



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102971736 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201180032814. 8

(72) 发明人 D · J · 克莱伯姆

(22) 申请日 2011. 03. 25

(74) 专利代理机构 广州市天河区倪律专利代理  
事务所 (普通合伙) 44348

(30) 优先权数据

代理人 倪小敏 杨磊

61/349, 012 2010. 05. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2012. 12. 31

G06F 19/10(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2011/029947 2011. 03. 25

US 2003/0015294 A1, 2003. 01. 23,

US 7501253 B2, 2009. 03. 10,

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2009/0170719 A1, 2009. 07. 02,

W02011/149584 EN 2011. 12. 01

US 6238927 B1, 2001. 05. 29,

(73) 专利权人 埃默拉尔德治疗有限公司

审查员 刘华楠

地址 美国加利福尼亚州

权利要求书3页 说明书10页 附图7页

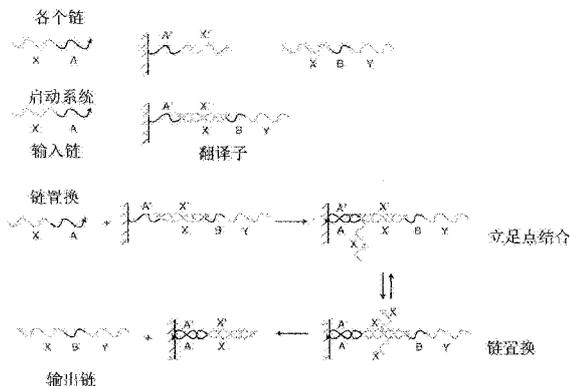
(54) 发明名称

利用修饰的核酸传播信息的系统和方法

酸结构的结合具有杂交自由能,其不同于碰撞分子或核酸结构与第二参照分子之间的第二参照结合的杂交自由能,以便碰撞分子的结合相对于第二参照结合被阻止。

(57) 摘要

改进基于核酸的分子计算系统的方法包括 (A) 确定计算系统,所述计算系统由以下组成 (i) 核酸结构,其包括不完全碱基配对双链体结构域, (ii) 至少一个多核苷酸置换分子,其可以在杂交条件下与核酸结构结合,以便核酸结构由于涉及所述双链体结构域的分支迁移反应而经历能量状态的转换,和 (iii) 碰撞多核苷酸分子,其与多核苷酸置换分子竞争,与核酸结构在杂交条件下结合,但其不能产生涉及双链体结构域的分支迁移反应;然后 (B) 根据情况,分别重构置换分子和核酸结构中的至少一个,以引入相对于第一参照分子的化学修饰,所述第一参照分子包含天然核苷并具有与置换分子或所述核酸结构相同的序列组成,其中,所述修饰导致置换分子和核酸结构的结合具有杂交自由能,其不同于置换分子或核酸结构与第一参照分子之间的第一参照结合的杂交自由能,以便分支迁移反应相对于第一参照结合被促进;和/或 (C) 根据情况,分别重构碰撞分子和核酸结构中的至少一个,以引入相对于第二参照分子的化学修饰,所述第二参照分子包括天然核苷并具有与碰撞分子或核酸结构相同的序列组成。通过这种重构实现的修饰导致碰撞分子与核



1. 制备改进的基于核酸的分子计算系统的方法,包括:

(1) 确定基于核酸的计算系统,所述基于核酸的计算系统包括

(1a) 输入核酸链,包括第一片段 A 和第二片段 B;

(1b) 目标不完全碱基配对核酸双链体,包括第一链和第二链,

其中所述第一链包括第一片段 B' 和第二片段 A', 所述第二链包括第一片段 B 和第二片段 C, 并且所述目标不完全碱基配对核酸双链体包括 B 和 B' 之间通过碱基配对形成的双链体区域和两个单链区域 A' 和 C, 并且

其中所述输入核酸链可在杂交条件下结合所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第一链, 从而引入链置换反应, 以生成所述输入核酸链 A-B 和所述目标不完全碱基配对核酸双链体 B' -A' 的所述第一链之间形成的输出双链体,

和

(1c) 碰撞不完全配对核酸双链体, 包括第一链和第二链,

其中所述第一链包括第一片段 C' 和第二片段 B', 所述第二链包括第一片段 C 和第二片段 D, 并且所述碰撞不完全配对核酸双链体包括 C 和 C' 之间通过碱基配对形成的双链体区域和两个单链区域 B' 和 D,

其中所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链可在杂交条件下结合所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链, 从而引入链置换反应, 以生成所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链 B-C 和所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链 C' -B' 之间形成的输出双链体, 并且

其中所述输入核酸链的所述第二片段 B 可在杂交条件下结合所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述单链区域 B' ;

然后

(2) 通过以下步骤重构所述基于核酸的分子计算系统:

(2a) 在所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链的所述第一片段 B 中引入第一化学修饰, 所述第一化学修饰导致与所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B' 的结合具有减少的杂交自由能, 和 / 或

(2b) 在所述输入核酸链的所述第二片段 B 中引入第二化学修饰, 所述第二化学修饰导致与所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B' 的结合具有增加的杂交自由能,

使得所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链的所述第一片段 B, 与所述输入核酸链的所述第二片段 B 相比, 结合于所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B', 形成更加稳定的双链体区域。

2. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述改进的基于核酸的分子计算系统包括第一化学修饰。

3. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述改进的基于核酸的分子计算系统包括第二化学修饰。

4. 权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述输入核酸链、所述目标不完全碱基配对核酸双链体和所述碰撞不完全配对核酸双链体形成不含酶的、核酸逻辑门的部分, 所述核酸逻辑门选自与门、非门、或门、与非门、或非门、异或门和异或非门。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰选自(i) 用假肽骨架取代核苷酸的糖-磷酸二酯骨架,(ii) 修饰核苷酸的糖部分,和(iii) 用类似物取代至少一个核苷酸的含氮碱基,其中所述类似物选自甲基胞嘧啶、二氨基嘌呤、吩噻嗪和 G 形夹。

6. 权利要求 5 所述的方法,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括用假肽骨架取代所述核苷酸的糖-磷酸二酯骨架,所述假肽骨架中引入胍基官能团。

7. 权利要求 5 所述的方法,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括用三环胞嘧啶取代至少一个核苷酸的含氮碱基。

8. 权利要求 5 所述的方法,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括在所述糖部分的 2' 位引入杂原子。

9. 权利要求 1 所述的方法,其中,所述链置换反应包括立足点介导的链置换。

10. 基于核酸的分子计算系统,包括:

(a) 输入核酸链,包括第一片段 A 和第二片段 B;

(b) 目标不完全碱基配对核酸双链体,包括第一链和第二链,

其中所述第一链包括第一片段 B' 和第二片段 A',

其中所述第二链包括第一片段 B 和第二片段 C,并且所述目标不完全碱基配对核酸双链体包括 B 和 B' 之间通过碱基配对形成的双链体区域和两个单链区域 A' 和 C,并且

其中所述输入核酸链可在杂交条件下结合所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第一链,从而引入链置换反应,以生成所述输入核酸链 A-B 和所述目标不完全碱基配对核酸双链体 B'-A' 的所述第一链之间形成的输出双链体;

和

(c) 碰撞不完全配对核酸双链体,包括第一链和第二链,其中所述第一链包括第一片段 C' 和第二片段 B',

其中所述第二链包括第一片段 C 和第二片段 D,并且所述碰撞不完全配对核酸双链体包括 C 和 C' 之间通过碱基配对形成的双链体区域和两个单链区域 B' 和 D,

其中所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链可在杂交条件下结合所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链,从而引入链置换反应,以生成所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链 B-C 和所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链 C'-B' 之间形成的输出双链体,并且

其中所述输入核酸链的所述第二片段 B 可在杂交条件下结合所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述单链区域 B',

其中

所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链的所述第一片段 B,相对于天然核酸,包括第一化学修饰,所述第一化学修饰导致与所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B' 的结合具有减少的杂交自由能,和/或

所述输入核酸链的所述第二片段 B,相对于天然核酸,包括第二化学修饰,所述第二化学修饰导致与所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B' 的结合具有增加的杂交自由能,

使得所述目标不完全碱基配对核酸双链体的所述第二链的所述第一片段 B,与所述输

入核酸链的所述第二片段 B 相比,结合于所述碰撞不完全配对核酸双链体的所述第一链的所述第二片段 B',形成更加稳定的双链体区域。

11. 权利要求 10 所述的系统,其中,所述输入核酸链、所述目标不完全碱基配对核酸双链体和所述碰撞不完全配对核酸双链体形成不含酶的、核酸逻辑门的部分,所述核酸逻辑门选自与门、非门、或门、与非门、或非门、异或门和异或非门。

12. 权利要求 10 所述的系统,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰选自 (i) 用假肽骨架取代核苷酸的糖 - 磷酸二酯骨架, (ii) 修饰核苷酸的糖部分,和 (iii) 用类似物取代至少一个核苷酸的含氮碱基,其中所述类似物选自甲基胞嘧啶、二氨基嘌呤、吩噻嗪和 G 形夹。

13. 权利要求 12 所述的系统,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括用假肽骨架取代所述核苷酸的糖 - 磷酸二酯骨架,所述假肽骨架中引入胍基官能团。

14. 权利要求 13 所述的系统,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括用三环胞嘧啶取代至少一个核苷酸的含氮碱基。

15. 权利要求 13 所述的系统,其中,所述第一化学修饰或所述第二化学修饰包括在所述糖部分的 2' 位引入杂原子。

16. 权利要求 10 所述的系统,其中,所述链置换反应包括立足点介导的链置换。

## 利用修饰的核酸传播信息的系统和方法

[0001] 相关专利申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2010 年 5 月 27 日提交的美国临时申请号 61/349,012 的优先权,其全部内容通过引用被并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及利用修饰的核酸传播信息的系统和方法。

### 背景技术

[0004] 利用分子有可能实现纳米级计算机。这种计算机可以适于解决某些计算问题。具体地,应用生物分子的计算机可以与生物学环境相容,并有可能用于复杂疾病诊断学或甚至治疗。

[0005] 将一种核酸序列翻译成另一种核酸序列的能力可被应用以核酸建立逻辑门(logic gate)和网络。这些门和网络由两个事件驱动:杂交和链置换。这两个事件通常是热力学上有利的;即,它们涉及从较高到较低能量状态的转换。因此,这两个事件可以在系统中自发地发生。

[0006] 杂交涉及游离单链核酸片段(stretch)。因此,核酸网络可以通过这些游离链的有用性而被调整。

[0007] “分离事件(sequestering event)”允许某些序列可有条件地用于网络的其余部分。这样的事件赋予翻译子(translator)的构造,其将一个单链核酸序列转化成不同的单链核酸序列。这些翻译子是基本逻辑算子(operator)如与(AND)、非(NOT)、或(OR)、与非(NAND)、或非(NOR)、异或(XOR)和异或非(XNOR)可以通过核酸建立的基础。通过这些和其它逻辑组件,可以建造包括组件如扩增子(amplifier)的较大网络。因此,这些翻译事件对于通过核酸和分子计算进行的信息处理是重要的。

### 发明内容

[0008] 根据本发明的一个方面,提供用于改进基于核酸的分子计算系统的方法。该方法包括:(A)确定计算系统,所述计算系统由以下组成:(i)核酸结构,其包括不完全碱基配对双链体结构域(duplex domain),(ii)至少一个多核苷酸置换分子,其可以在杂交条件下与核酸结构结合,以便核酸结构由于涉及双链体结构域的分支迁移反应(branch migration reaction)而经历能量状态的转换,和(iii)碰撞(clashing)多核苷酸分子,其与多核苷酸置换分子竞争,以在杂交条件下结合核酸结构,但其不能产生涉及双链体结构域的分支迁移反应;然后,(B)根据情况,分别重构置换分子和核酸结构中的至少一个,以引入相对于第一参照分子(reference molecule)的化学修饰,所述第一参照分子包括天然核苷并具有与置换分子或核酸结构相同的序列组成(sequence content)。上述修饰导致置换分子和核酸结构的结合具有杂交自由能,其不同于置换分子或核酸结构与第一参照分子之间的第一参照结合(reference binding)的杂交自由能,以便分支迁移反应相对于第一参照结合被

促进。在步骤 (B) 之后或取代步骤 (B) 的是步骤 (C), 其根据情况分别重构碰撞分子和核酸结构中的至少一个, 以引入相对于第二参照分子的化学修饰, 所述第二参照分子包括天然核苷并具有与碰撞分子或核酸结构相同的序列组成。修饰导致碰撞分子与核酸结构的结合具有杂交自由能, 其不同于碰撞分子或核酸结构与第二参照分子之间的第二参照结合的杂交自由能, 以便碰撞分子的结合相对于第二参照结合被阻止。

[0009] 在其另一方面, 本发明还提供这样的系统, 所述系统包括 (A) 核酸结构, 其包括不完全碱基配对双链体结构域; (B) 至少一个多核苷酸置换分子, 以实现在杂交条件下与核酸结构的结合, 以便核酸结构由于涉及双链体结构域的分支迁移反应而经历能量状态的转换; 和 (C) 至少一个多核苷酸碰撞分子, 其能够在杂交条件下与核酸结构结合, 以便核酸结构和碰撞分子结合并防止多核苷酸置换分子的结合。根据情况, 置换分子和核酸结构中的至少一个分别具有相对于参照分子的化学修饰, 所述参照分子包括天然核苷并具有与置换分子或所述核酸结构相同的序列组成。修饰使结合具有杂交自由能, 其不同于置换分子或核酸结构与参照分子之间的参照结合的杂交自由能, 以便分支迁移反应相对于参照结合被促进。此外或者取而代之, 根据情况, 碰撞分子和核酸结构中的至少一个分别具有相对于参照分子的化学修饰, 所述参照分子包括天然核苷并具有与置换分子或核酸结构相同的序列组成。修饰使结合具有杂交自由能, 其不同于置换分子或核酸结构与参照分子之间的参照结合的杂交自由能, 以便碰撞分子的结合相对于参照结合被阻止。

[0010] 在再一方面, 提供用于传播信息的系统。所述系统包括第一分子和第二分子, 所述第二分子被设置成与第一分子结合。根据情况, 第一分子和第二分子中的至少一个分别具有相对于参照分子的化学修饰, 所述参照分子具有与第一分子或第二分子相同的序列组成。修饰使结合具有自由能, 其不同于参照分子与第一或第二分子之间的参照结合的自由能, 以便在系统中实现下列中的至少一项: 生产性结合的概率被提高, 或非生产性结合的概率被降低。

## 附图说明

[0011] 图 1A 图解核酸翻译子的固相分离实施方式, 其中各个部分 (A、B 等) 代表具有任意长度和序列的寡核苷酸片段。

[0012] 图 1B 图解核酸翻译子的固相分离实施方式如何分离寡核苷酸分离片段。

[0013] 图 2A 图解核酸翻译子的“立足点 (toe-hold)”分离实施方式。再次, 各个部分代表具有任意长度和序列的寡核苷酸片段。

[0014] 图 2B 图解核酸翻译子的“立足点”分离实施方式如何分离寡核苷酸分离片段。

[0015] 图 3A 显示具有三个立足点分离的核酸翻译子的系统。所示反应是全链置换反应, 其通过与图 2A 中相同的分支迁移机制进行。

[0016] 图 3B 显示具有与图 3A 中所示的寡核苷酸相同的寡核苷酸的系统, 但不具有链置换反应, 而是显示立足点“碰撞”, 其中立足点通过不能产生链置换反应的序列而结合。这种结合事件位于立足点, 使得期望的链不能结合。

[0017] 图 3C 图解不完全碱基配对核酸结构的不同构造, 包括: (a) 末端; (b) 内环; 和 (c) 以及 (d) 多部分复合体 (multi-part complex)。

[0018] 图 4 显示对下列内容的示意性描述: 在图 3A 中所示核酸翻译子系统中, 如何通过

用提高结合亲和性的化学修饰取代寡核苷酸片段和 / 或用降低结合亲和性的修饰取代寡核苷酸片段使平衡移动,以相对于立足点碰撞而有利于链置换反应。

[0019] 图 5 显示核酸类似物的修饰的骨架结构,其中,“B”代表任意的核碱基,和 (a) 显示在 DNA 中发现的天然磷酸二酯骨架,(b) 显示肽核酸,(c) 显示胍基肽核酸,(d) 显示 L- 丝氨酸衍生的  $\gamma$ -PNA,和 (e) 显示二酰胺基磷酸酯 (phosphorodiamidate) (在本文中具有吗啉代糖)。

[0020] 图 6 图解核酸类似物的修饰的糖结构,其中“B”代表任意的核碱基,和 (a) 显示在 DNA 中发现的天然脱氧核糖,(b) 显示吗啉基,(c) 显示锁定核酸,和 (d) 显示氟修饰的 RNA 衍生物。

[0021] 图 7 图解核酸类似物甲基胞嘧啶 (a)、二氨基嘌呤 (b)、吩噻嗪 (c) 和 G 形夹 (d) 的修饰的核碱基结构。

[0022] 图 8 图解荧光动力学分析,以指示由于根据本发明的化学修饰而导致的反应速率变化。

### 具体实施方式

[0023] 各种方法诸如固相分离、立足点分离和立足点交换均可以用于翻译核酸序列以建立逻辑算子和网络。这三种具体方法——在下面更详细地描述——通过利用三程 (three-way)、立足点介导的分支迁移反应的几何学得到示例。然而,对于分支迁移反应,另外的机制也是可能的,包括但不限于四程分支迁移、四程加速迁移和多链复合体迁移。

[0024] 因此,虽然为了说明目的而利用三程分支迁移来描述下面的实施方式,但本发明考虑 DNA 逻辑门和网络被建立以利用其它的分支迁移途径。相反地,本发明的实施方式可以应用于任何分支迁移反应。

[0025] 固相分离利用物理分离空间中相关的序列 / 链,其利用珠、纳米颗粒或表面如此进行。该方法应用位点分离的原理,其在有机化学背景下已被广泛应用。在固相分离几何学中,这些置换事件何时发生可以通过调节必要的链是否在系统的溶液中或是在系统的固相中而被控制。

[0026] 图 1A 显示翻译子的碱性固相分离装置 (setup)——允许系统将一个核酸序列替换为另一个的组件。在本文中,链 A'-X' (其中 A 和 X 每一个均代表具有任意长度和序列的寡核苷酸片段,并且, X' 和 A' 代表其各自的反向互补体) 与固体支持物结合,并最初与 Y-B-X 杂交,形成不完全碱基配对双链体形式的核酸结构,其可用作翻译子。在该构造中,链 Y-B-X 是固相分离的,并且不能与系统的其余部分反应。然而,在链 X-A——被称为“多核苷酸置换分子”——存在的情况下,链 Y-B-X 可以从固体支持物被置换并暴露于系统的溶液相,同时链 X-A 与支持物结合。该操作包括两个步骤,第一个步骤是互补序列 A 和 A' 的杂交 (常称为立足点结合)。在第二个步骤中,链 X-A 的 X 区结合 A'-X' 的 X' 区,置换 Y-B-X 的 X 区并将该链释放到溶液中,而使 X-A 与固体支持物结合 (该步骤常被称为分支迁移反应)。该两个步骤的处理有效地使游离 X-A 链翻译成游离 Y-B-X 链。

[0027] 图 1B 显示这样的系统:其具有与不完全碱基配对双链体——“翻译子 1”——相互作用的输入链 X-A。输出包括完全碱基配对双链体, A'-X' / X-A——其被认为是“废”产物,和输出链 Y-B-X——其被称为“输出 1”,并可用作进一步反应中的“输入 2”。

与“翻译子 2”相互作用,并产生“输出 2”和另外的废弃物。在该图中,链 Y-B-X 的 B 区图解在该网络中序列的分离。在开始时, Y-B-X 不能与翻译子 2 的 B' 区杂交,因为两者隔离在单独的固体支持物上。当输入 1 结合翻译子 1 并将 Y-B-X 释放到溶液中时,则 Y-B-X 可以与翻译子 2 相互作用。因此, Y-B-X 和翻译子 2 相互作用的能力取决于输入 1 的存在。

[0028] 与一个固体表面结合的链由于位阻效应而与另一固体表面上的链极其缓慢地相互作用。因此,溶液相中的链是可以与固相算子相互作用的唯一组件。

[0029] 立足点分离和立足点交换是单独的方法,其应用类似的配对相互作用,但具有不同的几何学。两者均可以完成与固相翻译子相同的操作,但通过保持结合(bind up)在双链体中的序列片段而起作用。正如在固相翻译子中一样,置换事件可以释放感兴趣的序列。对于两种立足点几何学,所有的链均可以共同在溶液中,其结果是,置换事件通过立足点——即,提供置换事件起始点的单链核酸序列的短片段——的有用性而被调控。

[0030] 图 2A 显示立足点分离的翻译子,其类似于图 1A 中的翻译子,但是其基于立足点而非固相分离。在该实例中,翻译子的 A' 区是立足点,其结合输入链并允许链置换反应进行。

[0031] 图 2B 显示基于立足点的系统,其具有与不完全碱基配对双链体——“翻译子 1”——相互作用的输入链 A-X-B。输出包括废弃物,即,完全碱基配对双链体, B' -X' -A' / A-X-B, 和“输出 1”链 X-B-Y-C, 其可用作进一步反应中的“输入 2”。“输入 2”与“翻译子 2”相互作用并产生“输出 2”和另外的废弃物。在该图中, X-B-Y-C 的 B 区在翻译子 1 中通过与互补性 B' 区杂交而被分离,因此不能与翻译子 2 的 B' 区相互作用。X-B-Y-C 与翻译子 2 相互作用的能力取决于输入 1 (A-X-B) 在系统中的存在。

[0032] 立足点几何学有可能非常有用,但它们的用途目前为止受到包含这种立足点几何学的系统可传播信息的速度的限制。这是由于存在于当前的立足点分离方法中的固有限制,使它们减缓到生物学上有用的时间尺度以下。这些动力学瓶颈是非生产性反应的结果,非生产性反应在本文中被称为“立足点碰撞”,其发生在立足点通过具有不能产生置换反应的互补序列或“碰撞链”的分子结合时。

[0033] 图 3A 显示具有三立足点分离的核酸翻译子的系统,其与图 2A 中的系统非常相似。然而,如果三个链均共同处在溶液中,可能发生其它的结合事件。图 3B 图解可能发生的一些非生产性结合事件或碰撞。通过涉及“多核苷酸碰撞分子”,这些事件并不导致置换反应,但可以使系统减缓,因为碰撞链的发生阻碍可产生置换反应的链结合。

[0034] 立足点可以保持较短,以减轻这些碰撞对系统的影响:立足点越短,互补序列的开/关速率可以越快。因此,五或六核苷酸长的立足点是常见的,因为在这些长度下,如果发生非生产性结合事件,消耗在双链、“碰撞”状态中的时间很短。然而,该方法产生上述动力学瓶颈,因为生产性结合事件受到相同热动力学参数的限制;因此,引入链也不与这些立足点牢固地结合。因此,当正确的引入链结合时,并不总是发生期望的置换,因为需要其处于结合状态足够长以引发置换反应。因此,短立足点的应用增加给定操作发生和产生输出所需要的时间量。换言之,置换反应不能通过碰撞链和通过期望链在许多结合事件发生前发生。这种低效率限制系统的应用,其使信息传播减缓至过度延长以至于失去可用性的时间尺度。

[0035] 根据本发明的一个方面,由于核酸结构和/或多核苷酸置换分子的化学修饰,生产性相互作用被促进。这使将各个逻辑门链接在一起形成任意大小的网络以用于生物学应

用是可行的。更具体而言,提供确定如何不利于碰撞相互作用而有利于生产性相互作用而不改变序列的信息内容的方法。

[0036] 根据本发明,这些方法改进期望链的结合的热动力学和/或不利于碰撞链的热动力学,其均不改变序列组成。具体地,利用化学修饰的结构,给定寡核苷酸和其 DNA 或 RNA 互补体之间的期望的杂交反应的吉布斯自由能 ( $\Delta G$ ) 被降低和/或碰撞相互作用的  $\Delta G$  被提高。在分子水平上,由于结构的修饰,其分别对应于期望杂交反应的较紧密结合(较高结合亲和性)和碰撞链的较不紧密结合(较低结合亲和性)。

[0037] 前者使具有立足点的期望结合事件的平衡朝向双链体(结合)状态移动,产生发生置换反应而不影响立足点和碰撞链之间结合平衡的较好机会。后者不利于碰撞链(一条或多条)的结合,使得这些相互作用有利于不结合状态。这两种变化可以单独应用或组合应用,以有利于期望链的结合和不利于碰撞链(一条或多条)的结合。

[0038] 根据本发明的实施方式利用这样的事实:任何立足点介导的链置换的反应速率均与结合的两个核酸链或复合体的热动力学支持性有关。通过使这些热动力学更有利于非碰撞结合事件和/或较不利于碰撞结合事件,可以将系统驱向生产性置换反应。这将加速信息传播到其在生物学相关时间尺度上可用的点的速率。本文公开的本发明方法通过对系统中寡核苷酸片段的化学修饰而使其实现。

[0039] 根据本发明,由于核酸结构和/或多核苷酸分子的这种化学修饰,反应最佳的有效浓度范围被扩大。这由于给定温度下双链体中核酸的百分比是浓度和杂交反应的  $\Delta G$  的函数而发生。因此,互补寡核苷酸组的浓度越高,双链体形成的百分比越高,并且  $\Delta G$  越低(更有利),双链体形成的百分比越高。改变给定相互作用的  $\Delta G$ ,因而改变给定浓度下的双链体百分比。降低  $\Delta G$ (即,使相互作用更有利)意味着在给定浓度下将存在较高百分比的双链体,而提高  $\Delta G$ (使相互作用较不有利)意味着在相同浓度下存在较低百分比的双链体。该作用扩大了这些反应在实践中可用的最佳浓度范围,因为相对于参照组的未修饰寡核苷酸,期望的双链体可以在较低浓度下形成而不期望的双链体将不会在较高浓度下形成。

[0040] 这些方法适用于任意立足点介导的反应几何学,包括但不限于上述 3-程分支迁移反应。不同的构造可用于不完全碱基配对双链体,其中分支或环位于结构中的不通过点(例如,见图 3C)。分支或环的方向不是根据链的方向性来断定。因此,这些结构可以包括(a)末端结构,(b)内环,或(c)和(d)多部分复合体或不完全碱基配对双链体的任意其他可能的构造。

[0041] 这些核酸结构可以将活性“输入”序列(置换多核苷酸)翻译成活性“输出”序列(释放的多核苷酸)。

[0042] 上文被称为“翻译子”的核酸结构可以处于其各自的热动力学最小值,即,他们是特定组的核酸序列可形成的最稳定的结构。这些结构可以通过使两个或更多个单独的核酸链退火而形成。例如,所有链均可以混合在一起,被加热至明显高于所要形成的任意结构的熔点,然后被缓慢冷却。这允许链在可能的最低能量状态(热动力学最小值)下杂交。

[0043] 对于天然核酸如 DNA 和 RNA、具有修饰的骨架、糖或碱基的核酸和对于由天然和修饰的核酸构成的嵌合体,该程序可以是相同的。

[0044] 特定化学修饰的选择性结合可以有利于能够经过立足点碰撞结合事件发生生产

性置换反应的链的结合。例如,图 4 显示与图 3A 和 3B 相同的链。然而,如果某些核酸片段被化学修饰的类似物——其改进结合的热动力学——取代,则碰撞动力学有利于置换反应地移动。例如,如果链 X-B-Y-C 中的“B”寡核苷酸片段(实线圈住)对 B' 具有比对链 A-X-B 中的“B”寡核苷酸片段更高的结合亲和性,则平衡移动有利于生产性链置换反应,这提高该反应发生的概率或频率。两个 B' 均具有相同的沃森-克里克碱基配对序列,但 X-B-Y-C 和 B' 立足点之间的相互作用由于化学修饰而更加有利。

[0045] 类似地,如果某些核酸片段被不利于结合的类似物取代,平衡也将移动而远离碰撞。例如,如果链 A-X-B 中的“B”(虚线圈住)对 B' 比对 X-B-Y-C 中的“B”具有更低的结合,则平衡将移动而远离立足点碰撞,提高链置换反应的动力学。

[0046] 两种途径均加速核酸网络可处理信号的速度,因为相对于碰撞链(一条或多条)的停留时间,两者均增加期望链在立足点上的停留时间。这提供链置换反应在给定时间段内发生的较好机会,因此提高网络评价给定输入或输入组的速率。这些修饰之前未被用于促进或不利于置换反应以建立重要的 DNA 逻辑门和网络或传播信息。

[0047] 存在许多充分表征的核酸修饰,其可根据本发明的实施方式用于提高或降低天然 DNA 或 RNA 的结合的热动力学性质。这些包括寡核苷酸的骨架、糖或核碱基的改变。这些修饰也可以单独或彼此结合应用,即,利用修饰的骨架并不排除应用相同链中修饰的核碱基。

[0048] 核酸骨架类似物可用于提高能够产生置换反应的链的结合。存在多种可以应用的不同类似物,其均比天然核酸提供对 DNA 和 RNA 更紧密的结合亲和性。这些类似物包括但不限于具有不带电的骨架(肽核酸或二酰胺基磷酸酯)、带正电的骨架(胍基肽核酸)和允许预组构(pre-organization)的氢结合基团( $\gamma$  肽核酸)的核酸。

[0049] 某些类似物的一般结构显示在图 5 中。这些类似物均提高核酸杂交反应的热动力学,允许较紧密的立足点结合,因而允许加速的置换。通过在逻辑网络的特定位置应用这些类似物,与碰撞相互作用相比,期望的置换反应可以被有力地促进,因而加速信息处理的速率。

[0050] 修饰的糖环的应用也可以改变寡核苷酸结合 DNA 或 RNA 的热动力学。最广泛应用的类似物是吗啉代、锁定核酸(LNA)和 LNA 衍生物。其它修饰的糖在文献中被证明也可以产生类似结果——就改变结合热动力学而言。其实例是在 1'、2'、3' 或 4' 位具有修饰的糖和核糖环戊烷环中的氧被不同原子取代的糖。这些类似物示例在图 6 中。

[0051] 核碱基修饰也可以用于实现与骨架和糖类似物相同的作用;即,改变特定杂交反应的热动力学。这些碱基包括甲基胞嘧啶、二氨基嘌呤、G 形夹和吩噻嗪(图 7),其均提高链对其反向互补体的结合亲和性。核碱基修饰存在的另一机会涉及伪互补碱基。这类碱基类似物彼此形成弱碱基对,但与标准碱基形成强碱基对。一个这样的碱基对是 2-氨基腺嘌呤(nA)和 2-硫代胸腺嘧啶(sT)。这些碱基可用于有利于一条链结合同时不利于另一条链结合,其是提高生产性结合事件的可能性同时降低碰撞可能性的实例。

[0052] 可用于改变结合相互作用的热动力学的另一化学修饰是荷电聚合物如脱乙酰壳多糖的引入,其已经在文献中被显示促进置换反应的速率。然而,因为这些聚合物非特异性地加速反应,所以它们必需结合上述其它修饰中的一种应用,以能够区别期望的和不期望的结合事件。

[0053] 不同的方法可以用于合成具有上述化学修饰的分子。例如,设计修饰的分子可以

考虑骨架化学。用于将各个单体结合到较长链中的就是骨架化学。涉及核碱基或糖但保持 DNA/RNA 的天然磷酸二酯骨架的修饰可以通过如用于天然单体的标准亚磷酰胺化学合成。可以在,例如 Beaucage, S., and R. Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223 (1992), in Brown, D. M. A, "Brief history of oligonucleotide synthesis," 20 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (Protocols for Oligonucleotides and Analogs)* 1-17 (1993)、在 Reese, Colin B., *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 3851 (2005) 和在 Iyer, R. P.; and S.L. Beaucage, "7.05. Oligonucleotide synthesis," 7 *COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY (DNA and Aspects of Molecular Biology)* 105-52 (1999) 中找到这些方法的说明,其各自的内容通过引用其整体被并入本文。

[0054] 如果骨架以特定修饰被改变,则将应用不同的化学。这种修饰化学在科学文献中一般是已知的。因此,肽核酸(PNA)及其衍生物依赖于酰胺键而使各个单体连接在一起。因此,并非利用亚磷酰胺化学,而是通过酰胺结合形成条件和偶联剂如 HBTU 制备这些单体的链。可以例如在 F. Beck, "Solid Phase Synthesis of PNA Oligomers," *Methods in Molecular Biology Series (Peptide Nucleic Acids)*, Humana Press, <http://www.springerlink.com/content/mr571738x7t65067/> 中找到用于制备 PNA 或 PNA- 样寡核苷酸的方法的调查。

[0055] 另一骨架修饰方法涉及嵌合寡核苷酸。这些是在相同分子中包含不同骨架化学的寡核苷酸链。例如,如果需要一半是 PNA 骨架和一半是 DNA 骨架的链,则会需要一种方式将这两种不同的骨架化学连接起来。制备这些嵌合链在本领域中也通常是已知的。在上面 PNA/DNA 嵌合体实例中,化学差异可以通过利用修饰的 DNA 或 PNA 单体被桥接。对于 DNA, 5'-二甲氧基三苯甲基(DMT)保护的羟基被单甲氧基三苯甲基(MMT)保护的胺——在去保护后可以与 PNA 的羧酸反应——取代。对于 PNA,受保护的 N 端氮被 DMT 保护的羟基——在去保护后可以与 DNA 上的亚磷酰胺基团反应——取代。这些方法在例如 E. Uhlmann, 等, *Angew. Chem. (Int'l ed.)* 37: 2796 - 823 (1998) 中有较多描述。

[0056] 所有这些修饰——无论单独应用或彼此结合应用——均可影响任意核酸网络中特定相互作用的热力学条件,以便期望链或复合体的结合经过碰撞相互作用而被促进而不改变序列组成。所有这些相互作用均可以用于任何分支介导的迁移反应,无论它们是 3-程分支迁移诸如固相分离、立足点分离或立足点交换还是通过其它机制例如四程分支迁移、四程加速分支迁移或多链复合体迁移发生的分支迁移。

[0057] 根据一些实施方式,可以测试分支迁移反应改进的化学修饰的分子的动力学。一种方法是利用荧光动力学分析测量不同修饰相对于天然多核苷酸在促进或阻碍分支迁移反应中提供的改进(例如,见图 8)。在本文中,翻译子结构在一条链上具有淬灭剂而在另一链上具有荧光团。在不存在置换链的情况下,荧光团的荧光被淬灭,提供反应的基线。当置换分子——可以在立足点和/或非立足点区中被修饰——加入到翻译子中时,它将置换具有淬灭剂的链,并且,通过这样做,其产生荧光信号。因此,荧光在系统中“开启”的速率指示置换反应的动力学。分析可以更加复杂,因为需要更大的线路(circuit)以在最终的产生荧光的置换反应或可以加入碰撞链以与置换链竞争立足点之前进行评价。

[0058] 根据本发明的方法也可以应用于适于传播信息的任何天然或人工的分子,只要包括第一分子和第二分子,并且后者被设置成与前者结合。根据情况,第一和第二分子中的至

少一个分别具有相对于参照分子的化学修饰,所述参照分子具有与第一分子或第二分子相同的序列组成。修饰使结合具有自由能,其不同于参照分子与第一或第二分子之间的参照结合的自由能,以便在系统中实现下列中的至少一项:生产性结合的概率被提高;或非生产性结合的概率被降低。

[0059] 如上所述,根据本发明,可以应用多步骤处理来获得改进的核酸网络。这意味着检验考虑中的核酸翻译子的整个网络——包括任何碰撞相互作用,然后确定需要被修饰以最佳化促进置换事件和最小化碰撞的序列片段。

[0060] 对于任意给定的链置换反应,这些修饰可以在期望的置换分子上、在碰撞分子上或在两者上进行。这是因为,对于具有可用的立足点的任意翻译子或逻辑门,在期望的置换分子和任意碰撞分子之间将存在与立足点结合的竞争。此外,相对于碰撞分子提高置换分子与立足点结合的能力将提高置换反应发生的速率。因此,提高置换分子结合的能力(降低结合的 DG) 或降低碰撞分子(一个或多个)结合的能力(提高结合的 DG) 将产生提高反应速率的作用。因为这两种 DG 变化均可以通过化学修饰来完成,根据本发明,当考虑到哪种序列片段要修饰时,研究单独地修饰置换分子、单独地修饰碰撞分子和同时修饰这两者的可能性是非常重要的。

[0061] 根据本发明的实施方式,在该分析中可以改变的两个参数是(i)任意两个寡核苷酸之间的相互作用的速率常数,和(ii)网络中所有寡核苷酸的立足点的长度。前一个参数可以通过寡核苷酸的化学组成和与其它寡核苷酸的相互作用的 DG 规定。后一个参考可以是所考虑的序列立足点区中的核苷酸数。

[0062] 将核酸网络建模所需的动力学速率常数可以通过任意两个寡核苷酸之间杂交的 DG 来计算。对于天然碱基和多种修饰,来自最邻近参数的这些值已经在文献中被报道过。如果它们还是未知的,那么它们可以通过对熔化温度数据的 Van' t Hoff 分析、示差扫描量热法或等温滴定量热法经实验确定。这些方法中的每一个均可以产生考虑的核酸相互作用的热力学参数,其然后可以用于确定任何温度下反应的 DG。然后, $\Delta G$  值可用于确定相互作用的平衡常数( $K_{eq}$ )。平衡常数可以与速率常数的比成比例;因此,针对给定反应的必需的动力学速率常数,可以使用已知的常数来解决。

[0063] 因此,关于考虑的用于核酸逻辑网络的修饰,可以获得全组速率常数以及所有的立足点长度。通过该信息,可以模拟系统,以确定网络的时间过程行为,和确定哪里可以应用特定修饰,以相对于碰撞相互作用最优化生产性置换反应。另外,模型中特定立足点区的长度可以改变。网络将通过改变特定位置的修饰和通过用不同长度的立足点模拟网络中的反应而得到最优化。这些计算可以用于确定产生网络的最有利时间过程行为的每一组件的最佳修饰和立足点长度。

[0064] 网络也可以通过以下来最优化:经实验改变修饰和立足点长度然后在实验室中研究时间过程行为而不是用数学模型模拟行为。

[0065] 考虑到完全最优化的网络,针对特定修饰,可以用标准亚磷酸胺化学方法或用文献中报道的方法(一种或多种)合成所需的寡核苷酸。任何由一个以上寡核苷酸组成的翻译子或门结构均可以通过将各个寡核苷酸混合在一起然后将它们退火而构建,所述退火首先通过将混合物加热到所有可能的双链体的熔化温度以上然后将其缓慢冷却。这可以导致寡核苷酸杂交,形成特定组的核酸序列可以适用的最稳定的结构。然后,这些结构可以在它

们用于网络中之前被纯化。一旦所有的翻译子、门和其它组件均被设计、合成和退火,网络可以应用于目标分析、诊断或生物学系统。

[0066] 虽然已经讨论了本发明主题的具体实施方式,但它们对于本发明仅是说明性的而不是限制性的。对于本发明属领域的技术人员来说,回顾本说明书将使得许多本发明的变型变得显而易见。本发明的全部范围应该通过同时参考下面的权利要求书结合其相等物的全部范围以及具有这种变型的说明书来确定。

[0067] 引用的出版物

[0068] 下面的出版物可以有助于理解或实施本发明的实施方式。每一引用的出版物均通过引用其整体被并入本文。

[0069] (1) Picuri, J. M.; Frezza, B. M.; Ghadiri, M. R. *J Am Chem Soc* 2009, *131*, 9368-77.

[0070] (2) Li, Q.; Luan, G.; Guo, Q.; Liang, J. *Nucleic Acids Res* 2002, *30*, E5.

[0071] (3) Zhang, D. Y.; Turberfield, A. J.; Yurke, B.; Winfree, E. *Science* 2007, *318*, 1121-5.

[0072] (4) Frezza, B. M.; Cockroft, S. L.; Ghadiri, M. R. *J Am Chem Soc* 2007, *129*, 14875-9.

[0073] (5) Voelcker, N. H.; Guckian, K. M.; Saghatelian, A.; Ghadiri, M. R. *Small* 2008, *4*, 427-31.

[0074] (6) Yashin, R.; Rudchenko, S.; Stojanovic, M. N. *J Am Chem Soc* 2007, *129*, 15581-4.

[0075] (7) Seelig, G.; Soloveichik, D.; Zhang, D. Y.; Winfree, E. *Science* 2006, *314*, 1585-8.

[0076] (8) Zhang, D. Y.; Winfree, E. *J Am Chem Soc* 2009, *131*, 17303-14.

[0077] (9) Biswas, I.; Yamamoto, A.; Hsieh, P. *J Mol Biol* 1998, *279*, 795-806.

[0078] (10) Panyutin, I. G.; Hsieh, P. *J Mol Biol* 1993, *230*, 413-24.

[0079] (11) Panyutin, I. G.; Hsieh, P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, *91*, 2021-5.

[0080] (12) Maugh, T. H., 2nd *Science* 1982, *217*, 719-720.

[0081] (13) Tajima, T.; Nakajima, A. *Journal of the American Chemical Society* 2008, *130*, 10496-7.

[0082] (14) Voit, B. *Angew Chem Int Ed Engl* 2006, *45*, 4238-40.

[0083] (15) Kahan, M.; Gil, B.; Adar, R.; Shapiro, E. *Physica D-Nonlinear Phenomena* 2008, *237*, 1165-1172.

[0084] (16) Nielsen, P. E.; Egholm, M. *Curr Issues Mol Biol* 1999, *1*, 89-104.

[0085] (17) Dragulescu-Andrasi, A.; Zhou, P.; He, G.; Ly, D. H. *Chem Commun (Camb)* 2005, 244-6.

[0086] (18) Sahu, B.; Chenna, V.; Lathrop, K. L.; Thomas, S. M.; Zon, G.; Livak, K. J.; Ly, D. H. *J Org Chem* 2009, *74*, 1509-16.

- [0087] (19) Zhou, P.; Wang, M.; Du, L.; Fisher, G. W.; Waggoner, A.; Ly, D. H. *J Am Chem Soc* 2003, *125*, 6878-9.
- [0088] (20) Dragulescu-Andrasi, A.; Rapireddy, S.; Frezza, B. M.; Gayathri, C.; Gil, R. R.; Ly, D. H. *J Am Chem Soc* 2006, *128*, 10258-67.
- [0089] (21) Freier, S. M.; Altmann, K. H. *Nucleic Acids Research* 1997, *25*, 4429-4443.
- [0090] (22) Braasch, D. A.; Corey, D. R. *Chemistry & Biology* 2001, *8*, 1-7.
- [0091] (23) Summerton, J.; Weller, D. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 1997, *7*, 187-195.
- [0092] (24) Ortega, J. A.; Blas, J. R.; Orozco, M.; Grandas, A.; Pedroso, E.; Robles, J. *Org Lett* 2007, *9*, 4503-6.
- [0093] (25) Kutuyavin, I. V.; Rhinehart, R. L.; Lukhtanov, E. A.; Gorn, V. V.; Meyer, R. B., Jr.; Gamper, H. B., Jr. *Biochemistry* 1996, *35*, 11170-6.
- [0094] (26) Lee, D.; Singha, K.; Jang, M. K.; Nah, J. W.; Park, I. K.; Kim, W. J. *Mol Biosyst* 2009, *5*, 391-6.
- [0095] (27) 美国专利号 7,538,202.
- [0096] (28) 美国专利申请公布号 2005/0112614.
- [0097] (29) 美国专利申请公布号 2007/0072215.
- [0098] (30) 美国专利申请公布号 2009/0191546.

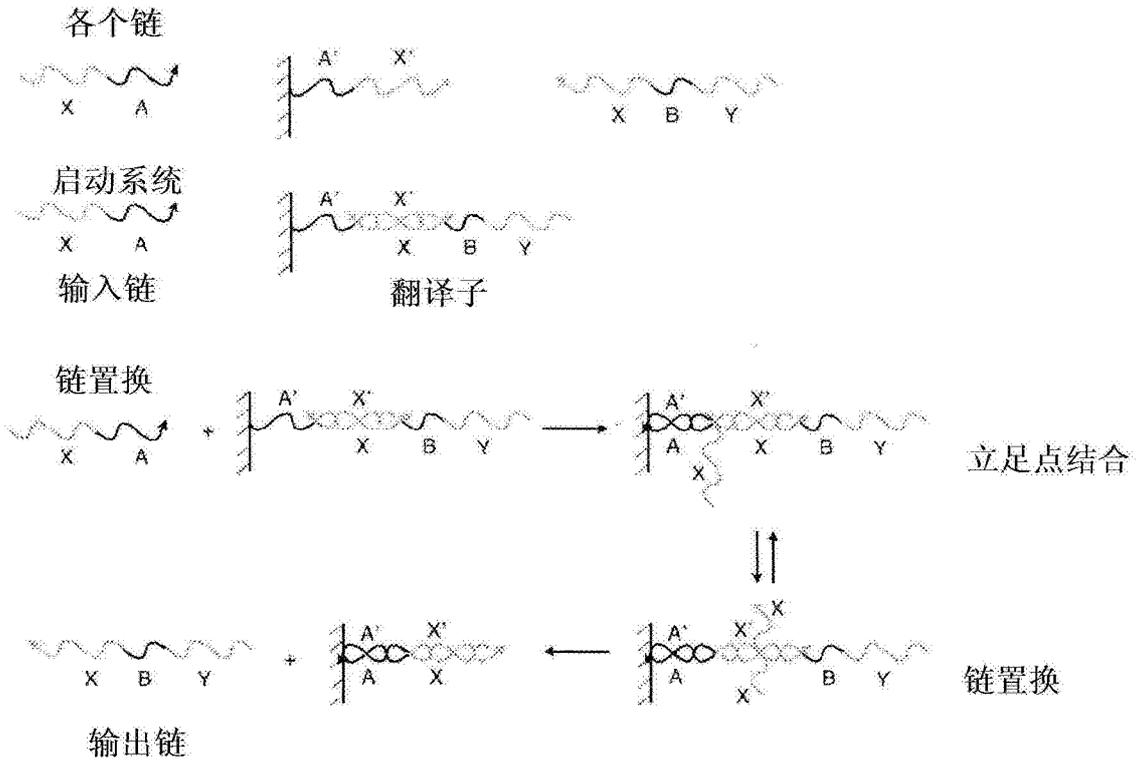


图 1A

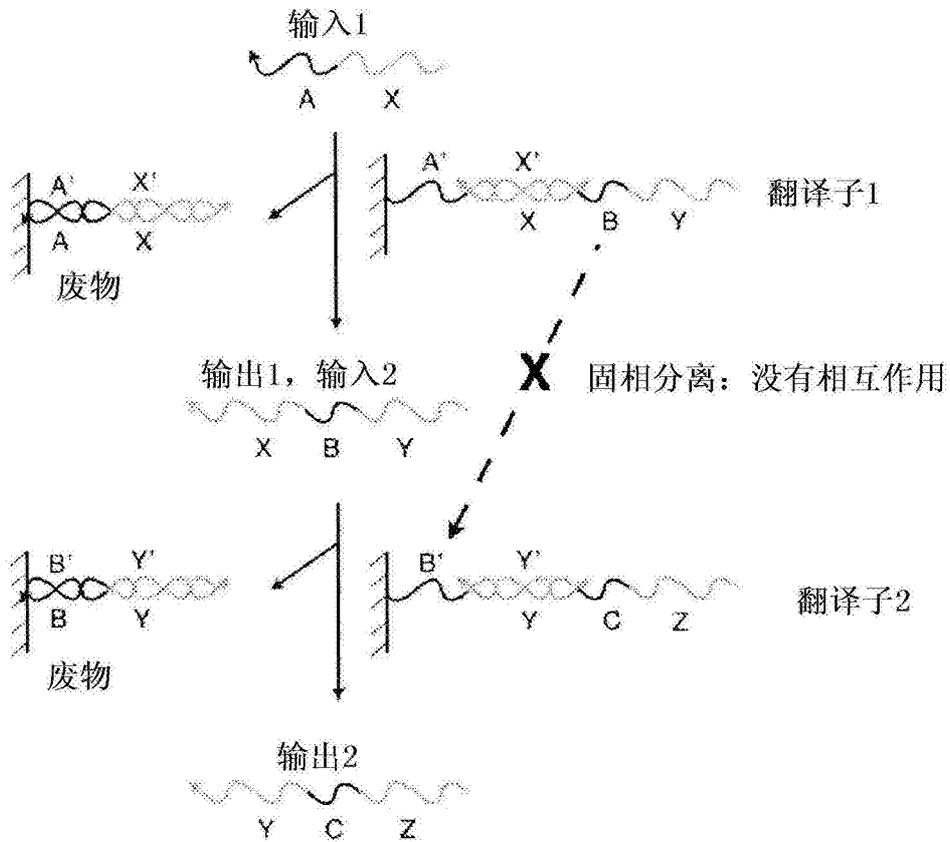


图 1B

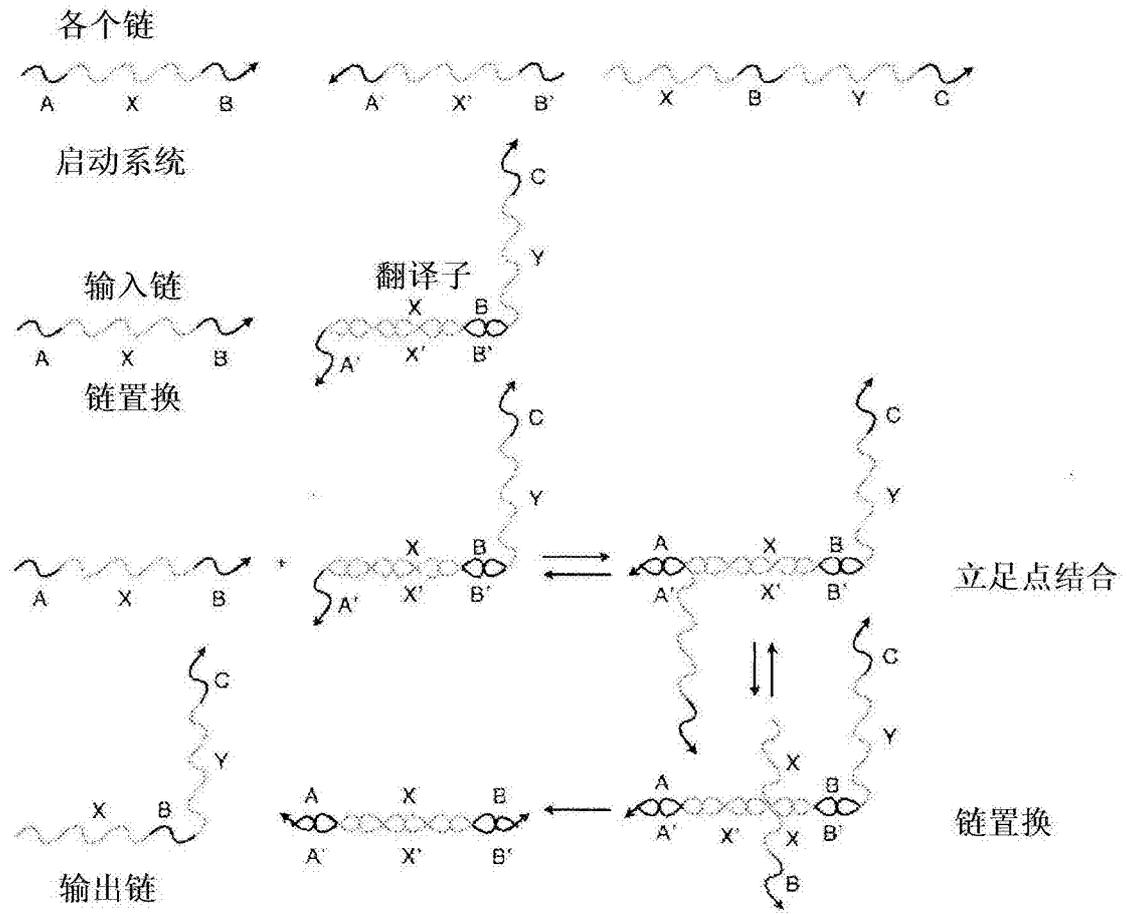


图 2A

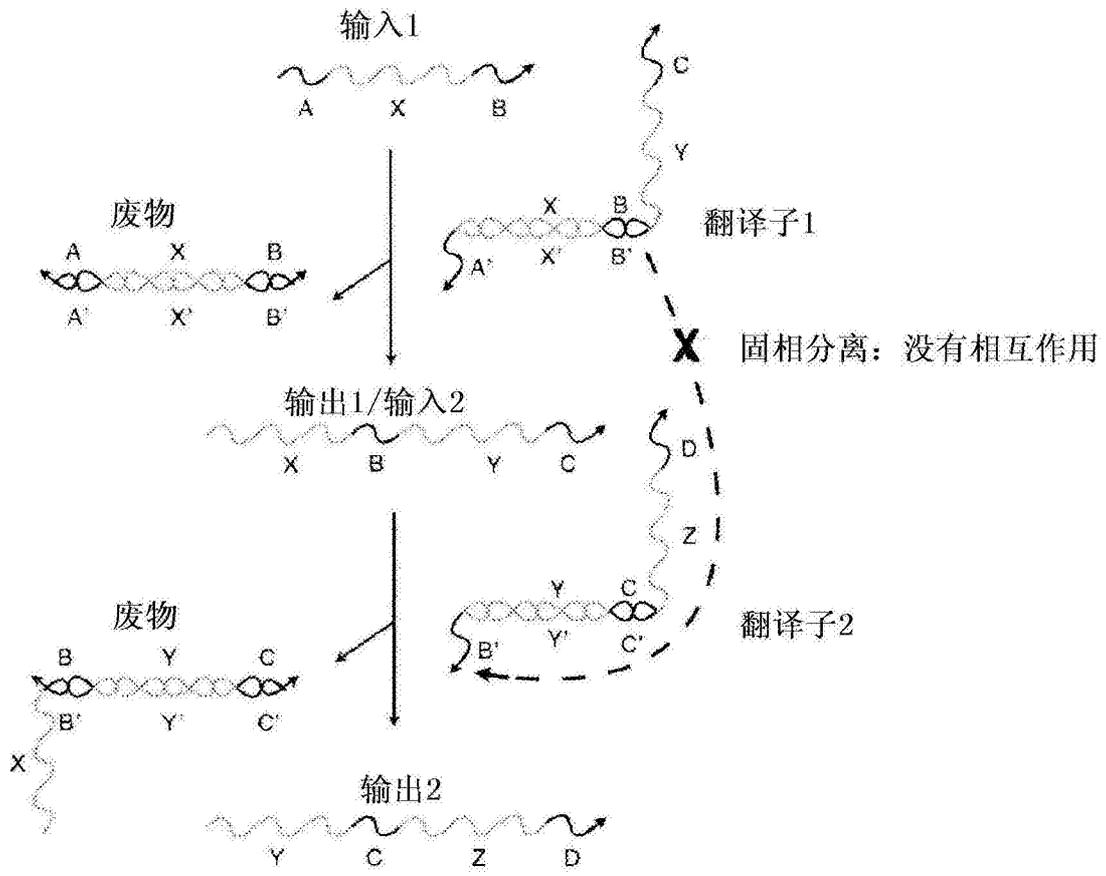


图 2B

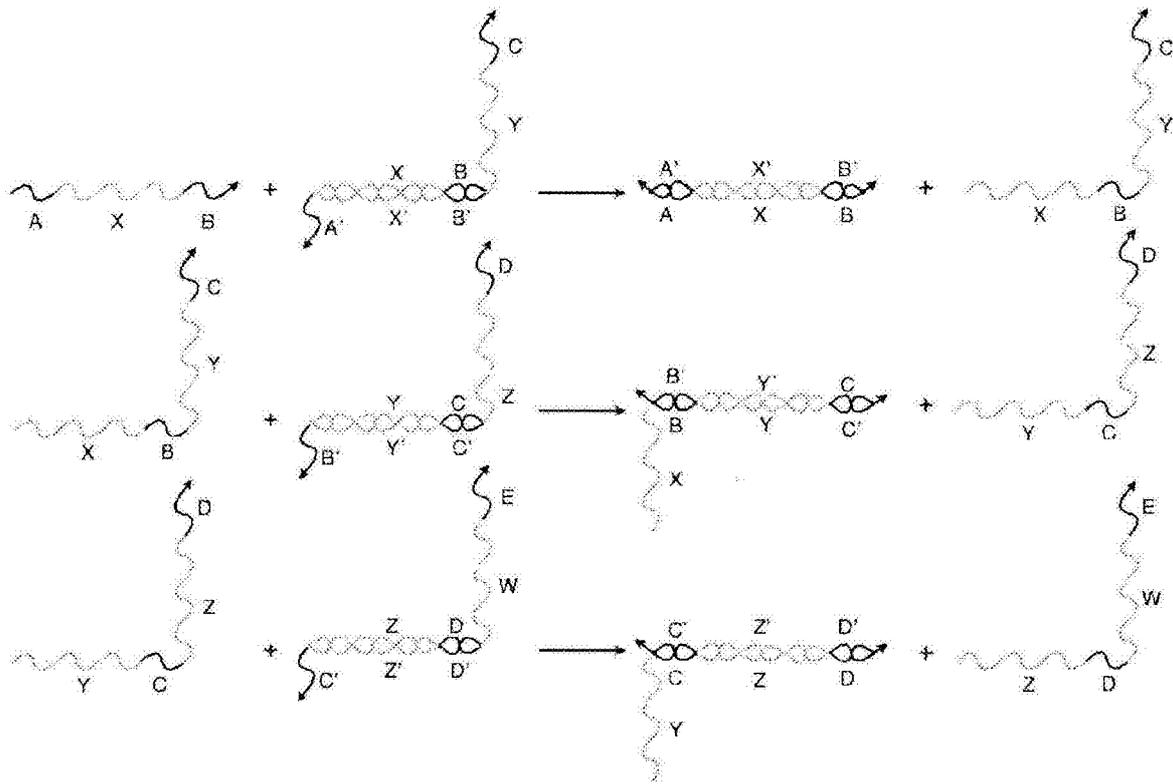


图 3A

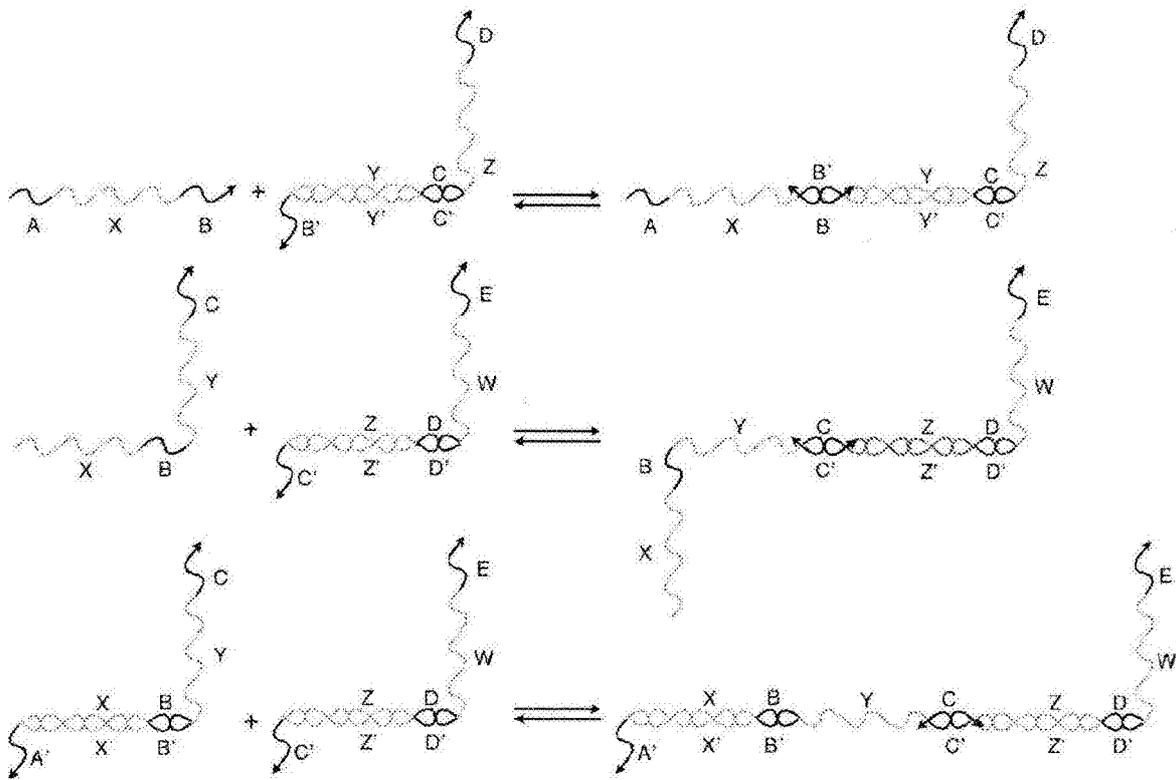


图 3B

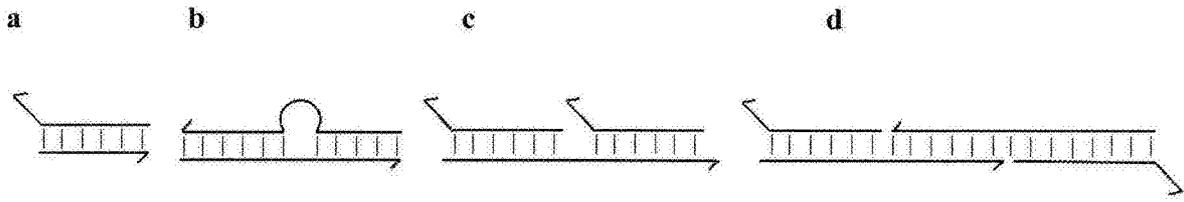


图 3C

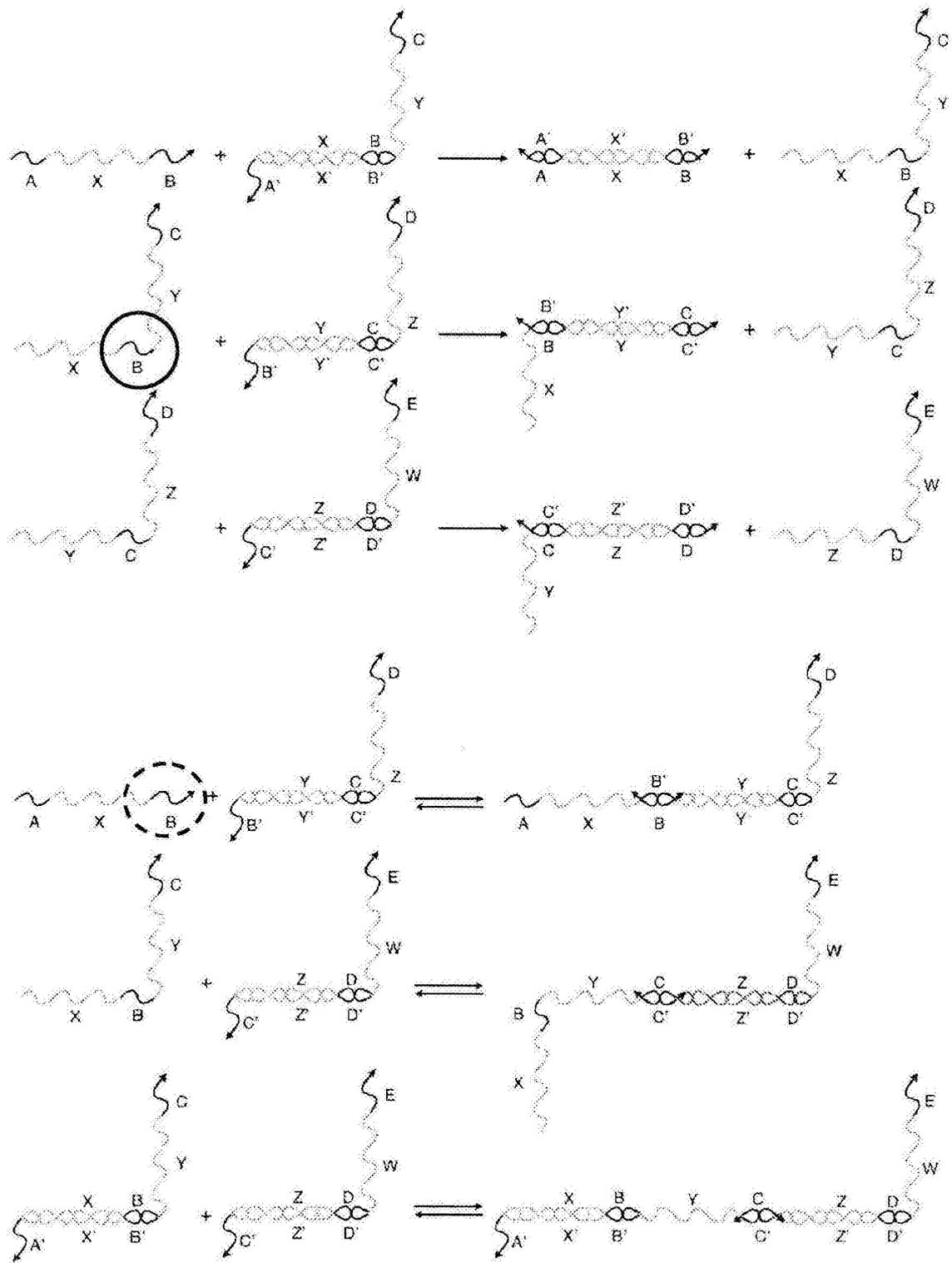


图 4

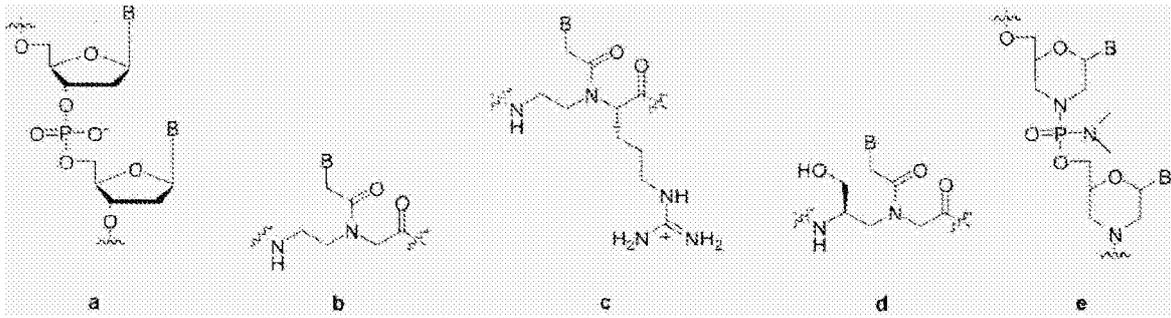


图 5

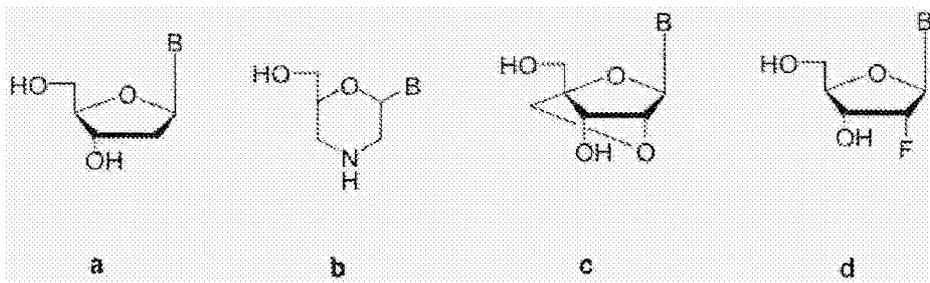


图 6

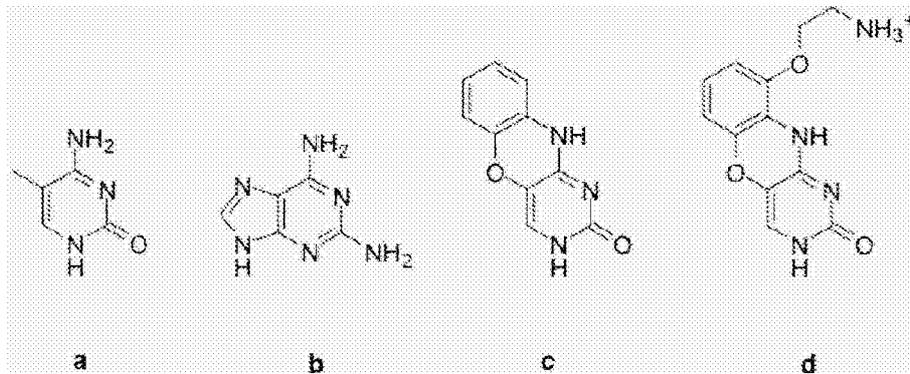


图 7

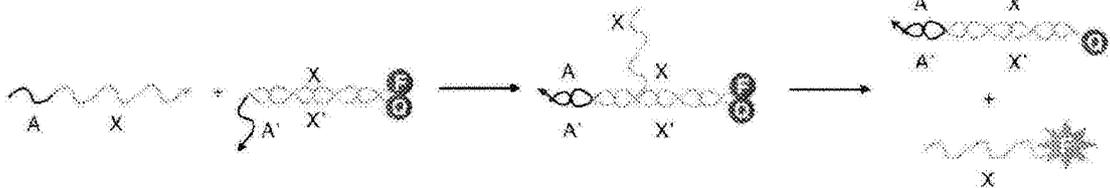


图 8