida para unir monómeros individuales. En lugar de utilizar fosforamídita química, por lo tanto, las cadenas de estos monómeros están hechas con enlaces de amida formando así reacciones reactivas como HBTU. Una exploración de los métodos utilizados para hacer APN como oligonucleótidos puede encontrarse, por ejemplo, en F. Arroyo, "*Síntesis de Fase Sólida de Oligómeros APN*," **MÉTODOS EN SERIES DE BIOLOGÍA MOLECULAR (Ácidos Nucleico Peptídico)**, Humana Press, <http://www.springerlink.com/content/mr571738x7t65067/>.

45 **[0062]** Estas modificaciones químicas incluyen la introducción de lateralidad en el fragmento de APN o ADN. La lateralidad de ADN, concretamente de APN, es un rasgo bien caracterizado, y también se conoce la metodología para generar lateralidad. Véase, p.ej., Corradini et al. "*Control de lateralidad helicoidal dado en nanoestructuras de ADN y APN*," **MÉTODOS MOL BIOL.** 749:79-92 (2011). El ADN izquierdo o APN son excluidos de la unión al ADN derecho o APN, mientras que ambos pueden unirse con sus homólogos naturales.

50 **[0063]** Otra aproximación sobre la modificación de la estructura implica oligonucleótidos quiméricos. Éstas son cadenas de oligonucleótidos que contienen diferentes estructuras químicas en la misma molécula. Por ejemplo, si una necesitaba una cadena que era media estructura de APN y media estructura de ADN, necesitaría un modo de unir estas dos estructuras químicas diferentes. También es conocida la fabricación de estas cadenas quiméricas. En el ejemplo ya mencionado sobre una quimera APN/ADN, la diferencia en las químicas puede ser superada utilizando monómeros de ADN o APN modificado. Para el ADN, el 5' de hidroxilo protegido con dimetoxitritilo (DMT) es substituido por una amina protegida con un monometoxitritilo (MMT) - que puede reaccionar con el ácido carboxílico de un APN después de ser desprotegido. Para APN, el nitrógeno terminal protegido N es reemplazado por un hidroxilo protegido DMT que puede reaccionar con el grupo fosforamídita sobre el ADN después de su desprotección. Estas aproximaciones son descritas también, por ejemplo, en E. Uhlmann et al., *Angew. Chem. (Int'l editor.)* 37: 2796 - 823(1998).

[0064] Todas estas modificaciones, tanto si son utilizadas individual o conjuntamente entre ellas, pueden afectar a las condiciones termodinámicas de interacciones específicas en una red de ácido nucleico arbitraria de manera que la unión de las cadenas o compuestos deseados son escogidos sobre las interacciones incompatibles sin alterar el contenido de la secuencia. Todas estas interacciones pueden aplicarse a cualquier reacción de migración de ramificación arbitrada, tanto si son migraciones de 3 ramificaciones, como secuestro en fase sólida, punto de apoyo secuestrado, o el intercambio de punto de apoyo, o son migraciones de ramificación que ocurren a causa de otros mecanismos, p.ej., la migración de ramificación cuádruple, la migración acelerada de ramificación cuádruple, o la migración de compuesto de multi-cadena.

Adaptadores y Conjuntos de Traductores

[0065] Los traductores proporcionados en este descubrimiento pueden ser utilizados para construir ordenadores de ácido nucleico, que pueden ser útiles médicamente. Por ejemplo, los traductores pueden "sentir" la presencia de un ácido nucleico viral y llevar a cabo una serie de acontecimientos de traducción, causando en la " liberación" de un ARN regulador (p.ej., si ARN, el ARN antisentido) que puede ser utilizado para iniciar una respuesta antiviral o apoptosis de la célula huésped, y así eliminar el virus.

I. Adaptador mARN

[0066] "El sentir" puede ser implementado como la iniciación de una o varias reacciones de desplazamiento de cadena, tomando un ácido nucleico como entrada (p.ej., ADN/ARN viral, tumor de N/ARN), y liberando uno o varios puntos de apoyo como salida. Los traductores que realizan dichas reacciones de uno o varios desplazamientos de cadena son denominados "adaptadores". En el caso de sentir un tumor mARN, por ejemplo, dicho adaptador puede ser llamado un " adaptador de mARN".

[0067] En la **FIG. 10** se muestra un adaptador de mARN. Una secuencia única en el mARN (**201**) es identificada teniendo un periodo de fragmentos, $\bar{R}_{RNA}-\bar{P}_{RNA}$, o $\bar{R}_{RNA}-\bar{P}_{RNA}-\bar{Q}_{RNA}$. Un primer compuesto nucleico (**202**) del adaptador mARN es diseñado para incluir dos cadenas, una de las cuales tiene una secuencia complementaria (S-Q-P) al mARN. La otra postura, también mostrada en la **FIG. 10**, forma una región doble con la primera cadena (Q-P:: $\bar{P} - \bar{Q}$), y tiene una región monocatenaria, A- \bar{B} .

[0068] El segundo compuesto en el adaptador mARN (**203**) incluye al menos tres cadenas. Una primera cadena (P-B- \bar{A}) es parcialmente complementaria a la segunda cadena del compuesto **202**, formando dos regiones dobles separadas (\bar{A} ::A and B:: \bar{B}) con la segunda y tercera cadena. En ausencia de la primera cadena, la segunda y tercera cadena toman la forma de un punto de apoyo dual como ya descrito anteriormente.

[0069] En una célula que contiene el adaptador mARN que incluye compuestos **202** y **203**, por lo tanto, sobre la presencia de la molécula mARN **201**, el mARN inicia una reacción de desplazamiento de cadena con el compuesto **202**, liberando así la segunda cadena (A- $\bar{B} - \bar{P} - \bar{Q}$). La cadena liberada enfoca entonces el compuesto **203**, causando en una reacción de desplazamiento de cadena la liberación de un compuesto (**204**) que incluye la segunda y tercera cadena, en forma de un punto de apoyo dual. Dicho punto de apoyo dual (**204**) es capaz de iniciar reacciones de desplazamiento de cadena adicionales como se describe aquí. Véase, p.ej. **FIG. 6A**.

[0070] Dicho "adaptador mARN " no solo siente una molécula mARN. Puede sentir cualquier ácido nucleico monocatenario, incluyendo sin restricción el ADN viral y el tumor mutado de ADN.

[0071] Por consiguiente, el presente descubrimiento proporciona una composición que comprende un primer compuesto de ácido nucleico (p.ej., **202** en la **FIG. 10**) y un segundo compuesto de ácido nucleico (**203**). El primer compuesto (**202**) se compone de (a) una primera cadena compuesta secuencialmente por, un primer fragmento (S), un segundo fragmento (Q), un tercer fragmento (P), y un cuarto fragmento (Q), y (b) una segunda cadena compuesta secuencialmente por un primer fragmento (A), un segundo fragmento (B), un tercer fragmento (\bar{P}), y un cuarto fragmento (\bar{Q}). El primer compuesto se compone de una región doble formada entre el segundo y tercer fragmento (Q-P) de la primera cadena y el tercer y cuarto fragmento ($\bar{P} - \bar{Q}$) de la segunda cadena.

[0072] Además, el segundo compuesto (**203**) se compone de (a) una primera cadena compuesta secuencialmente por, un primer fragmento (P), un segundo fragmento (B) y un tercer fragmento (\bar{A}) que tiene una secuencia de complementariedad apropiada para el primer fragmento (A), segundo fragmento (\bar{B}) y tercer fragmento (\bar{P}) de la segunda cadena del primer compuesto, respectivamente, para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación, (b) una segunda cadena compuesta secuencialmente por, un primer fragmento (A), un segundo fragmento (X), y un tercer fragmento (C) y (c) una tercera cadena compuesta secuencialmente por un primer fragmento (\bar{D}), un segundo fragmento (\bar{X}), y un tercer fragmento (\bar{B}). El segundo compuesto (**203**) se compone de una primera región doble formada entre el tercer fragmento (\bar{A}) de la primera cadena y el primer fragmento (A) de la segunda cadena, una segunda región doble formada entre el segundo fragmento (B) de la primera cadena y

el tercer fragmento (\bar{B}) de la tercera cadena, y una tercera región doble formada entre el segundo fragmento (X) de la segunda cadena y el segundo fragmento (\bar{X}) de la tercera cadena.

[0073] Tal y como se muestra en la **FIG. 10**, se contemplan modificaciones químicas a los fragmentos de ácido nucleico que pueden ser expuestos como cadenas únicas para reducir o evitar puntos de apoyo incompatibles.

5 **[0074]** De acuerdo con un aspecto del descubrimiento, una incorporación del descubrimiento proporciona una composición compuesta por: (a) un primer compuesto de ácido nucleico compuesto de (i) una primera cadena de nucleico que se compone secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento y se define como S-Q-P, donde cada letra indica un fragmento y una cuerda de letras unidas por "-" indica a su vez una cadena, y (ii) una segunda cadena que se compone secuencialmente de, un primer, segundo, tercer y cuarto fragmento definido
10 como $A-\bar{B}-\bar{P}-\bar{Q}$, donde el primer compuesto consta de una región doble (Q-P:: $\bar{P}-\bar{Q}$) formada entre los segundos y terceros fragmentos de la primera cadena y el tercer y cuarto fragmento de la segunda cadena; y (b) un segundo compuesto de ácido nucleico que se compone de (i) una primera cadena de ácido nucleico compuesto secuencialmente por, un primer, segundo y tercer fragmento definido como P-B- \bar{A} , (ii) una segunda cadena de ácido nucleico compuesta secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento definido como A-X-C, y (iii)
15 una tercera cadena compuesta secuencialmente por, un primer, segundo y tercer fragmento definido como $\bar{D}-\bar{X}-\bar{B}$, donde el segundo compuesto se compone de una primera región doble ($\bar{A}::A$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la segunda cadena, una segunda región doble (B:: \bar{B}) formada entre el primer fragmento de la primera cadena y el tercer fragmento de la tercera cadena, y una tercera región doble (X:: \bar{X}) formada entre el segundo fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la
20 tercera cadena, donde el primer fragmento (S) de la primera cadena del primer compuesto, el primer (A) y segundo (\bar{B}) de la segunda cadena del primer compuesto, el primer fragmento (P) de la tercera cadena del segundo compuesto, el tercer fragmento (C) de la segunda cadena del segundo compuesto, y el primer fragmento (\bar{D}) de la tercera cadena del segundo compuesto son monocatenarios; y donde el primer, segundo y tercer fragmento (A, \bar{B} , \bar{P}) de la segunda cadena del primer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para el tercer, segundo y primer fragmento (\bar{A} , B, P) de la primera cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellas respectivamente, en condiciones de hibridación.

[0075] En un aspecto, la primera cadena (S-Q-P-R) del primer compuesto contiene la secuencia de complementariedad apropiada para un fragmento en un ácido nucleico de un ácido nucleico patógeno para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

30 **[0076]** En un aspecto, el ácido nucleico patógeno es un ADN viral, un ARN viral, un ADN bacteriano, un ARN bacteriano, un tumor mutante de ADN, o un tumor de ARN.

II. Adaptador ARNi

[0077] También se especifica que es un adaptador que toma un ácido nucleico como entrada y una molécula de ARNi (p.ej., siARN) como salida, de modo que el siARN, en su liberación, puede llevar a cabo las funciones biológicas planeadas. Dicho adaptador es ilustrado en la **FIG. 11**, e incluye los compuestos **303** y **304**.
35

[0078] En la **FIG. 11**, el compuesto **301** representa un punto de apoyo dual que puede ser generado por traductores de contracorriente, y puede enfocar el compuesto **302** para una reacción de desplazamiento de cadena que da como resultado la liberación de un nuevo punto de apoyo dual que incluye dos cadenas de ácido nucleico de la mitad distal del compuesto.

40 **[0079]** El compuesto **303** es similar a los traductores 102-104 en la FIG. 6A, pero se diferencia de ellos al incluir dos moléculas de ARNi (\bar{J}_{RNA} y I_{RNA}) que se une a las cadenas únicas en el extremo distal (p. ej., la parte derecha como mostrado en la figura). El otro compuesto (**304**), por otra parte, se parece a un punto de apoyo dual (p.ej., el punto de apoyo **101** en la **FIG. 6A**) pero se diferencia por la inclusión de dos moléculas de ARNi (\bar{I}_{RNA} y J) a los extremos distales.

45 **[0080]** Por consiguiente, en la liberación del distal (p. ej., el lado derecho) la mitad del compuesto **302** como un nuevo punto de apoyo dual, el nuevo punto de apoyo inicia una reacción de desplazamiento de cadena con el compuesto **303**, causando la liberación de un compuesto que incluye la mitad distal del compuesto junto con las cadenas de ARNi. Este nuevo compuesto puede iniciar entonces una reacción de desplazamiento de cadena con el compuesto **304**, conduciendo a la liberación de todas las moléculas de ARNi (\bar{J}_{RNA} , I_{RNA} , \bar{I}_{RNA} , y J).

50 **[0081]** De este modo, en una incorporación, suponiendo que sea una composición que se compone de un primer compuesto de ácido nucleico compuesto por (a) una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico cada una compuesta secuencialmente por, un primer, un segundo y un tercer fragmento y (b) una primera y segunda cadena de ARN, donde el primer compuesto se compone de: (i) una primera región doble

formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadenas; (ii) una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena; (iii) una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; (iv) una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; (v) una quinta región doble formada entre el tercer fragmento de la tercera cadena y el primer ARN; y (vi) una sexta región doble formada entre el primer fragmento de la cuarta cadena y el segundo ARN, y el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena y el tercer fragmento (D) de la segunda cadena son monocatenarios.

[0082] En un aspecto, la composición se compone más adelante de un segundo compuesto de ácido nucleico que consta de una primera y una segunda cadena nucleica y una primera y una segunda cadena de ARN, donde: el segundo compuesto se compone de una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y la primera cadena de ARN, y una tercera región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y la segunda cadena de ARN, donde el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento (\bar{F}) de la segunda cadena son monocatenarios; la tercera cadena del primer compuesto y la segunda cadena del segundo compuesto contiene la secuencia de complementariedad apropiada para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del primer compuesto y la primera cadena del segundo compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación.

III. Adaptador Antisentido

[0083] También se proporciona un adaptador para recibir señales de traductores de contracorriente y liberar un ARN antisentido. En referencia a la FIG. 12, el compuesto 401 representa un punto de apoyo dual típico, tal y como se ha descrito anteriormente, y el compuesto 402 es similar a un traductor secuestrado rotatorio típico (p.ej., 102-104 de la FIG. 6A), excepto que, opcionalmente, una de las cadenas tiene una región monocatenaria más larga (F). Dicha región monocatenaria más larga (F) es útil para mantener la estabilidad del traductor 403, mientras que permite a la otra región monocatenaria (\bar{E}) ser lo suficientemente corta. De la misma manera, esto permite a la región monocatenaria (\bar{E}) del traductor 402 ser lo suficientemente corta para minimizar la reacción indeseada entre el traductor 402 y el objetivo, 404.

[0084] En la liberación del compuesto 402 por una reacción de desplazamiento de cadena iniciada por el punto de apoyo 401, de este modo, la mitad distal del compuesto (402), que es el nuevo punto de apoyo dual, se dirige al compuesto 403 y libera un doble parcial que incluye F-Z y $\bar{Z} - \bar{E}$.

[0085] En el contacto con una molécula celular de ARN que incluye un fragmento E-Z, como consecuencia, la cadena $\bar{Z} - \bar{E}$ es entonces libre para unirse al ARN celular, experimentando el desplazamiento de cadena y dejando la cadena F-Z en la solución. La unión entre $\bar{Z} - \bar{E}$ y el ARN celular puede conducir a la inhibición de actividades del ARN celular (p.ej., traducción y empalme), donde el fragmento $\bar{Z} - \bar{E}$ sirve como un ácido nucleico antisentido.

[0086] Una ventaja única de dicho diseño consiste en que la cadena $\bar{Z} - \bar{E}$ puede ser bastante larga. Se sabe que, en una aplicación antisentido, en la que cuanto más largo es el ácido nucleico antisentido, más eficaz es la traducción de bloqueo. Lamentablemente, sin embargo, en tecnologías convencionales, los ácidos nucleicos antisentido más largos dan lugar a peores efectos no-objetivo (p.ej., toxicidad). Esto ocurre porque dichos ácidos nucleicos antisentido son monocatenarios. El presente descubrimiento proporciona un ácido nucleico antisentido (p.ej., la cadena $\bar{Z} - \bar{E}$) en forma de un parcial doble (p. ej., parte de cualquiera o ambas cadenas son monocatenarias). Hasta que el ácido nucleico antisentido se une al ARN celular objetivo, de este modo, el ácido nucleico antisentido, incluso con una gran longitud, sólo tiene una pequeña parte expuesta en la solución como monocatenario. Dicha exposición reducida, en consecuencia, reduce el potencial de los efectos no objetivo.

[0087] En el presente método, por lo tanto, un ácido nucleico antisentido de una longitud mayor que, p.ej., 30 nt, 35, nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, 80 nt, 90 o 100 nt, puede ser adecuadamente introducido en un sistema biológico.

[0088] De este modo, una inclusión proporciona una composición compuesta por: (a) un primer compuesto de ácido nucleico compuesto por (i) una primera cadena de ácido nucleico que se compone secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento definido como B-X-D, (ii) una segunda cadena de ácido nucleico que se compone secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento definido como $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, (iii) una tercera cadena que se compone secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento definido como $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$, y (iv) una cuarta cadena compuesta secuencialmente de, un primer, segundo y tercer fragmento definido como F-Y-C, donde el primer compuesto consta de una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadenas, una segunda región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos

fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena y una cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; y (b) un segundo compuesto de ácido nucleico que se compone de (i) una primera cadena de ácido nucleico compuesta secuencialmente por, un primer, segundo y tercer fragmento definido como $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, (ii) una segunda cadena de ácido nucleico compuesta secuencialmente por, un primer, segundo y tercer fragmento definido como E-Y-D, (iii) una tercera cadena compuesta secuencialmente por, un primer y segundo fragmento definido como F-Z, y (iv) una cuarta cadena compuesta secuencialmente por, un primer y segundo fragmento definido como $\bar{Z} - \bar{E}$, donde el segundo compuesto consta de una primera región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($Z::\bar{Z}$) formada entre el segundo fragmento de la tercera cadena y el primer fragmento de la cuarta cadena, una tercera región doble ($\bar{F}::F$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y una cuarta región doble ($E::\bar{E}$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la cuarta cadena donde el primer fragmento (B) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A}) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena, y el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto, y el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena y el tercer fragmento de la segunda cadena (D) del segundo compuesto son monocatenarios; donde el primer, segundo y tercer fragmento (\bar{D}, \bar{Y} , y \bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto tienen una secuencia de complementariedad apropiada para el tercer, segundo y primer fragmentos (D, Y y E) de la segunda cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellas respectivamente, en condiciones de hibridación; y donde el tercer, segundo y primer fragmento (C, Y, y F) de la cuarta cadena del primer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para el primer, segundo y tercer fragmento (\bar{C}, \bar{Y} , y \bar{F}) de la primera cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellas respectivamente, en condiciones de hibridación.

[0089] En algunos aspectos, el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto es al menos 5 nucleótidos (nt), o 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 15 nt, 20 nt más largo que el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto. En algunos aspectos, el primer fragmento (\bar{Z}) de la cuarta cadena del segundo compuesto tiene al menos 30 nucleótidos (nt), o 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, o 80 nt de longitud.

IV Carga de entrada

[0090] También se proporciona un conjunto de traductores de "carga de entrada". Un conjunto de traductores de carga de entrada puede tomar la entrada de dos o más ácidos nucleicos diferentes como señal de entrada y producir la misma salida. En otras palabras, un conjunto de traductores de carga de entrada puede llevar a cabo una operación OR. En la **FIG. 13** se ilustra un conjunto de cargas de entrada.

[0091] En el conjunto de traductores de carga de entrada ilustrado, los traductores **502-503** y **505-506** son similares a **102-103** en la **FIG. 6A** y similares entre ellos. En virtud de sus diferencias secuenciales, no hay ninguna interferencia entre ellos. Entre los traductores **503** y **506**, sin embargo, estos comparten la misma mitad distal (F-Z-G/H-Z-E). Esto significa que, en una serie de reacciones de desplazamiento de cadena llevada a cabo por sus traductores de corriente, los traductores **503** y **506** producen el mismo punto de apoyo de salida, que el compuesto objetivo **507**.

[0092] Tanto si la entrada es el punto de apoyo **501** o **504**, consecuentemente, se provocará una reacción de desplazamiento de cadena en el traductor 507.

[0093] Por consiguiente, en una incorporación, siempre que sea una composición compuesta por un primer y un segundo compuestos de ácido nucleico cada uno compuesto por una primera, segunda, tercera, y cuarta cadena de ácido nucleico, cada una de las cadenas compuestas secuencialmente por, un primer, un segundo y tercer fragmento, donde las cadenas de nucleico son definidas como: B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$ y F-Y-C para la primera, segunda, tercera y cuarta cadena del primer compuesto, respectivamente, y $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, E-Y-D, F-Z-G, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del segundo compuesto, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena, y donde: cada uno de los primeros y los segundos compuestos se compone de una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadenas ($X::\bar{X}$ y $\bar{Y}::Y$, en el primer y segundo compuesto, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena ($Y::\bar{Y}$ y $Z::\bar{Z}$), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena ($D::\bar{D}$ y $\bar{F}::F$), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena ($\bar{C}::C$ y $E::\bar{E}$); en cada uno de los primeros y segundos compuestos, el primer fragmento (B y \bar{C} , en los primeros y segundos compuestos, respectivamente) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A} y D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento

(F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios; la tercera cadena del primer compuesto ($\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la segunda cadena del segundo compuesto (E-Y-D) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del primer compuesto (F-Y-C) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la primera cadena del segundo compuesto ($\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; además se compone de un tercer compuesto de ácido nucleico que se compone de una primera y segunda cadena de ácido nucleico, cada una de las cadenas compuestas secuencialmente por, un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde las primeras y segundas cadenas son definidos como E-Z-H y $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$ respectivamente, donde el tercer compuesto de ácido nucleico se compone de una región doble formada entre los segundos fragmentos de las primeras y segundas cadenas (Z:: \bar{Z}) y el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento de la segunda cadena (\bar{F}) son monocatenarios, y donde: la tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la segunda cadena del tercer compuesto ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$) para la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la primera cadena del tercer compuesto (E-Z-H) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y además se compone también de un cuarto y quinto compuesto de ácido nucleico, cada compuesto se compone de una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico, cada una de estas cadenas se compone secuencialmente de, un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde las cadenas son definidas como: K-R-M, $\bar{N} - \bar{R} - \bar{J}$, $\bar{M} - \bar{S} - \bar{E}$ y F-S-N para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del cuarto compuesto, respectivamente; $\bar{N} - \bar{S} - \bar{F}$, E-S-M, F-Z-G y $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas del quinto compuesto, respectivamente, donde: cada uno de los cuartos y los quintos compuestos se compone de una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de las primeras y segundas cadenas (R:: \bar{R} y la \bar{S} ::S, en los cuartos y quintos compuestos, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena (\bar{S} ::S y la Z:: \bar{Z}), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena (M:: \bar{M} y \bar{F} ::F), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena (\bar{N} ::N y E:: \bar{E}); en cada uno de los cuartos y quintos compuestos, el primer fragmento (K y \bar{N} , en los primeros y segundos compuestos, respectivamente) de la primer cadena, el tercer fragmento (\bar{J} y M) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento (F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios; la tercera cadena del cuarto compuesto ($\bar{M} - \bar{S} - \bar{E}$) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la segunda cadena del quinto compuesto (E-S-M) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; la cuarta cadena del cuarto compuesto (F-S-N) contiene la secuencia de complementariedad apropiada para la primera cadena del quinto compuesto ($\bar{N} - \bar{S} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; la tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) y la tercera cadena del quinto compuesto (F-Z-G) tienen la secuencia de identidad apropiada para permitirles unirse a un mismo ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) y la cuarta cadena del quinto compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) tienen la secuencia de identidad apropiada para permitirles unirse a un mismo ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación.

V. Carga de salida

[0094] Contrariamente a la acción de un conjunto de traductores de carga de entrada, un conjunto de traductores de carga de salida toma una única entrada y produce múltiples ácidos nucleicos de salida. En un aspecto, los múltiples ácidos nucleicos de salida tienen secuencias de diferencia de modo que pueden llevar a cabo diferentes funciones o reacciones posteriores. En otro aspecto, los múltiples ácidos nucleicos de salida son idénticos y de este modo el conjunto de traductores de carga de salida sirve de amplificador.

[0095] La FIG. 14A ilustra un conjunto de traductores de carga de salida que toma un punto de apoyo como entrada y produce dos nuevos puntos de apoyo idénticos. De manera similar el conjunto de cargas de salida de la FIG. 14B produce cuatro nuevos puntos de apoyo idénticos. La FIG. 14C-D, por otra parte, presenta conjuntos de traductores de cargas de salida que generan dos o más nuevos puntos de apoyo distintos.

[0096] En FIG. 14A, el ácido nucleico 601 es un punto de apoyo dual típico tal y como se describe aquí. El compuesto 602 se diferencia de los traductores 102 y 103 de la FIG. 6A en la que las regiones monocatenarias del distal final son más largas, y contienen dos fragmentos consecutivos, en lugar de uno. Tal y como se evidencia en el compuesto 603, cada conjunto de fragmentos consecutivos (A-B) es capaz de liberar un nuevo punto de apoyo que, en dicha liberación, tiene dos regiones monocatenarias separadas, A y B, en dos cadenas separadas. Por consiguiente, cualquiera de estos nuevos puntos de apoyo puede iniciar una nueva reacción de desplazamiento de cadena con el traductor 604.

[0097] Los traductores en la FIG. 14B son similares a aquellos de la FIG. 14A, salvo que las regiones monocatenarias en el traductor 606 tienen cada una cuatro fragmentos consecutivos capaces de liberar dos nuevos puntos de apoyo.

5 [0098] El traductor mostrado en la FIG. 14C puede tomar la misma entrada de punto de apoyo (609) que la de FIG. FIG. 14A-B (601 y 605) pero el traductor 610 libera un punto de apoyo, en contacto con la entrada, que es diferente FIG. 14A-B. Esta diferencia es más evidente, como se refleja en las cadenas correspondientes en el traductor 611. Es decir, en contacto con el punto de apoyo liberado del traductor 610 y las reacciones de desplazamiento de cadena, el traductor 611 libera dos puntos de apoyo diferentes. Uno de estos dos puntos de apoyo es capaz de iniciar una nueva reacción de desplazamiento de cadena con el traductor 612, y el otro con el traductor 613. De este modo, el traductor mostrado en la FIG. 14B es capaz de generar, de la entrada de un punto de apoyo (609), dos nuevas salidas de puntos de apoyo diferentes, de los traductores 612 y 613, respectivamente.

[0099] Similar al traductor mostrado en la FIG. 14C, el traductor mostrado en la FIG. 14D también puede tomar un punto de apoyo (614) como entrada y producir cuatro nuevos puntos de apoyo diferentes como salidas, cada uno liberado de los traductores 617-620, respectivamente.

15 [0100] Una inclusión del descubrimiento, por lo tanto, proporciona un compuesto de ácido nucleico que se compone de una primera, una segunda, una tercera, una cuarta, una quinta y una sexta cadena de ácido nucleico, donde: la primera cadena se compone secuencialmente de, un primer, un segundo, un tercer y un cuartos fragmento y es definida como $\bar{Q} - \bar{X} - \bar{B} - \bar{A}$ donde cada letra indica un fragmento y una cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena; la segunda cadena se compone secuencialmente de, un primer, un segundo, un tercer y un cuarto fragmento y es definido como $\bar{B} - \bar{A} - \bar{X}$ -P; la tercera y quinta cadena se componen secuencialmente cada una de, un primer, un segundo y un tercer fragmento y es definido como A-Y-C; y la cuarta y sexta cadena se componen secuencialmente, un primer, un segundo y un tercer fragmento y es definido como $\bar{D} - \bar{Y}$ -B; y donde el compuesto consta de: una primera región doble ($\bar{X}::\bar{X}$) formada entre el segundo fragmento de la primera cadena y la tercera cadena de la segunda cadena; una segunda región doble ($\bar{A}::\bar{A}$) formada entre el cuarto fragmento de la primera cadena y la primera cadena de la tercera cadena; una tercera región doble ($\bar{B}::\bar{B}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; una cuarta región doble ($\bar{A}::\bar{A}$) formada entre el segundo fragmento de la segunda cadena y el primer fragmento de la quinta cadena; una quinta región doble ($\bar{B}::\bar{B}$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la sexta cadena; una sexta región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena; y una séptima región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la quinta y sexta cadena, y donde el primer fragmento (\bar{Q}) de la primera cadena, el cuarto fragmento (P) de la segunda cadena, los terceros fragmentos (C) de la tercera y quinta cadena y los primeros fragmentos (\bar{D}) de la cuarta y sexta cadena son monocatenarios.

[0101] De la misma manera, también se proporciona un compuesto de ácido nucleico que dota de carga de salida a dos o más puntos de apoyo diferentes.

35 VI Compuesto Condicional

[0102] Un conjunto de traductores "condicionales compuestos" lleva a cabo una operación AND. Un conjunto de compuestos condicionales requiere dos señales de entrada separadas para activar y liberar un ácido nucleico de salida.

40 [0103] La FIG. 15 ilustra un conjunto de traductores condicionales compuestos, que incluye al menos tres traductores de compuestos de ácidos nucleicos 703, 704 y 705. El traductor 703 toma el punto de apoyo 701 como entrada y produce un primer punto de apoyo nuevo que contiene la mitad distal de 703. De la misma manera, el traductor 704 toma el punto de apoyo 702 como entrada y produce un segundo punto de apoyo nuevo que contiene la mitad distal de 704.

45 [0104] El traductor 705 contiene al menos seis cadenas compuestas, de izquierda a derecha, de tres pares dobles. Sólo en contacto con el primer nuevo punto de apoyo liberado del traductor 703, el traductor 705 puede someterse a una reacción de desplazamiento de cadena, dando lugar a la exposición de dos regiones monocatenarias (\bar{G} y H) del doble central.

[0105] Posteriormente, en contacto con el segundo nuevo punto de apoyo producido por el traductor 704, otra reacción de desplazamiento de cadena tiene lugar y libera el tercer par doble de 705 como un tercer punto de apoyo nuevo. Este tercer nuevo punto de apoyo puede entonces opcionalmente desencadenar reacciones a través, por ejemplo, del traductor 706.

[0106] De este modo, una inclusión, siempre es una composición compuesta por un primer, un segundo y un tercer compuesto de ácido nucleico, donde: el primer compuesto se componga de una primera, una segunda, una

tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico y cada una conste secuencialmente de, un primer, un segundo y un tercer fragmento definidas como B-W-D, $\bar{C} - \bar{W} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y}$ -H, y \bar{G} -Y-C, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena, y donde el primer compuesto se compone de una primera región doble ($W::\bar{W}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda

5 cadena, una segunda región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; y una cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; el segundo compuesto se compone de una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico cada una compuesta secuencialmente por, un primer, un segundo

10 y un tercer fragmento definidas como F-X-H, $\bar{G} - \bar{X} - \bar{E}$, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{I}$ y J-Z-G, respectivamente, donde el segundo compuesto se compone de una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Z}::Z$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($H::\bar{H}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; y una cuarta región doble ($\bar{G}::G$) formada entre el primer fragmento de la segunda

15 cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; el tercer compuesto se compone de una primera, una segunda, una tercera, una cuarta, una quinta y una sexta cadena de ácido nucleico y cada una está compuesta, secuencialmente, por un primer, un segundo y un tercer fragmento definidas como $\bar{C} - \bar{Y}$ -G, \bar{H} -Y-D, $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{J}$, I-Z-H, J-Q-M y $\bar{N} - \bar{Q} - \bar{I}$, respectivamente, donde el tercer compuesto se compone de una primera región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Z}::Z$)

20 formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($Q::\bar{Q}$) formada entre los segundos fragmentos de la quinta y sexta cadena, una cuarta región doble ($G::\bar{G}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; una quinta región doble ($\bar{H}::H$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena, una sexta región doble ($\bar{J}::J$) formada entre el tercer fragmento de la tercera cadena y el primer fragmento de la quinta cadena, y una séptima región doble ($I::\bar{I}$) formada entre el primer fragmento de la cuarta cadena y el tercer fragmento de la sexta

25 cadena; donde, en el primer compuesto, el primer fragmento (B) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A}) del segundo fragmento, el tercer fragmento (H) de la tercera cadena, y el primer fragmento (\bar{G}) de la cuarta cadena son monocatenarios; en el segundo compuesto, el primer fragmento (F) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{E}) del segundo fragmento, el tercer fragmento (\bar{I}) de la tercera cadena, y el primer fragmento (J) de la cuarta

30 cadena son monocatenarios; y en el tercer compuesto, el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena, el tercer fragmento (D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (M) del quinto fragmento, y el primer fragmento (\bar{N}) de la sexta cadena son monocatenarios, y donde: la tercera cadena ($\bar{D} - \bar{Y}$ -H) del primer compuesto y la segunda cadena (\bar{H} -Y-D) del tercer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; la cuarta cadena (\bar{G} -Y-C) del primer compuesto y la primera cadena

35 ($\bar{C} - \bar{Y}$ -G), del tercer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; la tercera cadena ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{I}$) del segundo compuesto y la cuarta cadena (I-Z-H) del tercer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para permitir la unión entre ellas en condiciones de hibridación; y la cuarta cadena (J-Z-G) del segundo compuesto y la tercera cadena ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{J}$) del tercer compuesto tienen la secuencia de complementariedad apropiada para permitir unión entre ellas en

40 condiciones de hibridación.

VII. Inversor

- [0107] "Un inversor" constituye uno o varios traductores que, en contacto con una señal de entrada, produce un ácido nucleico ("tapón") que bloquea una reacción de desplazamiento de cadena que de otra manera tendría lugar en el inicio por una señal de entrada diferente en el sistema.
- 45 [0108] Como se muestra en la FIG. 16, el inversor del compuesto nucleico 804 se compone de tres cadenas, dos de las cuales, F-Y-D y $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{E}$, forman una región doble entre los fragmentos centrales ($Y::\bar{Y}$). La tercera cadena incluye dos fragmentos, C y \bar{D} , cada uno complementario de un fragmento de otras dos cadenas. En contacto con el punto de apoyo 802, tendría lugar una reacción de desplazamiento de cadena, liberando la tercera cadena, C- \bar{D} .
- 50 [0109] El compuesto ácido nucleico 803 es un traductor que toma el punto de apoyo 801 como entrada y produce la mitad distal del compuesto, un nuevo punto de apoyo, como salida. Este nuevo punto de apoyo, si está en contacto con el traductor 805, puede llevar a cabo una reacción de desplazamiento de cadena subsecuente, con la reacción potencial subsecuente con el traductor 806.

[0110] Sin embargo, la ruta de procesamiento de señal **801-803-805-806** no puede tener lugar si el punto de apoyo **802** entra en contacto con el inversor **804** y libera la cadena tapón $C-\bar{D}$ antes de que el desplazamiento de cadena entre el punto de apoyo **801** y el traductor **803** tenga lugar. Esto es debido a que la cadena tapón $C-\bar{D}$ se une a las regiones monocatenarias expuestas, \bar{C} y D , bloqueando de este modo la reacción de desplazamiento de cadena entre **805** y el punto de apoyo producido por el traductor **803**.

[0111] Proporcionado en la inclusión, por lo tanto, encontramos una composición que consta de un primer y un segundo compuestos de nucleico, donde: el primer compuesto consta de una primera, una segunda, una tercera y un cuarta cadena de ácido nucleico cada una compuesta secuencialmente por, un primer, un segundo y un tercer fragmento definidos como $B-X-D$, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Z} - \bar{I}$ y $J-Z-C$, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica un cadena, y donde el primer compuesto consta de una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($Z::\bar{Z}$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y la cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; y el segundo compuesto que consta de una primera y una segunda cadena de ácido nucleico cada una compuesta secuencialmente por, un primer, un segundo y un tercer fragmento definidas como $F-Y-D$ y $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{E}$, respectivamente, y un tercer ácido nucleico compuesto secuencialmente por, un primer y un segundo fragmento definido como $\bar{D}-C$, donde el segundo compuesto consta de una primera región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y una tercera región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la tercera cadena; donde el primer fragmento (B) de la primera cadena del primer compuesto, el tercer fragmento (\bar{A}) de la segunda cadena del primer compuesto, el tercer fragmento (\bar{I}) de la tercera cadena del primer compuesto, el primer fragmento (J) de la cuarta cadena del primer compuesto, el primer fragmento (F) de la primera cadena del segundo compuesto, y el tercer fragmento (\bar{E}) de la segunda cadena del segundo compuesto son monocatenarios; y donde: la tercera cadena ($\bar{D}-C$) del segundo compuesto y la combinación del primer fragmento (\bar{D}) de la tercera cadena del primer compuesto y el tercer fragmento (C) de la cuarta cadena del primer compuesto, secuencialmente, tienen la secuencia de identidad apropiada para permitir la unión a una misma secuencia de ácido nucleico objetivo.

[0112] Para cualquiera de los susodichos traductores y conjuntos de traductores, se contempla que las modificaciones químicas pueden ser utilizadas para reducir o eliminar el punto de apoyo incompatible, es decir, la unión imprevista entre los puntos de apoyo y las regiones monocatenarias de cualquier traductor en un sistema, como una célula. Dichas modificaciones pueden ser diseñadas fácilmente con la información proporcionada en el descubrimiento. Además, para cada conjunto de traductores, la figura ilustrativa correspondiente proporciona modificaciones ejemplares, como anotado por los subíndices la N, R, y L. Las propiedades deseadas de dichas modificaciones se indican en la **Tabla 2**.

[0113] En algunos aspectos, se menciona que los fragmentos de ácido nucleico, si no expresamente designados como una parte de una región doble, se supone que son monocatenarios. También es evidente en las figuras adjuntas la cualidad de ser monocatenarios.

[0114] La longitud de cada cadena o fragmento de ácido nucleico puede ser determinada computacionalmente o experimentalmente. La **Tabla 1** ilustra la influencia de dicha longitud, en particular para los puntos de apoyo. En un aspecto, cada uno de los fragmentos tiene una longitud aproximada de entre 3 y 50 bases. Alternativamente, los fragmentos, tienen una longitud de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 bases. En otro aspecto, los fragmentos no son más largos que aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 28, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 bases. También, los fragmentos que existen en las formas monocatenarias, como los puntos de apoyo, pueden ser relativamente más cortos, como entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 bases y 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 28, 17, 16, o 15 bases aproximadamente. En un aspecto, un fragmento de punto de apoyo tiene una longitud de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 12 bases. En otro aspecto, un fragmento de a punto de apoyo no es más largo que 20, 19, 28, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 bases aproximadamente. En cambio, los fragmentos que forman regiones dobles en un traductor pueden ser relativamente más largos.

Métodos y Modelado Informático

[0115] El presente descubrimiento también proporciona los métodos para la utilización de los traductores del presente descubrimiento para llevar a cabo el cómputo y, en particular, propagar la información en un entorno biológico. Por ejemplo, un adaptador mRNA puede ser utilizado para descubrir la presencia de un ácido nucleico patógeno o neoplástico y produce una señal de salida en forma de, p.ej., un punto de apoyo. Si fuera necesario,

adaptadores de mRNA múltiple pueden ser utilizados teniendo la especificidad para ácidos nucleicos múltiples para asegurar la detección fiable.

5 **[0116]** Otros traductores en el sistema, como el de carga de entrada, carga de salida, y traductores inversos, pueden ser utilizados para procesar las señales generadas por los adaptadores de mRNA, produciendo finalmente ácidos nucleicos reguladores, p.ej., ARNi y el ARN antisentido, con la correspondiente ARNi y adaptador antisentido. En virtud del cuidadoso tratamiento adaptado, las secuencias exactas y las cantidades de estos ARN reguladores pueden ser controladas con precisión. Por consiguiente, las reacciones biológicas como la apoptosis y la respuesta inmune pueden ser provocadas por este ARN regulador, ocasionando beneficios terapéuticos o diagnósticos.

10 **[0117]** Se apreciaría fácilmente que los traductores, composiciones, y sistemas aquí descritos puedan incluir materiales biológicos, pero también pueden ser modelados matemáticamente con un ordenador. Por consiguiente, el presente descubrimiento también proporciona métodos informáticos, sistemas, y el programa de medios de comunicación de código integrado para llevar a cabo dicho modelado.

15 **[0118]** En relación con cada traductor, composición o sistema en el presente descubrimiento, por lo tanto, se proporciona un método informático implementado en el que el ordenador está configurado para representar su secuencia, estructura, síntesis, y reacción de desplazamiento de cadena.

20 **[0119]** La metodología aquí descrita puede ser implementada en un sistema informático o red. Un sistema informático apropiado puede incluir al menos un procesador y memoria; opcionalmente, un medio informático legible que almacena el código informático para la ejecución por el procesador. Una vez que el código es ejecutado, el sistema informático lleva a cabo la metodología descrita.

25 **[0120]** A este respecto, un "procesador" es un circuito electrónico que puede ejecutar programas informáticos. Ejemplos de procesadores apropiados pueden ser los siguientes, aunque no los únicos, unidades centrales de procesamiento, microprocesadores, unidades de procesos gráficos, unidades de procesos físicos, procesadores de señal digital, procesadores de red, procesadores frontales, coprocesadores, procesadores de datos y procesadores de audio. El término "memoria" connota un dispositivo eléctrico que almacena datos para su recuperación. En un aspecto, por lo tanto, una memoria apropiada es una unidad informática que conserva datos y asiste su computación. Más generalmente, se conocen métodos y dispositivos apropiados para proporcionar la red necesaria para la transmisión de datos.

30 **[0121]** También se considera un medio informático legible no transitorio que incluye el código ejecutable para realizar la metodología descrita. En ciertas inclusiones el medio también contiene datos o bases de datos necesarias para dicha metodología.

Ejemplo

35 **[0122]** Este descubrimiento también hace referencia a este ejemplo, que presenta los resultados de la simulación cinética del comportamiento de la línea temporal de las redes del Traductor Secuestrado Rotatoriamente (RST) del presente descubrimiento, como comparado conjuntamente con las simulaciones cinéticas de las redes del Traductor Secuestrado de Punto de Apoyo (THST), mencionadas anteriormente bajo el subtítulo "Punto de Apoyo Secuestrado," en referencia a la **FIG. 2** y **FIG. 3**.

40 **[0123]** Los mecanismos generados que incluían series de traducciones N, denominadas como "el número de etapas," cuya constante de índice de avance proviene de Frezza, B.M., *ORQUESTACIÓN DE INFORMACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RECONOCIMIENTO DE ORDEN QUÍMICO SUPERIOR: UNA TESIS PRESENTADA*, The Scripps Research Institute, La Jolla, California (2010), en el Capítulo 3. Los mecanismos incluyen también "una pérdida" de antecedentes de los traductores, también con el índice constante por Frezza (2010), e interacciones "incompatibles". El índice constante de este último proviene de la energía libre de unión de su vecino más próximo, véase Allawi y SantaLucia, *Bioquímica* 36: 10581-94 (1997), utilizando la constante de índice de avance standard para la hibridación (10^5 por molar por segundo) y el equilibrio detallado para obtener el índice de retroceso constante.

50 **[0124]** Para cada simulación, las simulaciones de señal de primer plano y de señal de fondo fueron conducidas para ambas redes de RSTs y THSTs. "La señal de primer plano" hace referencia a la concentración de secuencia de salida final generada, dada una secuencia de entrada inicial en la misma concentración que otros traductores en la simulación. "La señal de fondo" indica la concentración de secuencia de salida final generada, sin ninguna secuencia de entrada inicial.

[0125] Estas simulaciones demuestran la respuesta idealizada que cada diseño de red debería proporcionar en las condiciones de variación de longitud del punto de apoyo, concentración de los traductores, y tamaño de la red (el número de etapas).

5 [0126] La **FIG. 17A-M** representa los resultados de simulación para RST y THST, en relación tanto a la señal de primer plano como a la señal de fondo para los diferentes tamaños de los puntos de apoyo, variando desde 3 a 15 nucleótidos (nt). Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo con traductores 100nM para tres etapas. La **FIG. 17** muestra que, en puntos de apoyo extremadamente cortos, RSTs produjeron de hecho señales de fondo muy marcadas. Sin embargo, como la longitud del punto de apoyo aumentó, este antecedente disminuyó hasta casi
10 cero (8 nt y superior; por ejemplo, véase la **FIG. 17F**), mientras que en todos los casos el THSTS tiene un índice de traducción antecedente bastante constante y relativamente alta, también denominada "fuga". Como las longitudes de punto de apoyo aumentaron más allá de 11 nt, además, las interacciones incompatibles en THSTS comenzaron a dominar el sistema y ralentizar dramáticamente la actividad de primer plano, mientras que RSTs funcionan nominalmente con índices de punto de apoyo más largas (véase, p.ej., **FIG. 17I-M**).

15 [0127] En otras series de simulaciones, un punto de apoyo de 8 nt en concentraciones de traductores de 100nm produjo señales de primer plano similares tanto para RSTs como para THSTs. Los sistemas fueron examinados con profundidad creciente de la red, en términos de número de etapas, p. ej., el número de traductores. Tal y como se muestra en la **FIG. 18A-D**, con el aumento de los números de etapas las señales de fondo tanto de RSTs como THSTs aumentaron notablemente. Sin embargo, el grado de este aumento era dramáticamente peor en el caso de THSTs.

20 [0128] Además, otra serie de simulaciones presentaron redes de tamaño moderado (5 etapas), con puntos de apoyo largos (13 nt) y cortos (8 nt), y mostró como su comportamiento cambió con la variación de la concentración de los traductores. Los resultados se muestran en la **FIG. 19A-N**. Traductores de concentración superior (10 μ M) produjeron muy rápidamente, y traducciones de concentración muy bajas (100 pM) produjeron muy despacio. Este comportamiento es coherente con el hecho que tanto los sistemas RST como los sistemas THST emplean reacciones cinéticas de segundo orden, de ahí que, el tiempo para el equilibrio depende de la concentración total del sistema.

25 [0129] En el caso de puntos de apoyo largos, plazos de reacción permanecieron biológicamente relevantes para RST en concentraciones muy inferiores, que todavía mostraban una reactividad modesta baja en 100 pM, mientras que THST requirió una concentración muy superior (10 μ M) para obtener cualquier actividad significativa (**FIG. 19A-G**). En el caso de puntos de apoyo cortos, RSTs actuó de modo similar, aunque con señales de fondo notablemente superiores (**FIG. 19H-N**). THSTs con estos puntos de apoyo más cortos lograron obtener una reactividad significativa en concentraciones bajas, pero en altas concentraciones la fuga que contribuye a las
30 señales de fondo de los THSTs eran catastróficamente altas.

35 [0130] Junto con estos datos se demuestra que los RSTs ofrecen posibilidades de diseño por el que la actividad (fuga) de fondo puede reducirse a niveles casi indetectables con puntos de apoyo más largos, sin perder reactividad mediante inhibición extrema como la frontal de THSTs. Además, muestran que los RSTs pueden funcionar con reactividad ideal de primer-plano-a-fondo en un enorme rango dinámico de concentraciones, adaptándolos idealmente para su uso en circunstancias biológicas.

40 [0131] Mientras que se han analizado las inclusiones particulares de la invención sometida, éstas son sólo ilustrativas y no restrictivas de la invención. Una revisión de esta especificación implicará muchas variaciones de la invención evidente para aquellos expertos en el campo de la invención. El alcance total de la invención debería ser determinado en referencia tanto a las reivindicaciones que se especifican a continuación, junto con su gama completa de equivalentes, como a la especificación, con dichas variaciones.

45

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un primer y un segundo compuesto de ácido nucleico cada uno comprendiendo una primera, una segunda, una tercera, y una cuarta cadena de ácido nucleico, cada una de las cadenas comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde las cadenas de nucleico son definidas como:

B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$ y F-Y-C para la primera, segunda, tercera y cuarta cadena del primer compuesto, respectivamente, y

$\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, E-Y-D, F-Z-G, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadena del segundo compuesto, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena,

y donde:

cada uno de los primeros y los segundos compuestos comprende una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena (X:: \bar{X} y \bar{Y} ::Y, en los primeros y segundos compuestos, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena (Y:: \bar{Y} y Z:: \bar{Z}), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena (D:: \bar{D} and \bar{F} ::F), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena (\bar{C} ::C y E:: \bar{E});

en cada uno de los primeros y segundos compuestos, el primer fragmento (B y \bar{C} , en los primeros y segundos compuestos, respectivamente) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A} y D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento (F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios;

la tercera cadena del primer compuesto ($\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$) presenta secuencia de complementariedad para la segunda cadena del segundo compuesto (E-Y-D) para permitir la unión entre ellas y;

la cuarta cadena del primer compuesto (F-Y-C) presenta secuencia de complementariedad para la primera cadena del segundo compuesto ($\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas.

2. La composición de la reivindicación 1, que también comprende un tercer compuesto de ácido nucleico que comprende una primera y una segunda cadena de ácido nucleico, cada una de las cadenas comprendiendo secuencialmente, un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde la primera y segunda cadena son definidas como E-Z-H y $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$ respectivamente, donde el tercer compuesto de ácido nucleico comprende una región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena (Z:: \bar{Z}) y el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento de la segunda cadena (\bar{F}) son monocatenarios, y donde:

la tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) presenta secuencia de complementariedad para la segunda cadena del tercer compuesto ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas; y

la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) presenta secuencia de complementariedad para la primera cadena del tercer compuesto (E-Z-H) para permitir la unión entre ellas.

3. La composición de la reivindicación 2, donde el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto y el primer fragmento (E) de la primera cadena del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad, pero no se unen establemente entre ellas en condiciones de hibridación normales debido a la modificación química de uno o ambos fragmentos; y el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto y el tercer fragmento (\bar{F}) la primera cadena del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad, pero no se unen establemente entre ellas en condiciones de hibridación normales debido a la modificación química de uno o ambos fragmentos, opcionalmente donde la modificación química comprende la sustitución de la estructura de azúcar-fosfodiéster de un fragmento de ácido nucleico por una mini-PEG-conjugada, serina-derivada gamma-APN, sustituyendo una citosina tricíclica análoga para la base nitrogenada de al menos un nucleósido en un fragmento de ácido nucleico, o introduciendo un heteroátomo en la posición 2'- de una fracción de azúcar en un nucleótido.

4. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un cuarto y un quinto compuesto de ácido nucleico, comprendiendo cada compuesto una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido

nucleico, comprendiendo cada una de dichas cadenas secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento, donde las cadenas son definidas como:

K-R-M, $\bar{N} - \bar{R} - \bar{J}$, $\bar{M} - \bar{S} - \bar{E}$ y F-S-N para la primera, segunda, tercera y cuarta cadena del cuarto compuesto, respectivamente; y

5 $\bar{N} - \bar{S} - \bar{F}$, E-S-M, F-Z-G y $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$ para la primera, segunda, tercera y cuarta cadena del quinto compuesto, respectivamente,

donde:

10 cada uno del cuarto y quinto compuesto comprende una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena (R:: \bar{R} y \bar{S} ::S, en el cuarto y quinto compuestos, respectivamente), una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena (\bar{S} ::S and Z:: \bar{Z}), una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena (M:: \bar{M} y \bar{F} ::F), y una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena (\bar{N} ::N y E:: \bar{E});

15 en cada uno del cuarto y quinto compuesto, el primer fragmento (K y \bar{N} , en el primer y segundo compuesto, respectivamente) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{J} y M) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E} y G) de la tercera cadena y el primer fragmento (F y \bar{H}) de la cuarta cadena son monocatenarios;

la tercera cadena del cuarto compuesto ($\bar{M} - \bar{S} - \bar{E}$) presenta secuencia de complementariedad para la segunda cadena del quinto compuesto (E-S-M) para permitir la unión entre ellas;

20 la cuarta cadena del cuarto compuesto (F-S-N) presenta secuencia de complementariedad para la primera cadena del quinto compuesto ($\bar{N} - \bar{S} - \bar{F}$) para permitir la unión entre ellas;

la tercera cadena del segundo compuesto (F-Z-G) y la tercera cadena del quinto compuesto (F-Z-G) presentan secuencia de identidad para permitirles la unión a un mismo ácido nucleico objetivo; y

25 la cuarta cadena del segundo compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) y la cuarta cadena del quinto compuesto ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{E}$) presentan secuencia de identidad para permitirles la unión a un mismo ácido nucleico objetivo.

5. Una composición que comprende:

30 (a) un primer compuesto de ácido nucleico que comprende (i) una primera cadena de nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como S-Q-P, donde cada letra indica un fragmento y una cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena, y (ii) una segunda cadena que comprende secuencialmente un primer, segundo, tercer y cuarto fragmento definida como A- $\bar{B} - \bar{P} - \bar{Q}$ donde el primer compuesto comprende una región doble (Q-P:: $\bar{P} - \bar{Q}$) formada entre el segundo y tercer fragmento de la primera cadena y el tercer y cuarto fragmento de la segunda cadena; y

35 (b) un segundo compuesto de ácido nucleico que comprende (i) una primera cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como P-B- \bar{A} , (ii) una segunda cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como A-X-C, y (iii) una tercera cadena que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como $\bar{D} - \bar{X} - \bar{B}$, donde el segundo compuesto comprende una primera región doble (\bar{A} ::A) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la segunda cadena, una segunda región doble (B:: \bar{B}) formada entre el primer fragmento de la primera cadena y el tercer fragmento de la tercera cadena, y una tercera región doble (X:: \bar{X}) formada entre el segundo fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la tercera cadena,

45 donde el primer fragmento (S) de la primera cadena del primer compuesto, el primero (A) y segundo (\bar{B}) de la segunda cadena del primer compuesto, el primer fragmento (P) de la tercera cadena del segundo compuesto, el tercer fragmento (C) de la segunda cadena del segundo compuesto, y el primer fragmento (\bar{D}) de la tercera cadena del segundo compuesto son monocatenarios; y

donde el primer, segundo y tercer fragmento ($A - \bar{B} - \bar{P}$) de la segunda cadena del primer compuesto presentan secuencia de complementariedad para el tercer, segundo y primer fragmento ($\bar{A} - B - P$) de la primera cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellas, respectivamente.

- 5 6. La composición de la reivindicación 5, donde la primera cadena (S-Q-P) del primer compuesto presenta secuencia de complementariedad para un fragmento en un ácido nucleico de un ácido nucleico patógeno para permitir la unión entre ellos, opcionalmente donde el ácido nucleico patógeno es un ADN viral, un ARN viral, un ADN bacteriano, un ARN bacteriano, un tumor mutante de ADN, o un tumor de ARN.
- 10 7. Una composición que comprende un primer compuesto de ácido nucleico que comprende (a) una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento, y (b) una primera y segunda cadena de ARN, donde el primer compuesto comprende:
- 15 (i) una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena;
- (ii) una segunda región doble formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena;
- 15 (iii) una tercera región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena;
- (iv) una cuarta región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena;
- (v) una quinta región doble formada entre el tercer fragmento de la tercera cadena y el primer ARN; y
- (vi) una sexta región doble formada entre el primer fragmento de la cuarta cadena y el segundo ARN,
- 20 y el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena y el tercer fragmento (D) de la segunda cadena son monocatenarios.
8. La composición de la reivindicación 7, que también comprende un segundo compuesto de ácido nucleico que comprende una primera y una segunda cadena de nucleico y una primera y una segunda cadena de ARN, donde:
- 25 el segundo compuesto comprende una primera región doble formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y la primera cadena de ARN, y una tercera región doble formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y la segunda cadena de ARN, donde el primer fragmento (E) de la primera cadena y el tercer fragmento (\bar{F}) de la segunda cadena son monocatenarios;
- 30 la tercera cadena del primer compuesto y la segunda cadena del segundo compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas; y
- la cuarta cadena del primer compuesto y la primera cadena del segundo compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas.
9. Una composición que comprende:
- 35 (a) un primer compuesto de ácido nucleico que comprende (i) una primera cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como B-X-D, (ii) una segunda cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, (iii) una tercera cadena que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como $\bar{D} - \bar{Y} - \bar{E}$, y (iv) una cuarta cadena que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como F-Y-C, donde el primer compuesto comprende una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena y una cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena; y
- 40 (b) un segundo compuesto de ácido nucleico que comprende (i) una primera cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento definida como $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{F}$, (ii) una segunda cadena de ácido nucleico que comprende secuencialmente un primer, segundo y tercer fragmento y definida como E-Y-D, (iii) una tercera cadena que comprende secuencialmente un primer y segundo fragmento definida como F-Z, y (iv) una cuarta cadena que comprende, secuencialmente, un
- 45
- 50

primer y segundo fragmento y definida como $\bar{Z} - \bar{E}$, donde el segundo compuesto comprende una primera región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($Z::\bar{Z}$) formada entre el segundo fragmento de la tercera cadena y el primer fragmento de la cuarta cadena, una tercera región doble ($\bar{F}::F$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y una cuarta región doble ($E::\bar{E}$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la cuarta cadena,

donde el primer fragmento (B) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A}) de la segunda cadena, el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena, y el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto, y el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena y el tercer fragmento de la segunda cadena (D) del segundo compuesto son monocatenarios;

donde el primer, segundo y tercer fragmento (\bar{D} , \bar{Y} , y \bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto presentan secuencia de complementariedad para el tercer, segundo y primer fragmento (D, Y y E) de la segunda cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellas, respectivamente; y

donde el tercer, segundo y primer fragmento (C, Y, y F) de la cuarta cadena del primer compuesto presentan secuencia de complementariedad para el primer, segundo y tercer fragmento (\bar{C} , \bar{Y} y \bar{F}) de la primera cadena del segundo compuesto para permitir la unión entre ellos, respectivamente.

10. La composición de la reivindicación 9, donde el primer fragmento (F) de la cuarta cadena del primer compuesto es al menos 5 nucleótidos (nt) más largo que el tercer fragmento (\bar{E}) de la tercera cadena del primer compuesto, donde opcionalmente el primer fragmento (\bar{Z}) de la cuarta cadena del segundo compuesto contiene al menos 30 nucleótidos (nt) de longitud.

11. Un compuesto de ácido nucleico que comprende una primera, una segunda, una tercera, una cuarta, una quinta y una sexta cadena de ácido nucleico, donde:

la primera cadena comprende secuencialmente un primer, un segundo, un tercer y un cuarto fragmento y es definida como $\bar{Q} - \bar{X} - \bar{B} - \bar{A}$, donde cada letra indica un fragmento y una cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena;

la segunda cadena comprende secuencialmente un primer, un segundo, un tercer y un cuarto fragmento y es definida como $\bar{B} - \bar{A} - \bar{X}$ -P;

la tercera y quinta cadena comprende cada una secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y son definidas como A -Y-C; y

la cuarta y sexta cadena comprende cada una secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y son definidas como $\bar{D} - \bar{Y}$ -B

y donde el compuesto comprende:

una primera región doble ($\bar{X}::X$) formada entre el segundo fragmento de la primera cadena y la tercera cadena de la segunda cadena;

una segunda región doble ($\bar{A}::A$) formada entre el cuarto fragmento de la primera cadena y la primera cadena de la tercera cadena;

una tercera región doble ($\bar{B}::B$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena;

una cuarta región doble ($\bar{A}::A$) formada entre el segundo fragmento de la segunda cadena y el primer fragmento de la quinta cadena;

una quinta región doble ($\bar{B}::B$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la sexta cadena;

una sexta región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena;

una séptima región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la quinta y sexta cadena,

y donde el primer fragmento (\bar{Q}) de la primera cadena, el cuarto fragmento (P) de la segunda cadena, los terceros fragmentos (C) de la tercera y la quinta cadena y los primeros fragmentos (\bar{D}) de la cuarta y sexta cadena son monocatenarios.

12. Una composición que comprende un primer, un segundo y un tercer compuesto de ácido nucleico, donde:

5 el primer compuesto comprende una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y definidas como B-W-D, $\bar{C} - \bar{W} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Y}$ -H y \bar{G} -Y-C, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena, y donde el primer compuesto comprende una primera región doble ($W::\bar{W}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y
10 segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; y una cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena;

15 el segundo compuesto comprende una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico, cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y definidas como F-X-H, $\bar{G} - \bar{X} - \bar{E}$, $\bar{H} - \bar{Z} - \bar{I}$ y J-Z-G, respectivamente, donde el segundo compuesto comprende una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Z}::Z$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($H::\bar{H}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; y una cuarta región doble ($\bar{G}::G$) formada entre el primer
20 fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena;

25 el tercer compuesto comprende una primera, una segunda, una tercera, una cuarta, una quinta y una sexta cadena de ácido nucleico cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y definidas como $\bar{C} - \bar{Y} - G$, \bar{H} -Y-D, $\bar{G} - \bar{Z} - \bar{J}$, I-Z-H, J-Q-M y $\bar{N} - \bar{Q} - \bar{I}$, respectivamente, donde el tercer compuesto comprende una primera región doble ($\bar{Y}::Y$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Z}::Z$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($Q::\bar{Q}$) formada entre los segundos fragmentos de la quinta y sexta cadena, una cuarta región doble ($G::\bar{G}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena; una quinta región
30 doble ($\bar{H}::H$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena, una sexta región doble ($J::J$) formada entre el tercer fragmento de la tercera cadena y el primer fragmento de la quinta cadena, y una séptima región doble ($I::I$) formada entre el primer fragmento de la cuarta cadena y el tercer fragmento de la sexta cadena;

35 donde, en el primer compuesto, el primer fragmento (B) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{A}) del segundo fragmento, el tercer fragmento (H) de la tercera cadena, y el primer fragmento (\bar{G}) de la cuarta cadena son monocatenarios; en el segundo compuesto, el primer fragmento (F) de la primera cadena, el tercer fragmento (\bar{E}) del segundo fragmento, el tercer fragmento (\bar{I}) de la tercera cadena, y el primer fragmento (J) de la cuarta cadena son monocatenarios; y en el tercer compuesto, el primer fragmento (\bar{C}) de la primera cadena, el tercer fragmento (D) de la segunda cadena, el tercer fragmento (M) del quinto
40 fragmento, y el primer fragmento (\bar{N}) de la sexta cadena son monocatenarios,

y donde:

la tercera cadena ($\bar{D} - \bar{Y}$ -H) del primer compuesto y la segunda cadena (\bar{H} -Y-D) del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas;

45 la cuarta cadena (\bar{G} -Y-C) del primer compuesto y la primera cadena ($\bar{C} - \bar{Y}$ -G) del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas;

la tercera cadena ($\bar{H} - \bar{Z} - \bar{I}$) del segundo compuesto y la cuarta cadena (I-Z-H) del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas; y

la cuarta cadena (J-Z-G) del segundo compuesto y la tercera cadena ($\bar{G} - \bar{Z} - \bar{J}$) del tercer compuesto presentan secuencia de complementariedad para permitir la unión entre ellas.

13. Una composición que comprende un primer y un segundo compuesto nucleico, donde:

5 el primer compuesto comprende una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena de ácido nucleico cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y definidas como B-X-D, $\bar{C} - \bar{X} - \bar{A}$, $\bar{D} - \bar{Z} - \bar{I}$ y J-Z-C, respectivamente, donde cada letra indica un fragmento y cada cuerda de letras unidas por "-" indica una cadena, y donde el primer compuesto comprende una primera región doble ($X::\bar{X}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($\bar{Z}::Z$) formada entre los segundos fragmentos de la tercera y cuarta cadena, una tercera región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y una cuarta región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el tercer fragmento de la cuarta cadena;

10 el segundo compuesto comprende una primera y segunda cadena de ácido nucleico cada una comprendiendo secuencialmente un primer, un segundo y un tercer fragmento y definidas como F-Y-D y $\bar{C} - \bar{Y} - \bar{E}$, respectivamente, y un tercer ácido nucleico comprendiendo secuencialmente un primer y un segundo fragmento y definido como \bar{D} -C, donde el segundo compuesto comprende una primera región doble ($Y::\bar{Y}$) formada entre los segundos fragmentos de la primera y segunda cadena, una segunda región doble ($D::\bar{D}$) formada entre el tercer fragmento de la primera cadena y el primer fragmento de la tercera cadena, y una tercera región doble ($\bar{C}::C$) formada entre el primer fragmento de la segunda cadena y el segundo fragmento de la tercera cadena;

15 donde el primer fragmento (B) de la primera cadena del primer compuesto, el tercer fragmento (\bar{A}) de la segunda cadena del primer compuesto, el tercer fragmento (\bar{I}) de la tercera cadena del primer compuesto, el primer fragmento (J) de la cuarta cadena del primer compuesto, el primer fragmento (F) de la primera cadena del segundo compuesto, y el tercer fragmento (\bar{E}) de la segunda cadena del segundo compuesto son monocatenarios;

y donde:

25 la tercera cadena (\bar{D} -C) del segundo compuesto y la combinación del primer fragmento (\bar{D}) de la tercera cadena del primer compuesto y el tercer fragmento (C) de la cuarta cadena del primer compuesto presentan secuencialmente secuencia de identidad para permitir su unión a una misma secuencia de ácido nucleico objetivo.

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde cada fragmento presenta una longitud de entre 5 bases y 50 bases.

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde cada fragmento que es monocatenario presenta una longitud de entre 5 bases y 30 bases.

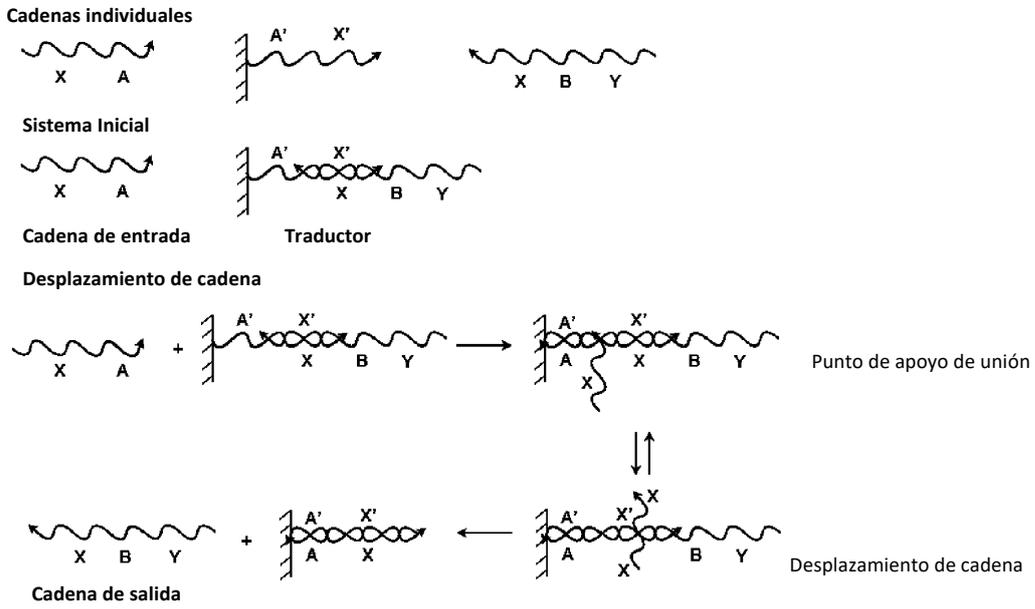


FIG. 1A

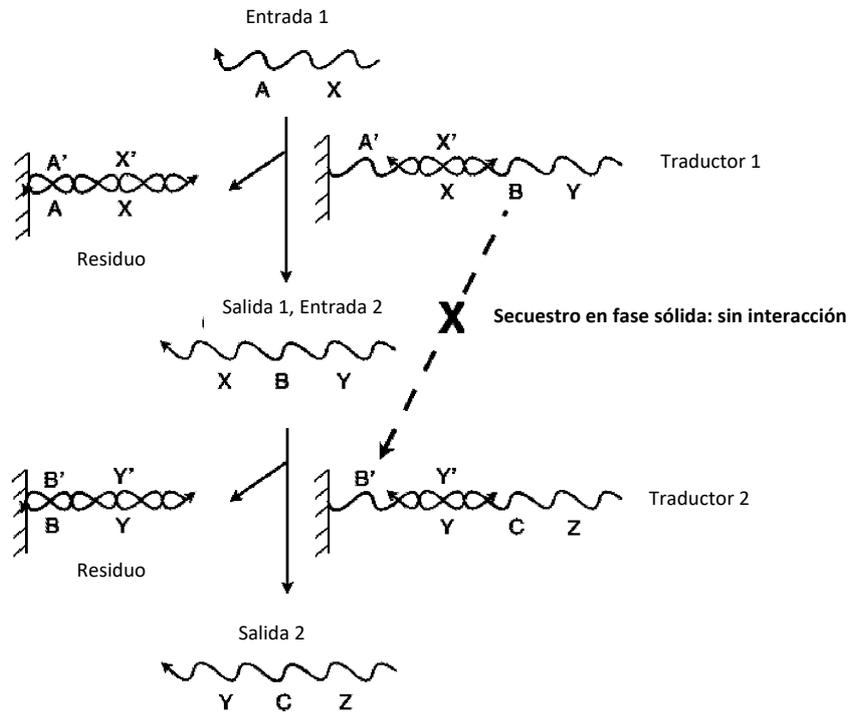


FIG. 1B

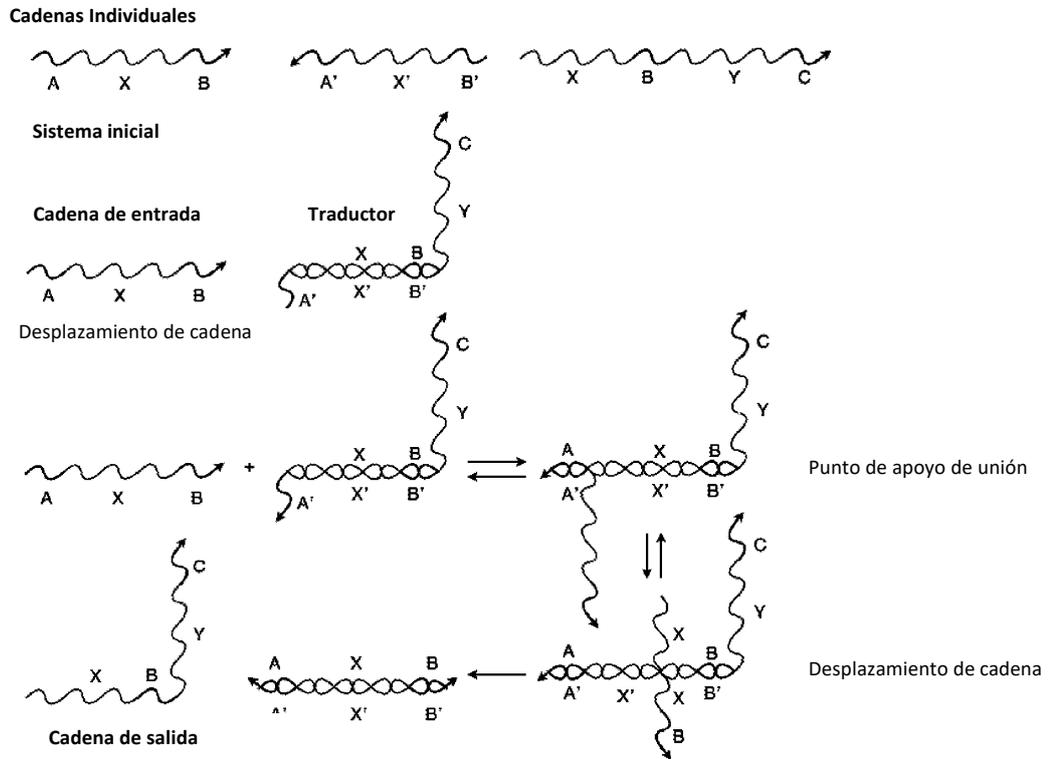


FIG. 2A

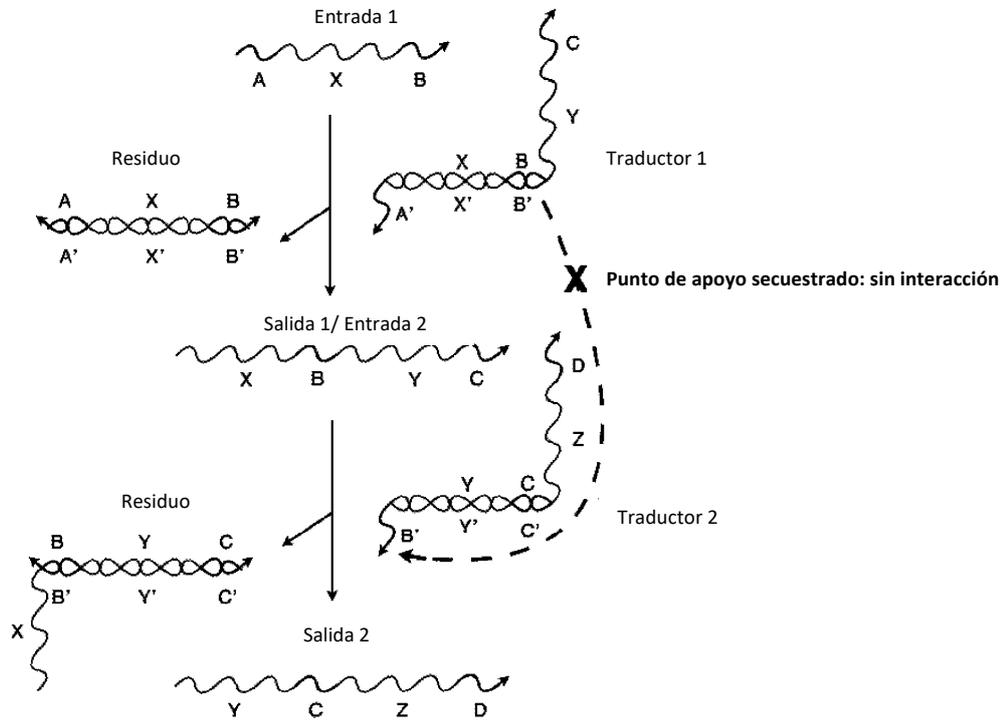


FIG. 2B

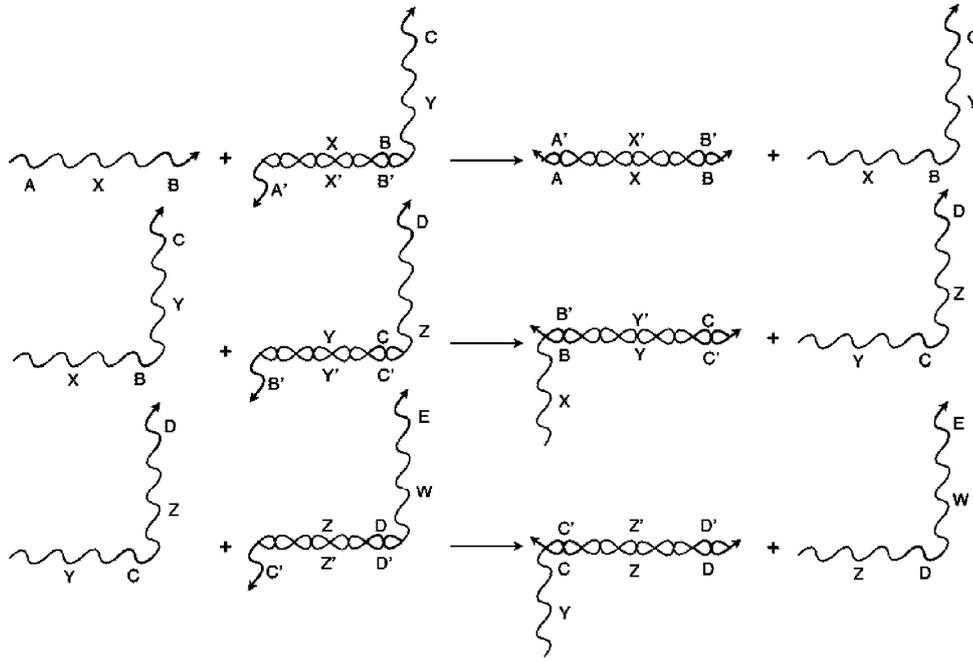


FIG. 3A

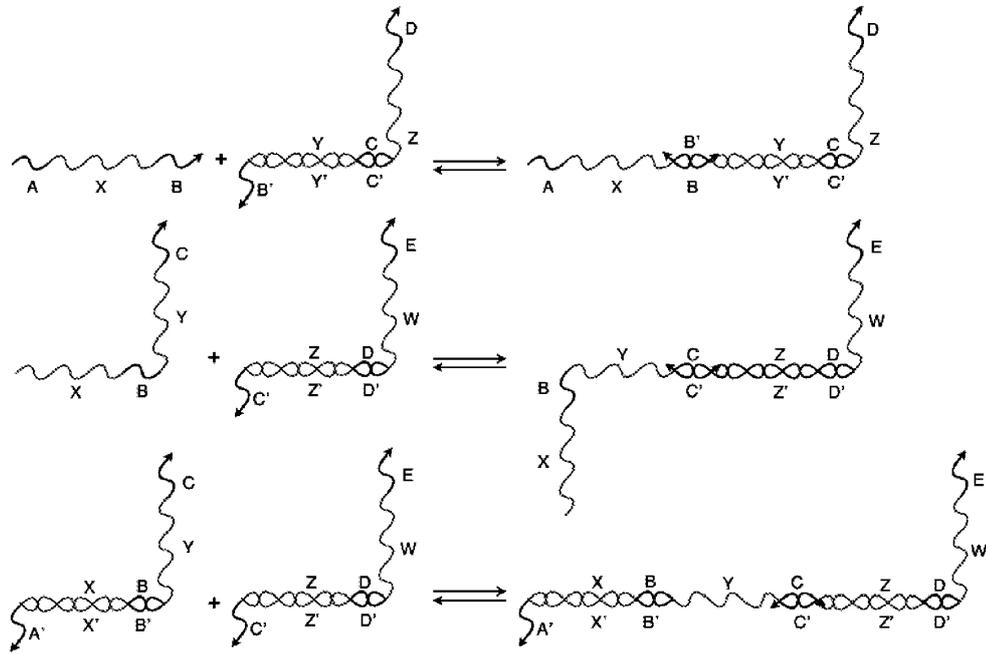


FIG. 3B

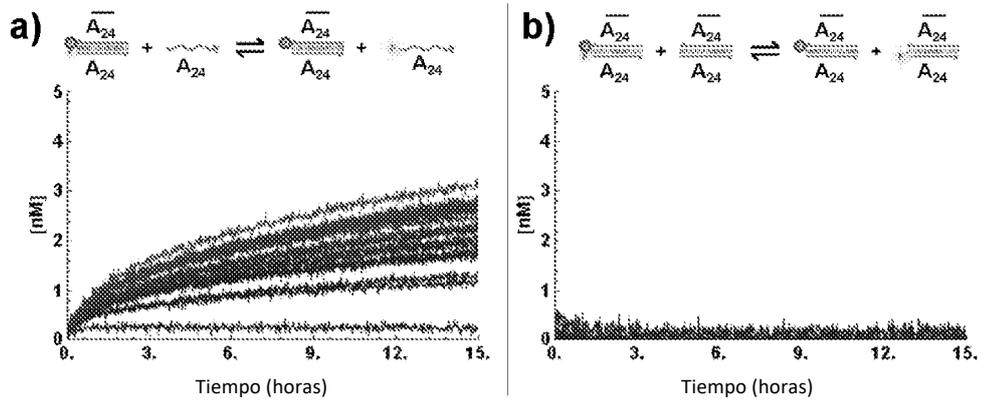


FIG. 4

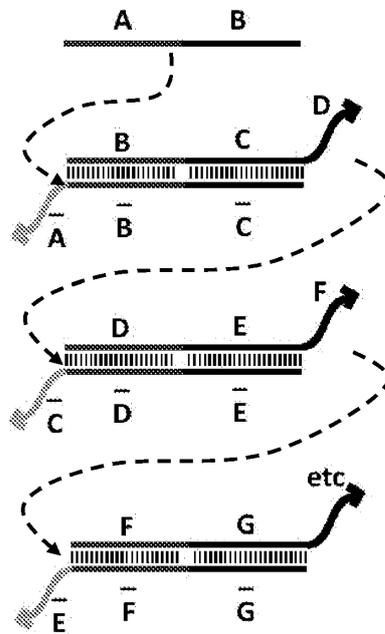


FIG. 5

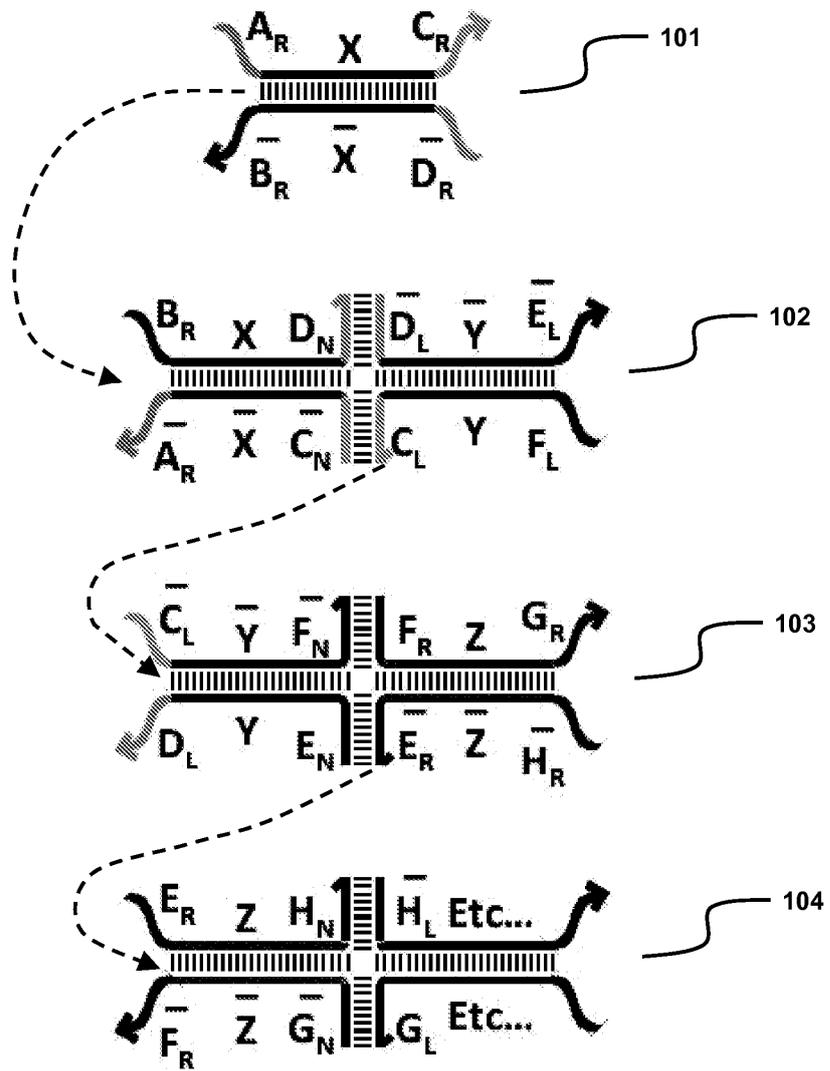


FIG. 6A

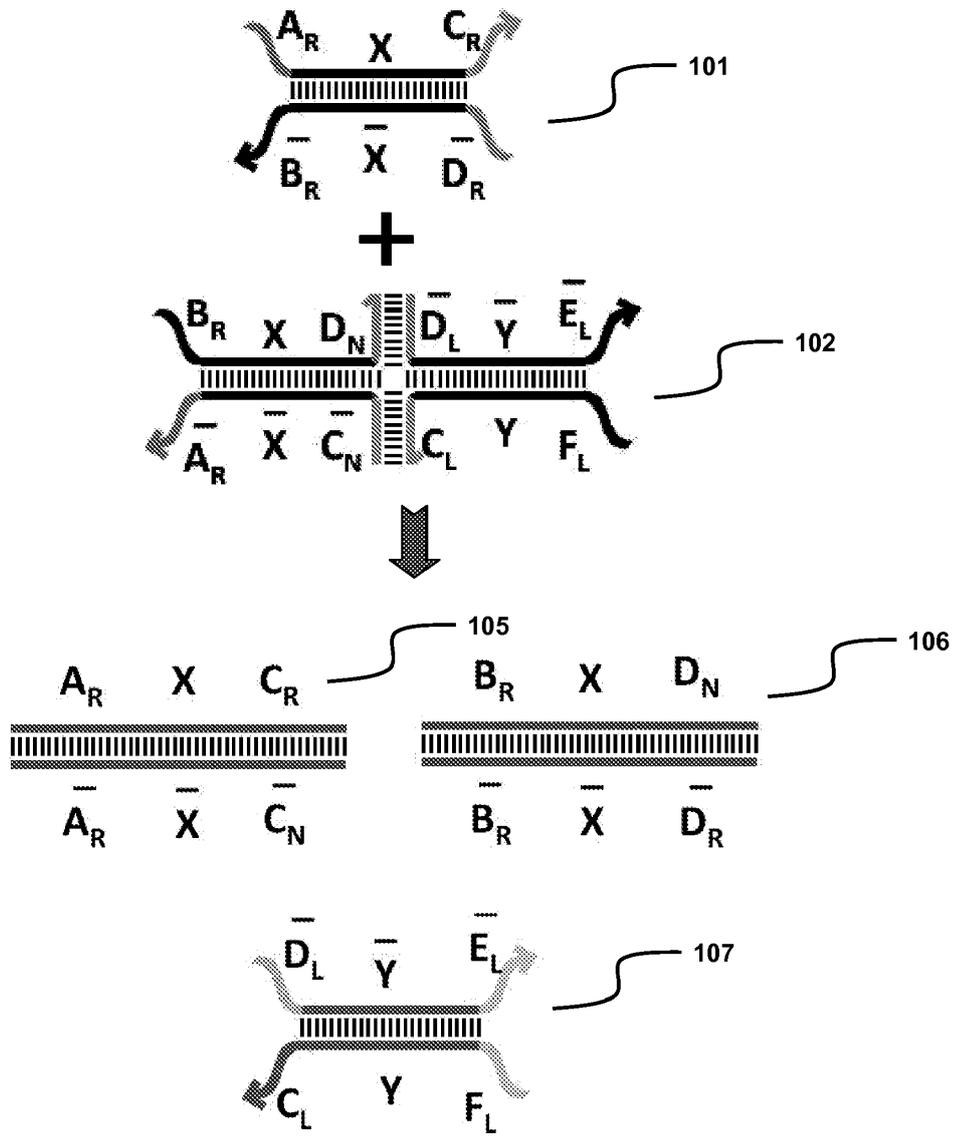


FIG. 6B

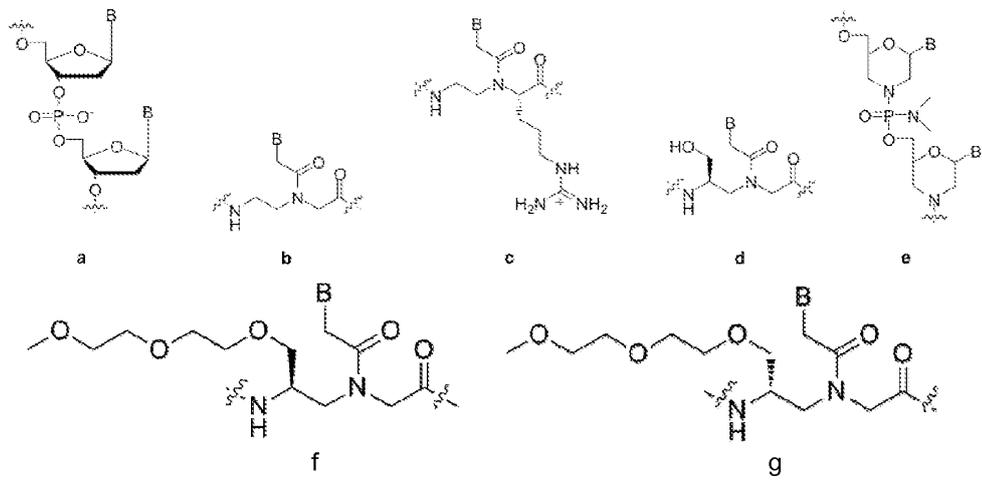


FIG. 7

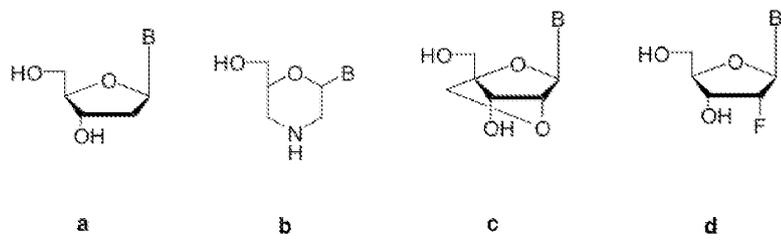


FIG. 8

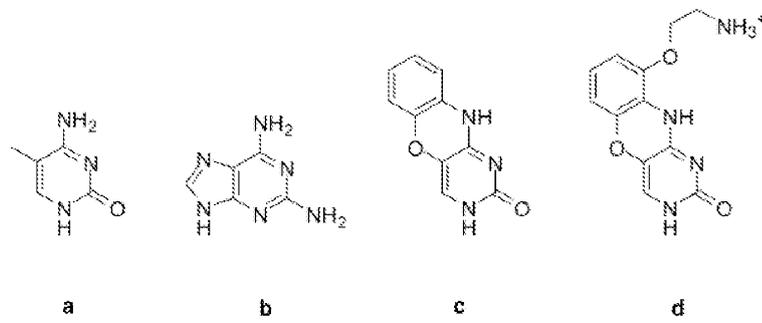


FIG. 9

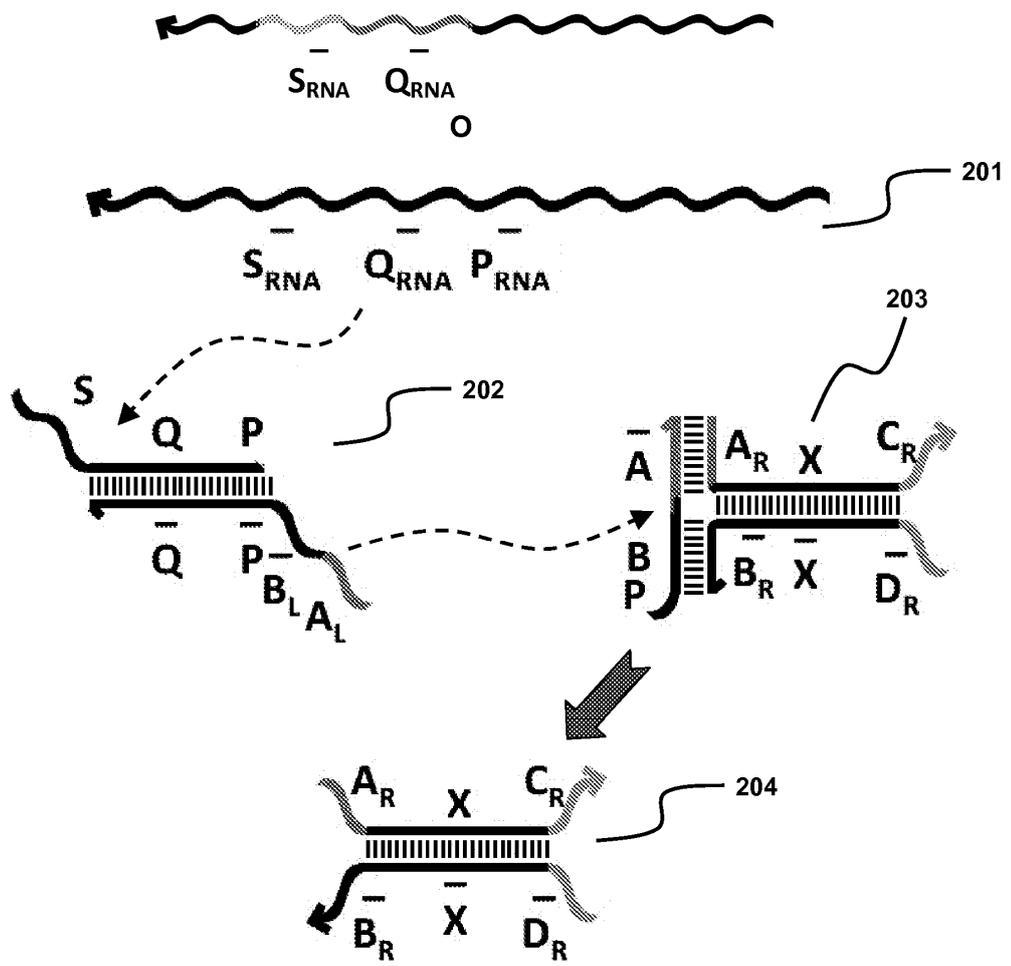


FIG. 10

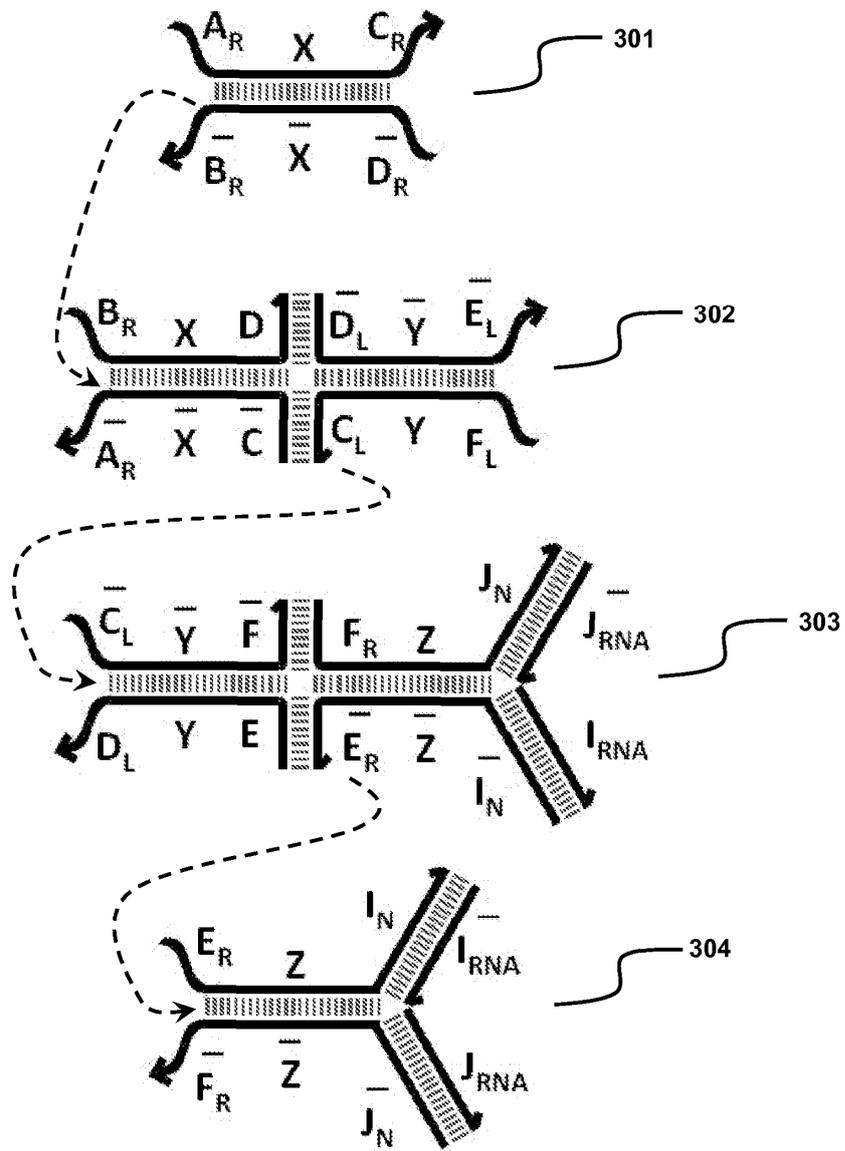


FIG. 11

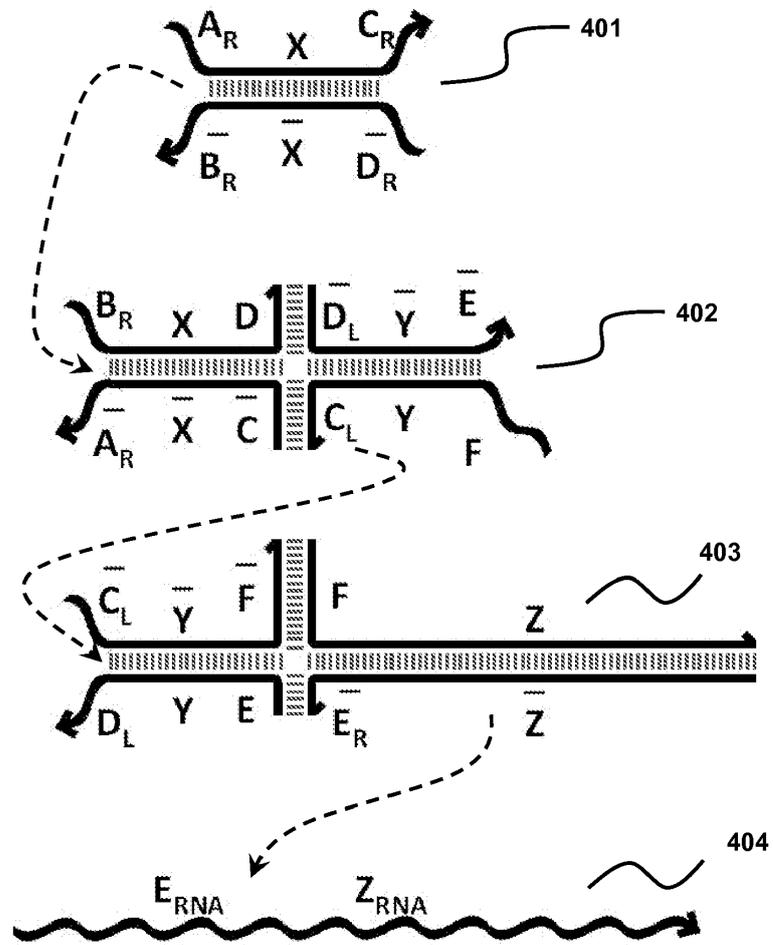


FIG. 12

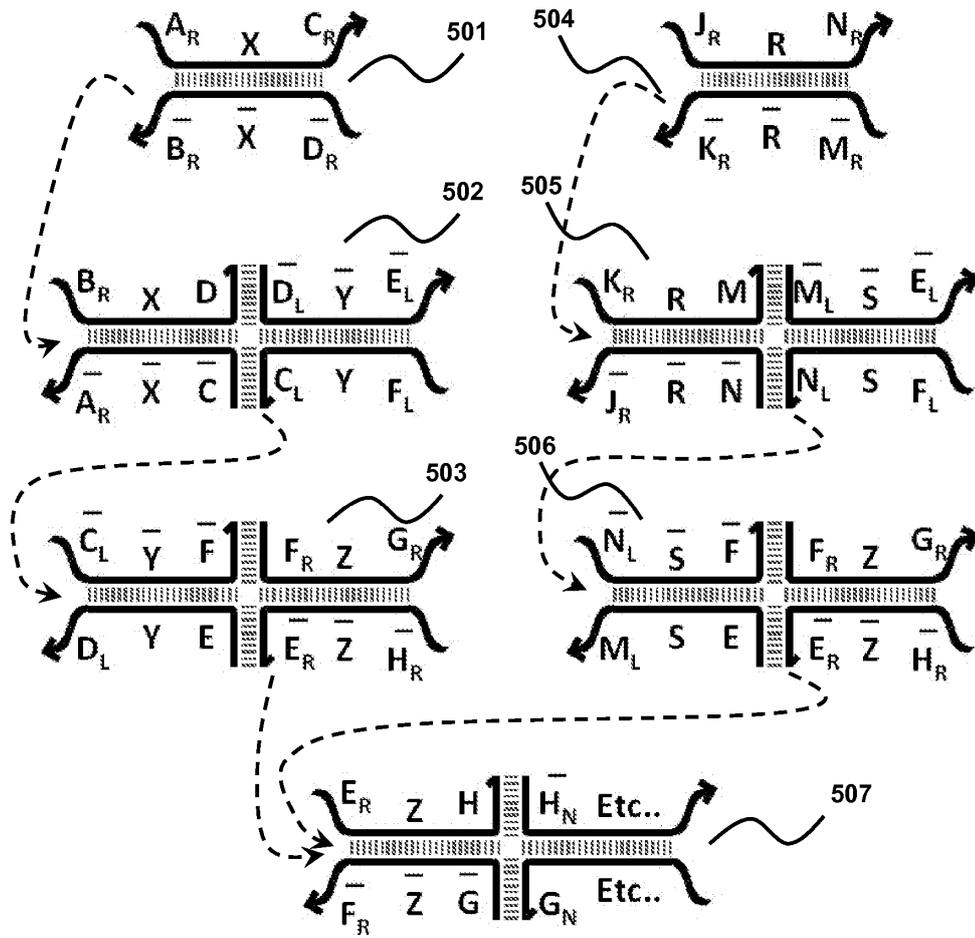


FIG. 13

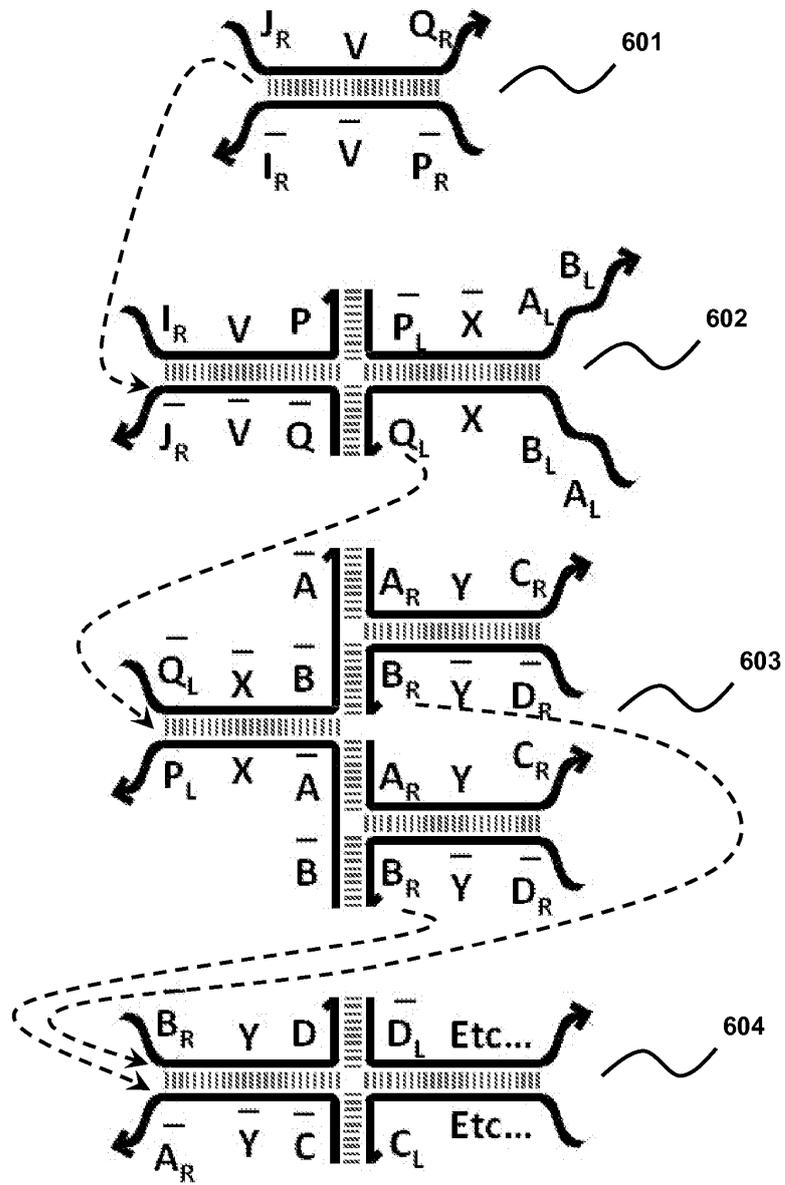


FIG. 14A

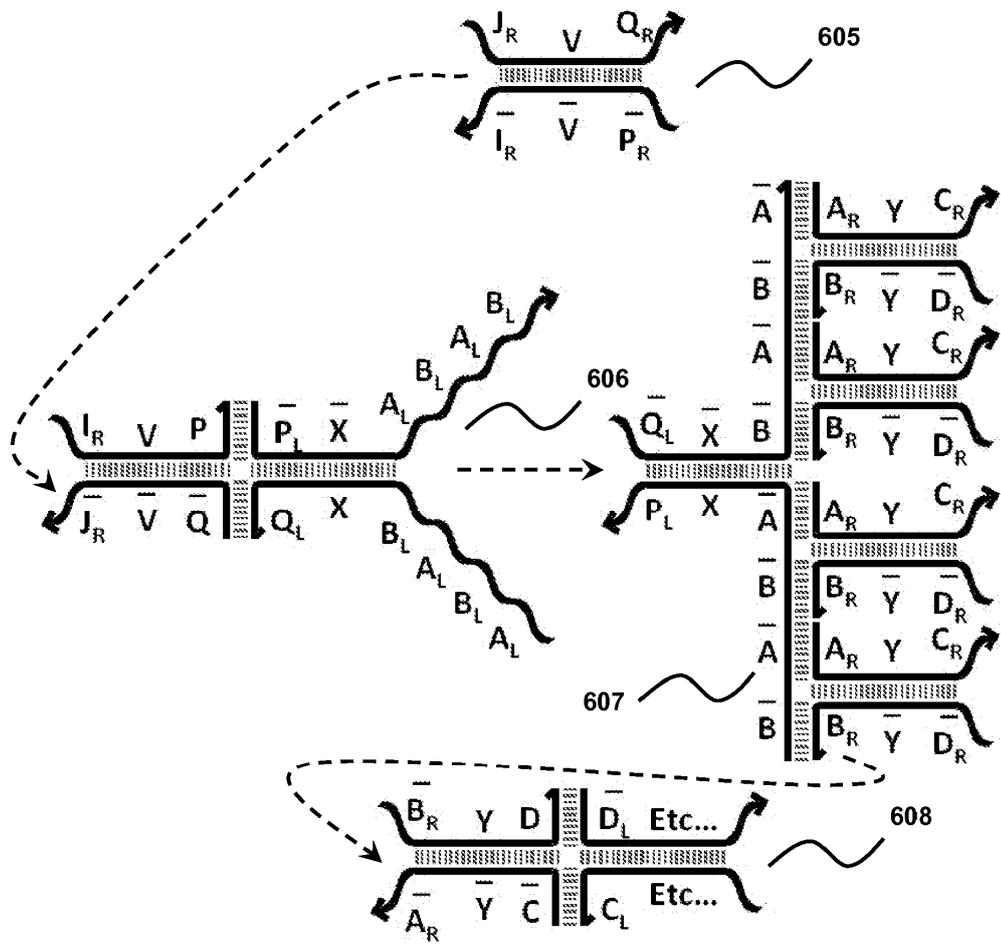


FIG. 14B

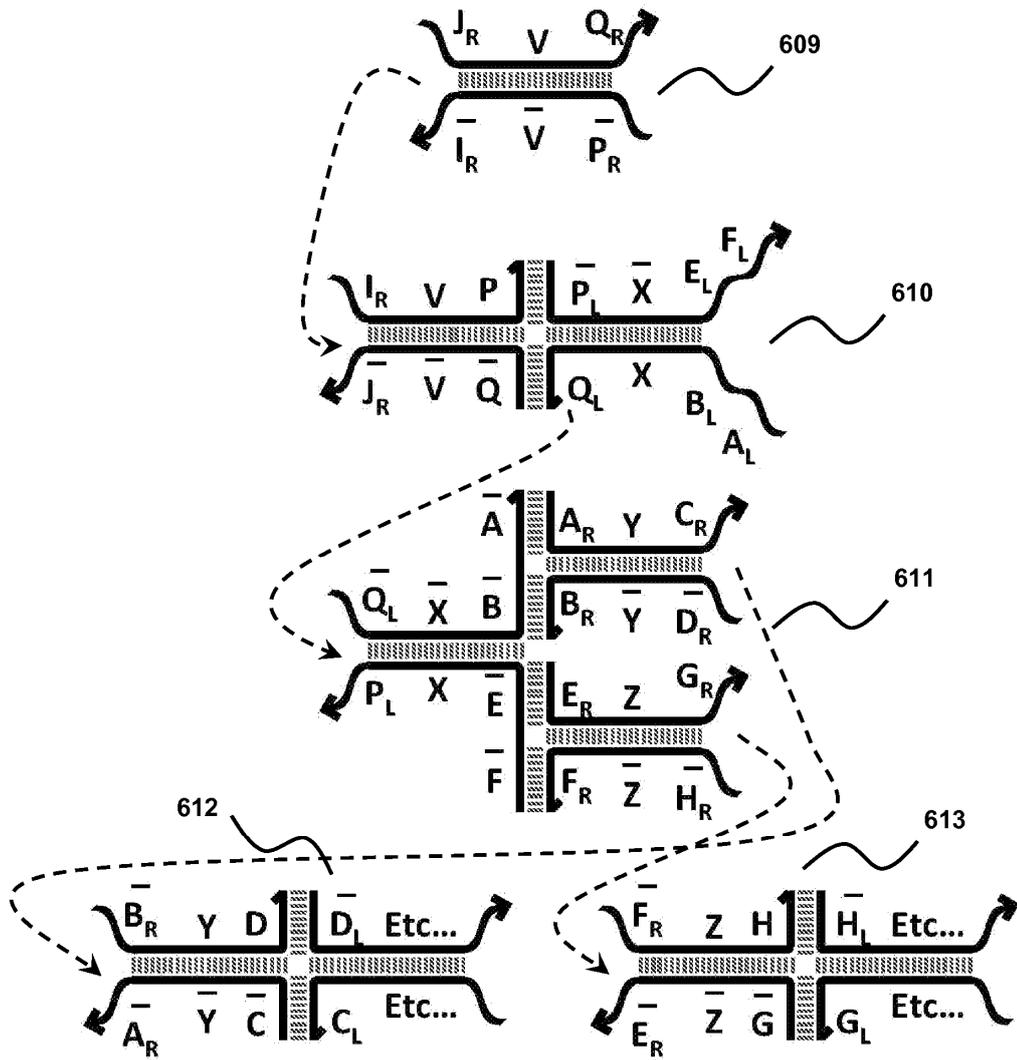


FIG. 14C

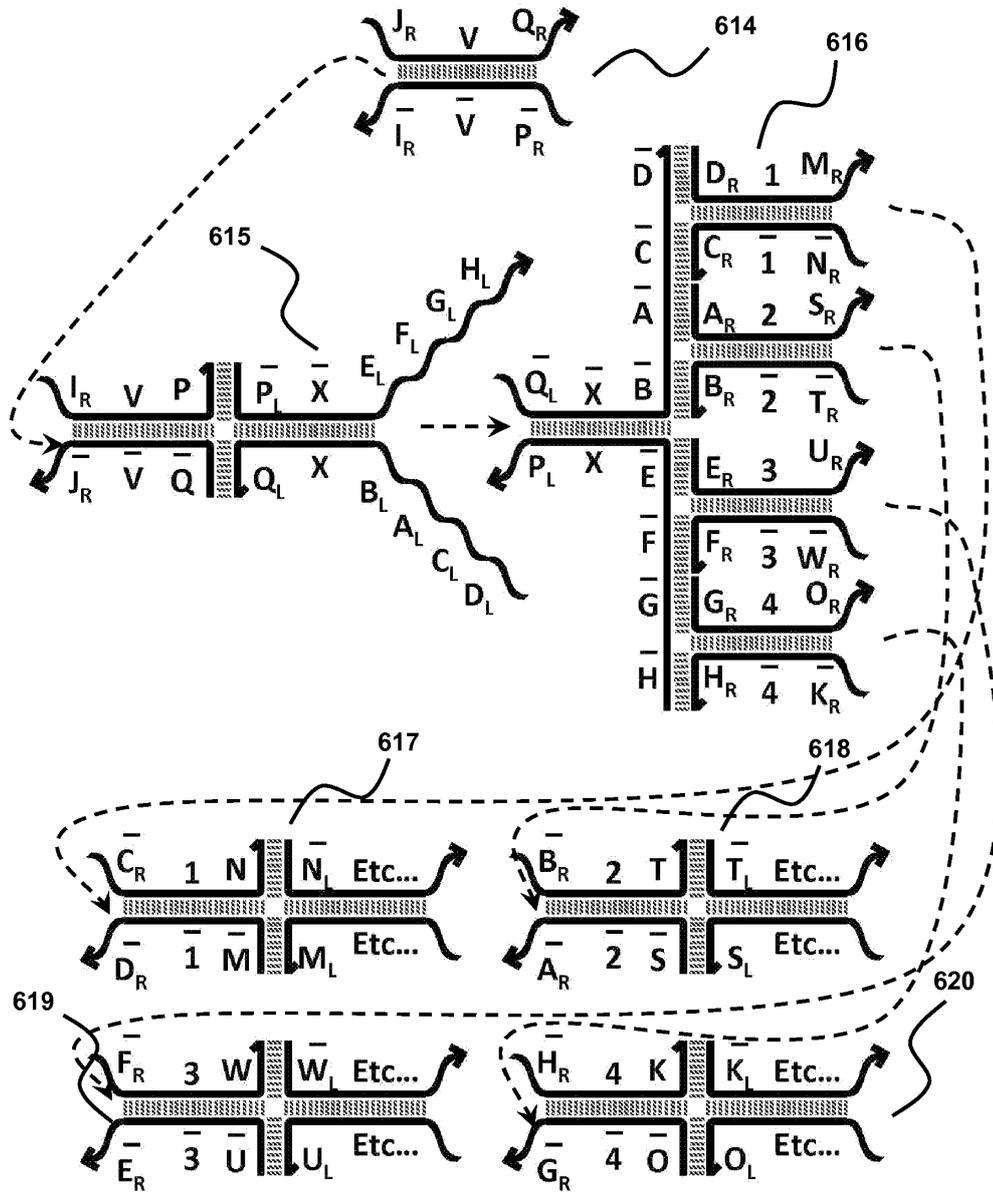


FIG. 14D

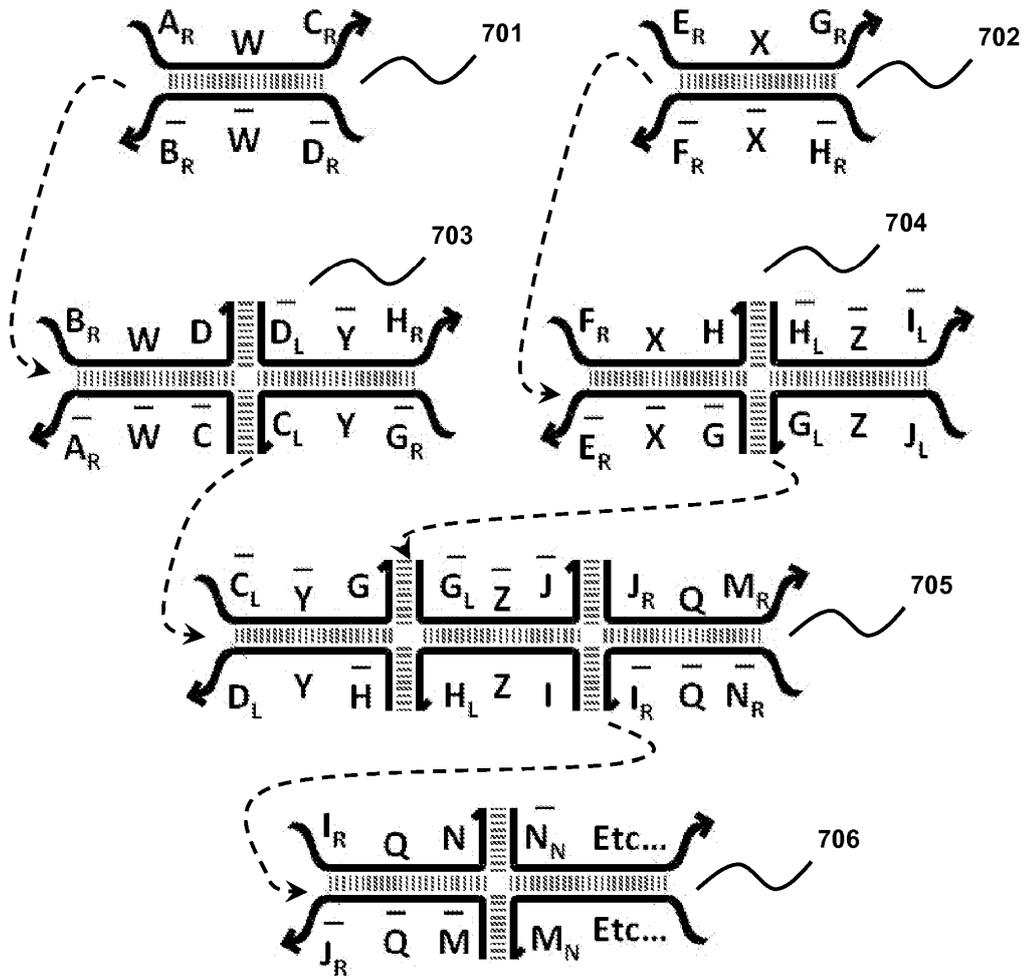


FIG. 15

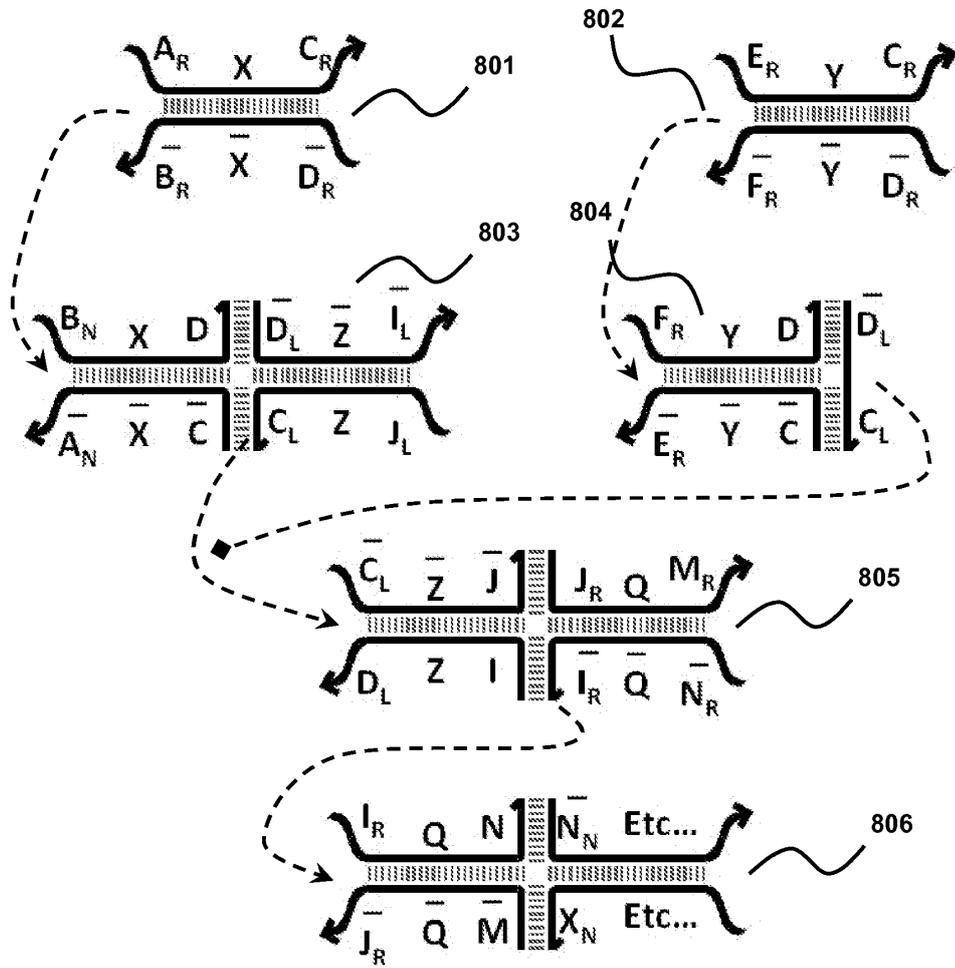


FIG. 16

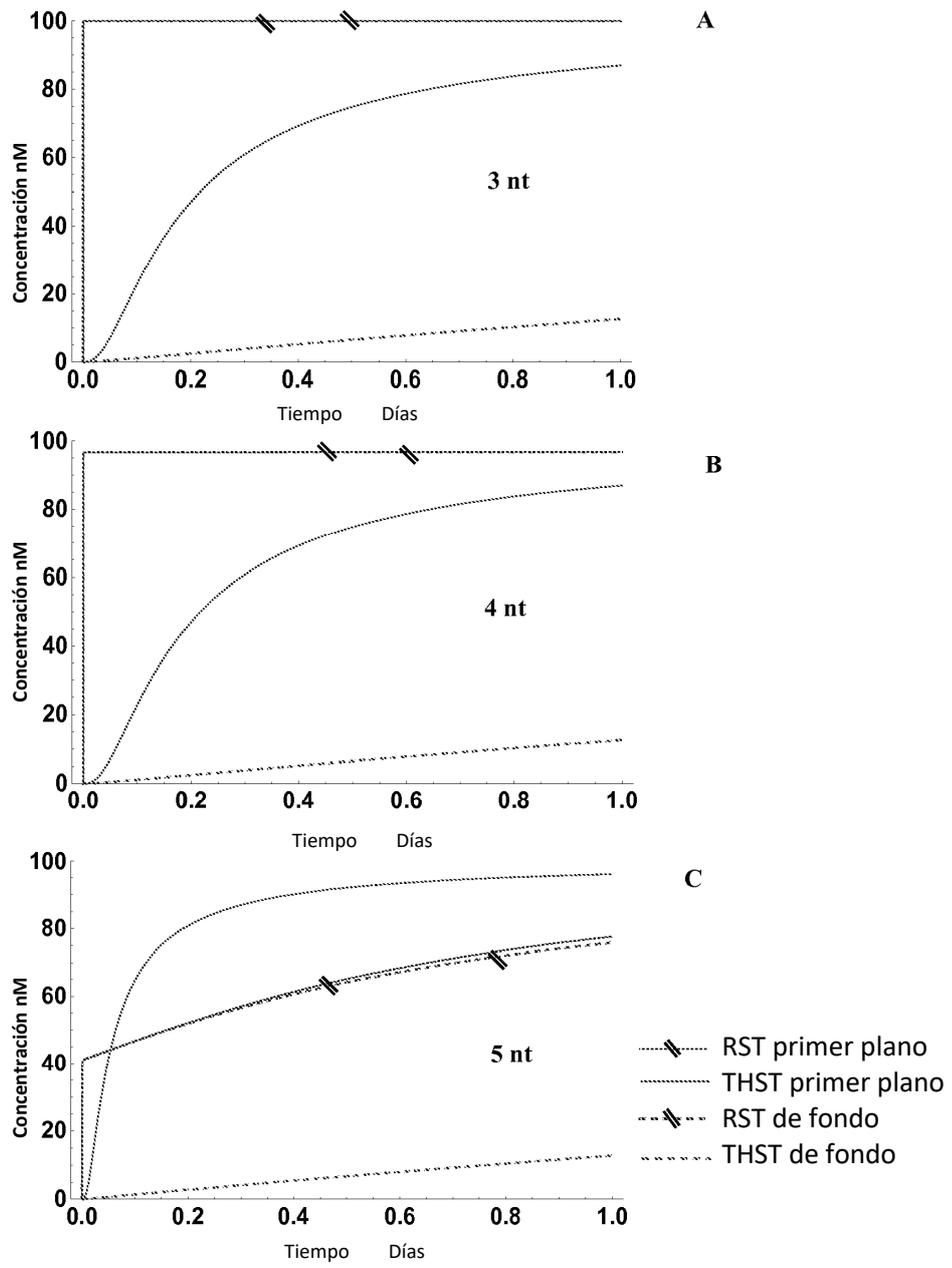


FIG. 17A-C

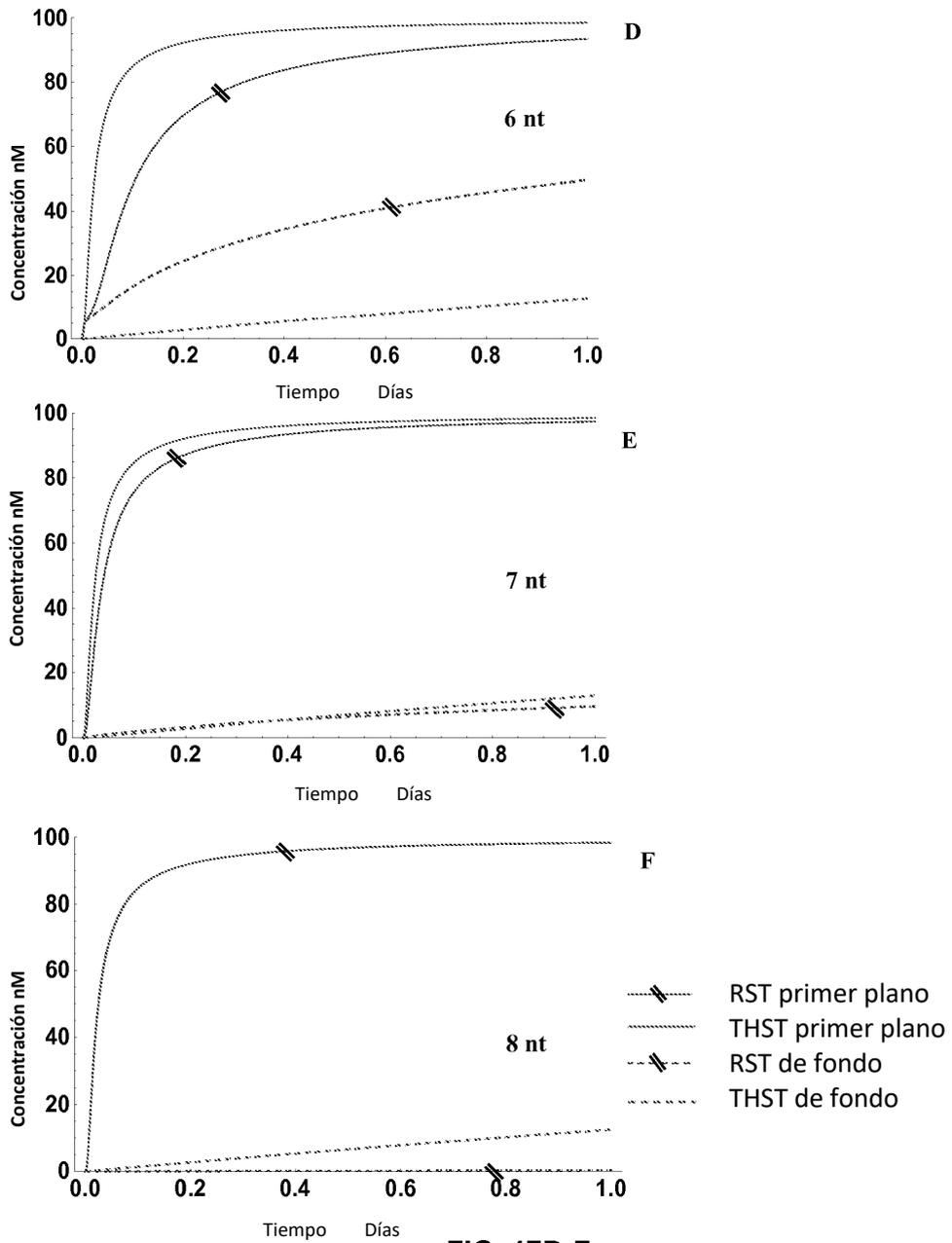


FIG. 17D-F

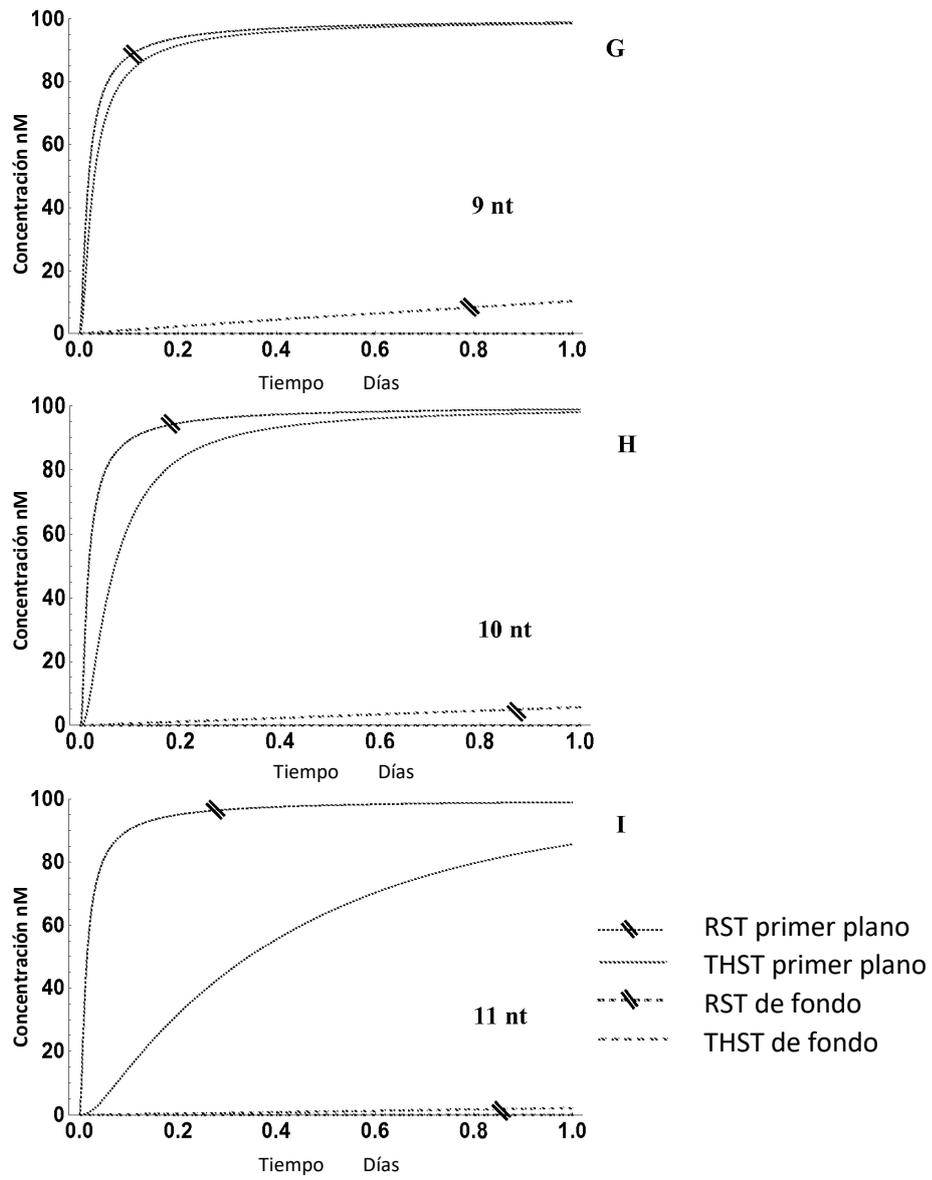


FIG. 17G-I

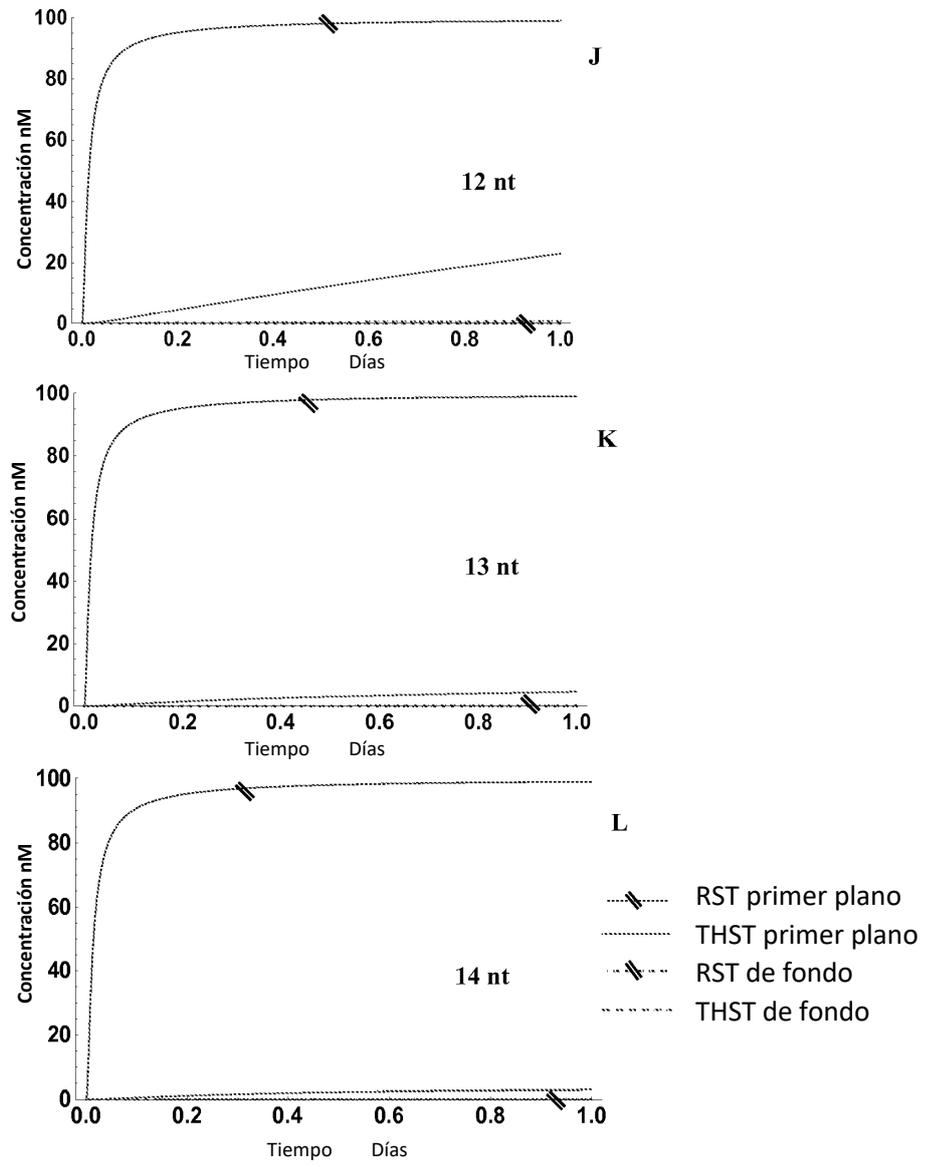


FIG. 17J-L

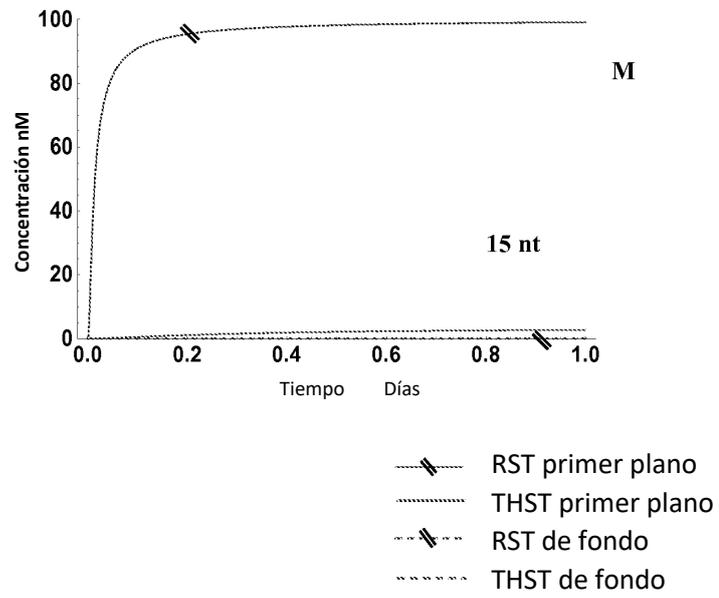


FIG. 17M

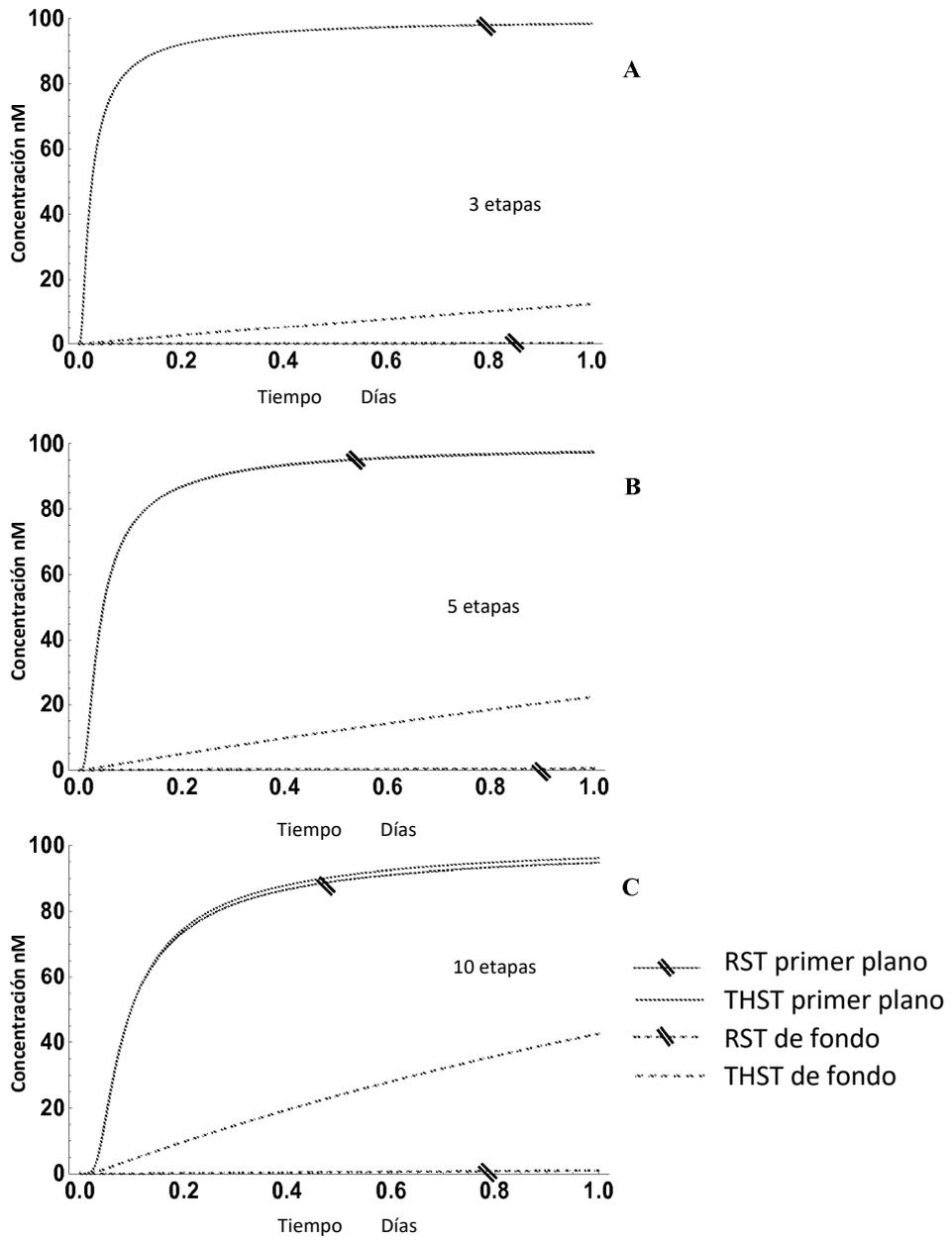


FIG. 18A-C

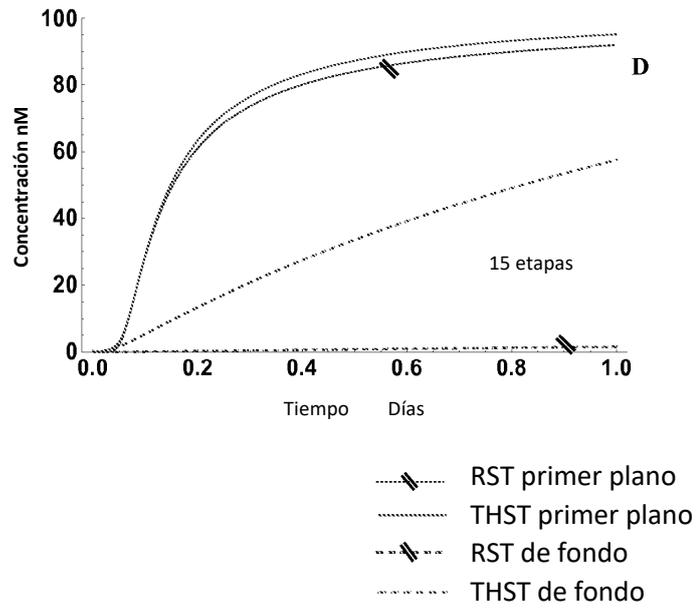


FIG. 18D

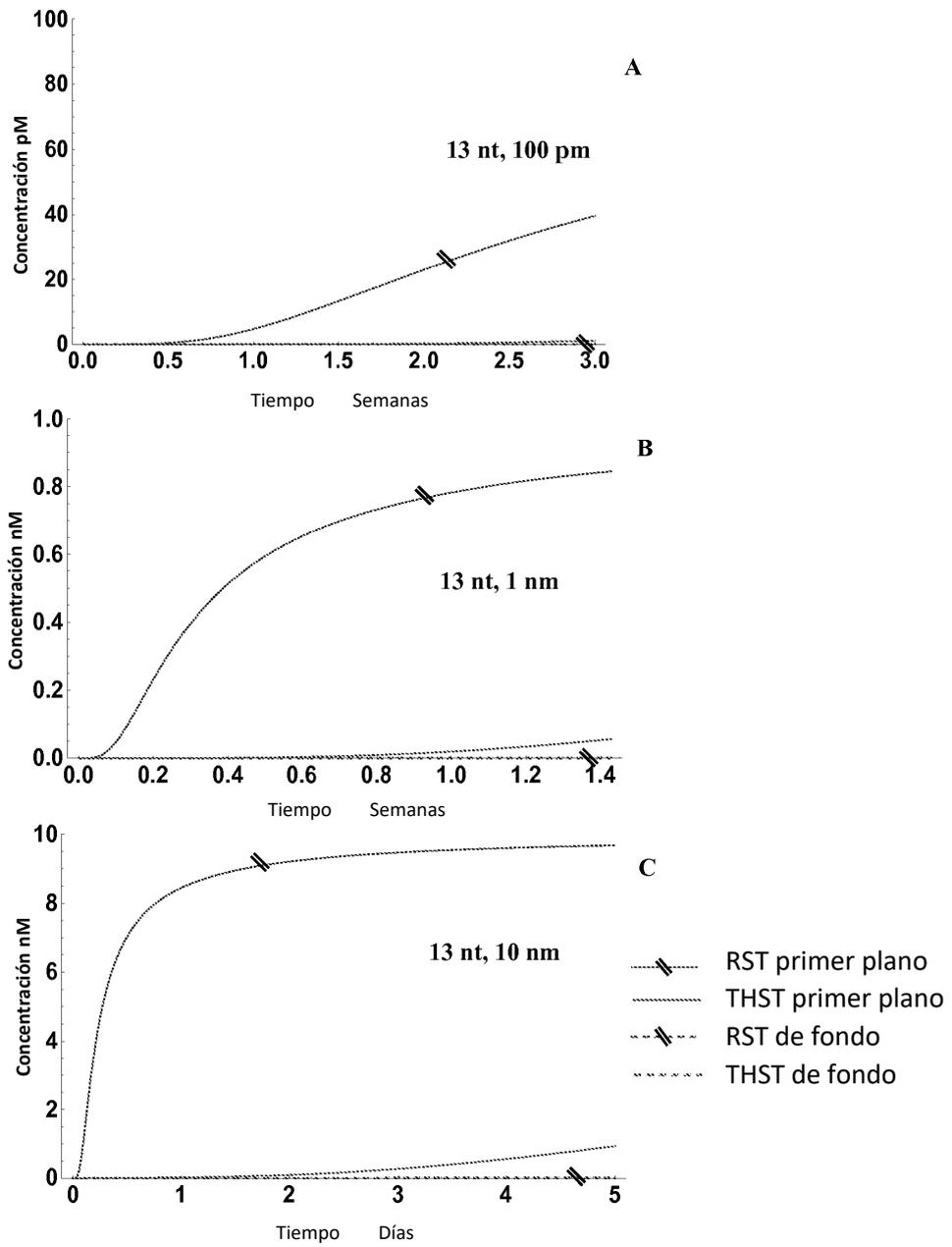


FIG. 19A-C

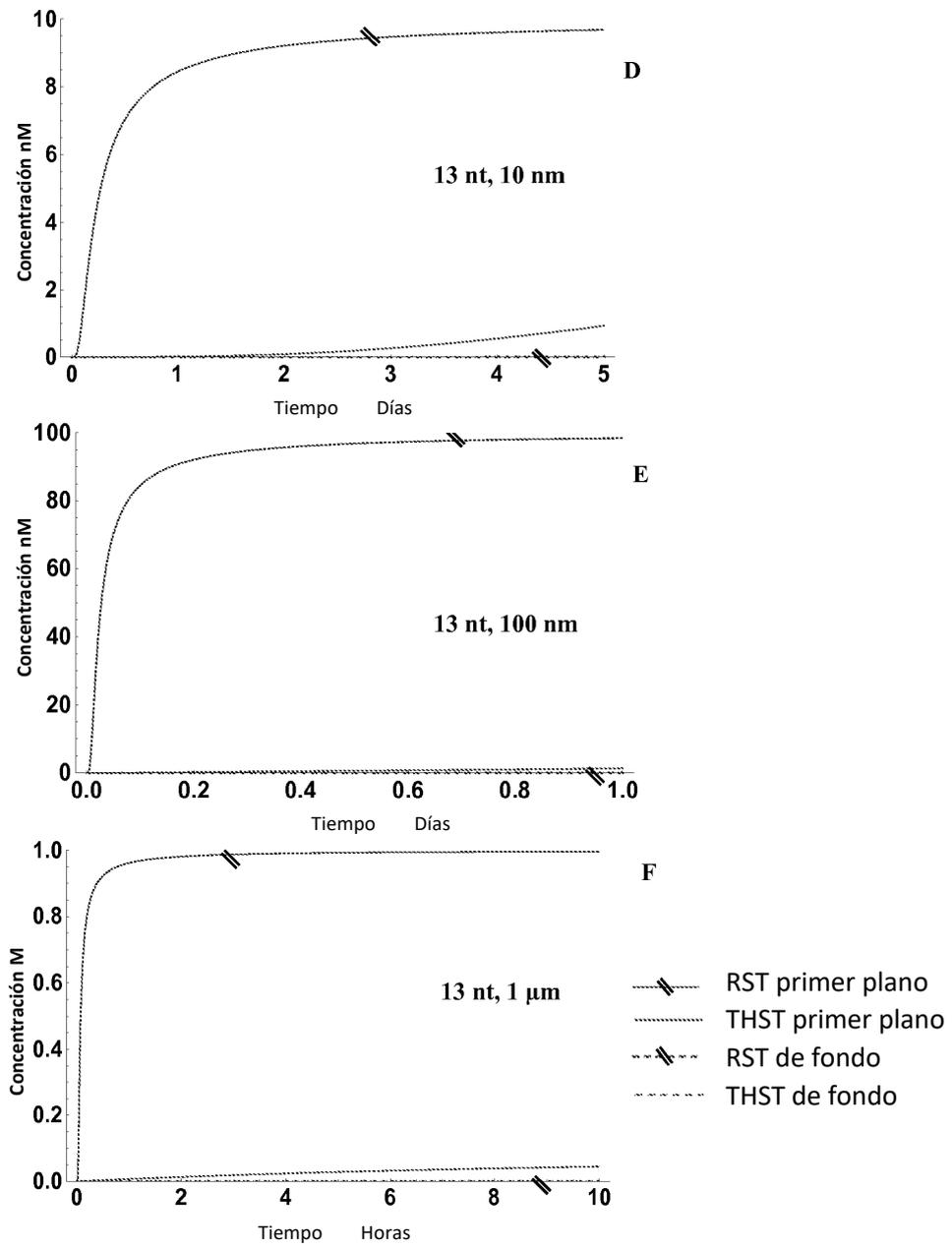


FIG. 19D-F

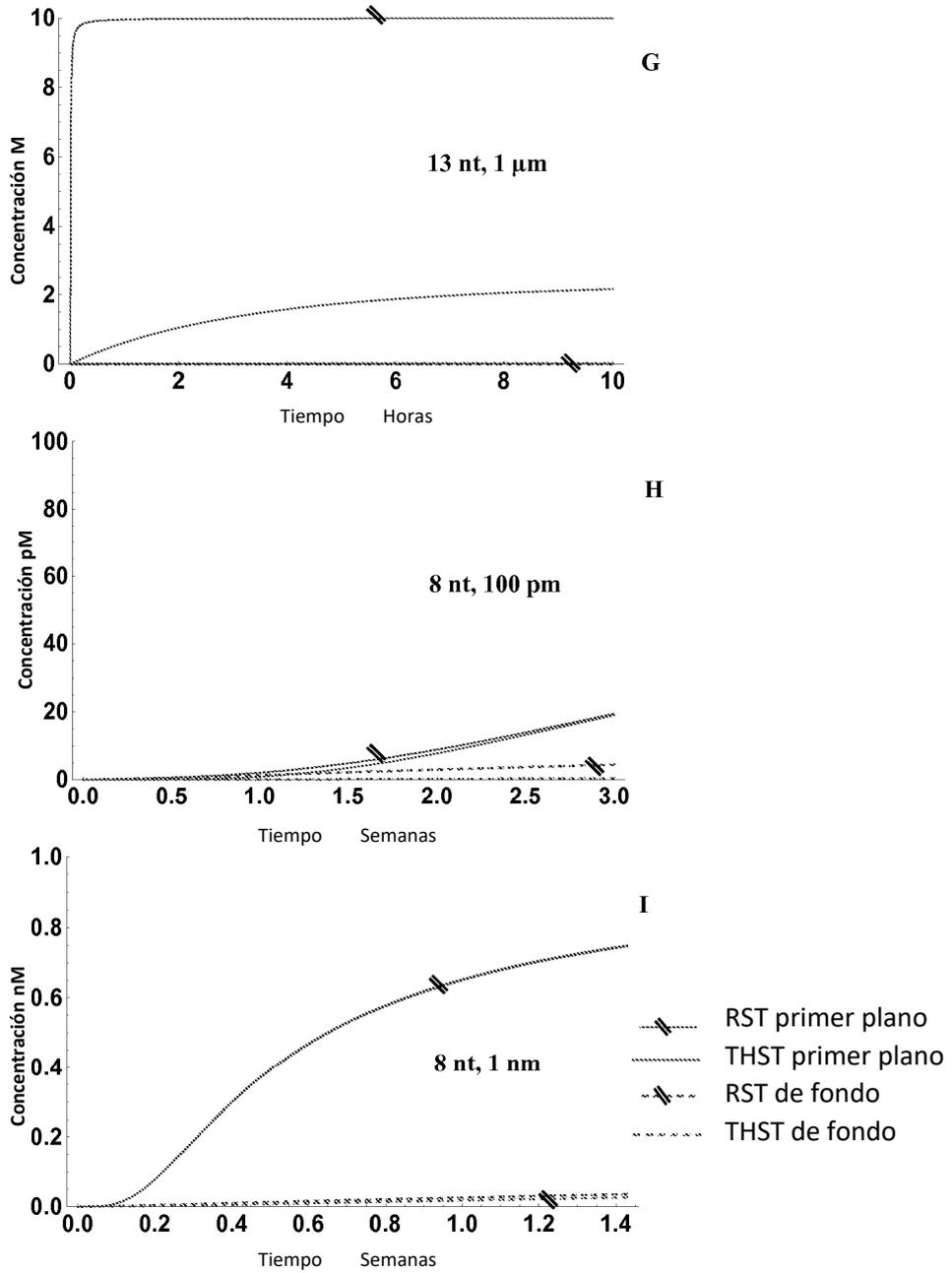


FIG. 19G-I

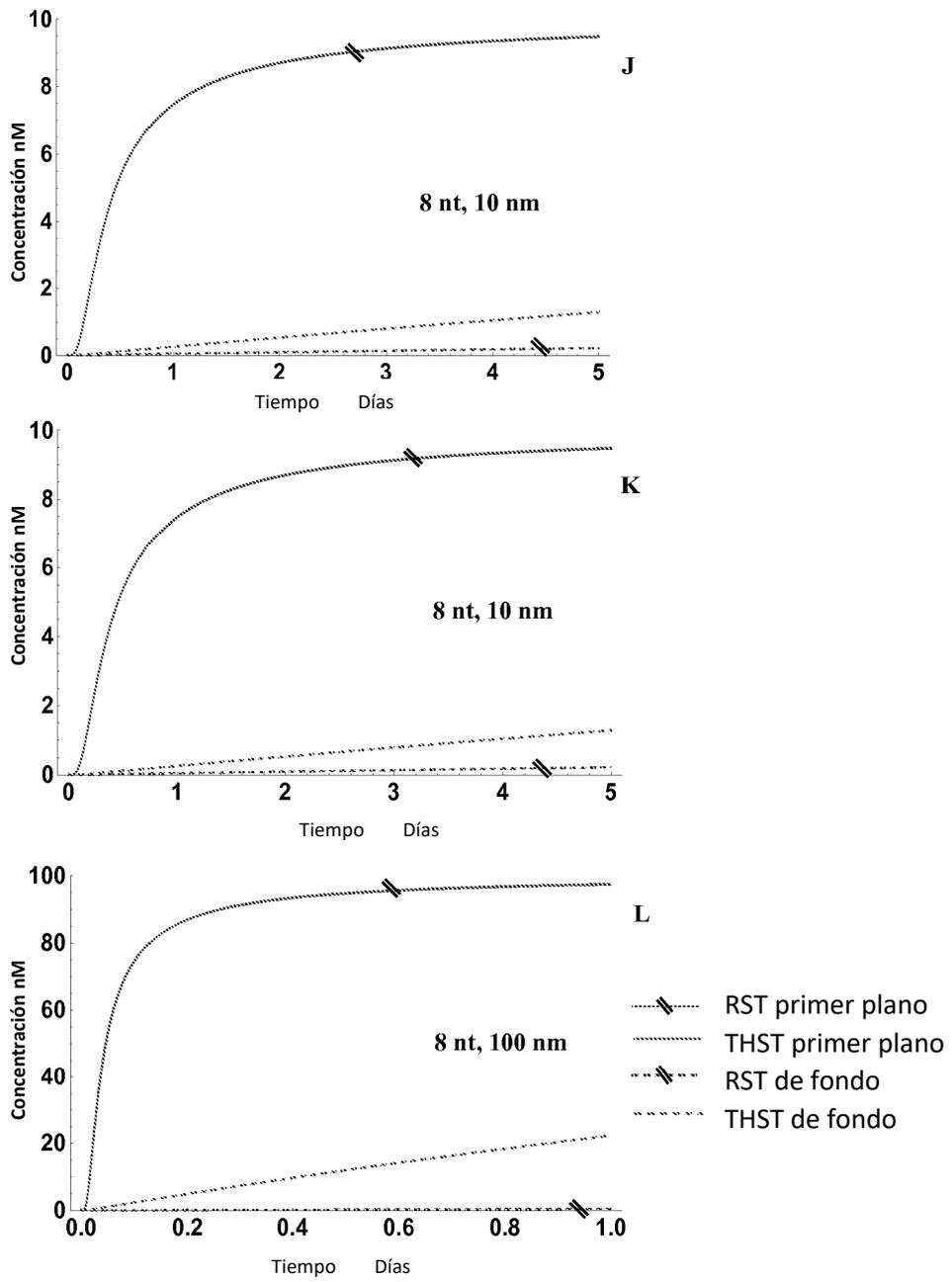


FIG. 19J-L

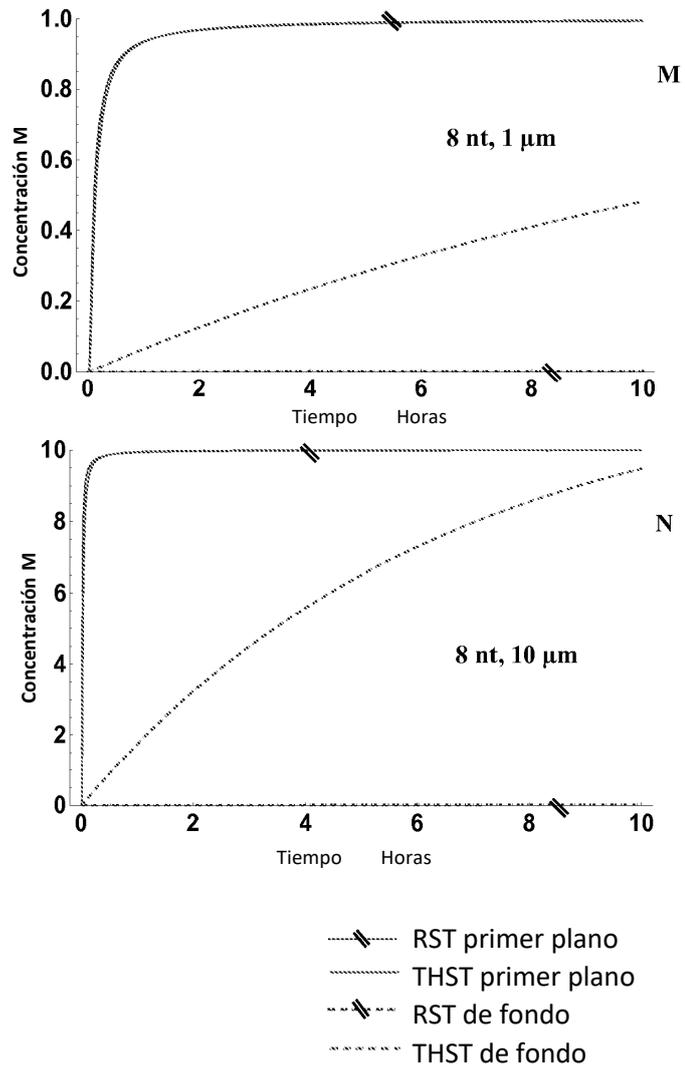


FIG. 19M-N