

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 952**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6823 (2008.01)

C12Q 1/6834 (2008.01)

C12Q 1/6825 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2020 PCT/GB2020/050809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2020 WO20193980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2020 E 20725731 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3947725**

54 Título: **Aparato, sistema y procedimiento**

30 Prioridad:

26.03.2019 GB 201904191

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

16.02.2024

73 Titular/es:

**NANOVERY LIMITED (100.0%)
The Biosphere, Draymans Way, Newcastle Helix
Newcastle upon Tyne NE4 5BX, GB**

72 Inventor/es:

**KOZYRA, JERZY y
LEE, MUN CHING**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 958 952 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

Aparato, sistema y procedimiento

5 La presente invención se refiere a una nanoestructura de ADN y a un procedimiento para producir una nanoestructura de ADN.

10 El ácido desoxirribonucleico tumoral circulante (ADNtc) es ADN que circula en el torrente sanguíneo y que es específico e indicativo de un tumor y su estado de progresión. Si bien esto puede brindar información valiosa sobre el estado de un tumor sin la carga de tomar una biopsia de un paciente, el ADNtc en una muestra de sangre plantea un problema de analito escaso en una muestra compleja. Las muestras de sangre también contienen ADN que no está asociado con tumores, el ADN libre de células (ADNlc), por lo que también es necesario distinguir el ADNtc de dicho ADNlc. Para detectar trazas de ADN con alta especificidad y alta sensibilidad se buscan nuevos enfoques.

15 Wang Hua-Feng et al, "A versatile label-free electrochemical biosensor for circulating tumor DNA based on dual enzyme assisted multiple amplification strategy", *Biosensors and Bioelectronics*, volumen 122, septiembre de 2018, páginas 224-230, describen un biosensor basado en una estrategia de amplificación múltiple asistida por enzima dual para la detección de ADN tumoral circulante (ADNtc). Luo Jie et al, "Enzyme-free amplified detection of circulating microRNA by making use of DNA circuits, a DNAzyme, and a catalytic hairpin assembly", *Mikrochimica Acta*, volumen 185, núm. 1, diciembre de 2017, páginas 1-6, describen un ensayo fluorométrico para la determinación de microARN-182 basado en el uso de circuitos de ADN y ADNzima. Hu Xiuxue et al, "Single-molecule catalytic hairpin assembly for rapid and direct quantification of circulating miRNA biomarkers", *Analytica Chimica Acta*, volumen 1042, agosto de 2018, páginas 109-115, describen un procedimiento para la cuantificación de miARN circulante en suero combinando un circuito de ADN dinámico y una detección de fluorescencia de molécula única. El documento WO 2010/019414 A2 describe procedimientos para detectar un ácido nucleico diana usando una cascada de amplificación enzimática de endonucleasas de restricción para detectar ácido nucleico. Evelyn M. Linardy et al, "EzyAmp signal amplification cascade enables isothermal detection of nucleic acid and protein targets", *Biosensors and Bioelectronics*, volumen 75, enero de 2016, páginas 59-66, describen una cascada de amplificación de señales isotérmicas denominada EzyAmp (amplificación de señales enzimáticas) utilizando una cascada de amplificación enzimática que implica endonucleasas de restricción. XIONG ERHU y otros, "An ultrasensitive electrochemical immunoassay based on a proximity hybridization-triggered three-layer cascade signal amplification strategy", *Analyst*, volumen 144, n.º 2, noviembre de 2018, páginas 634-640, describen una amplificación de señal en cascada de tres capas que involucra una enzima exonucleasa III en la primera capa, un conjunto de horquilla catalítica en la segunda capa y una amplificación en círculo rodante en la tercera capa.

20 Según un primer aspecto, se proporciona un conjunto de formaciones de ADN para detectar un biomarcador, tal como se define en las reivindicaciones.

25 Debido al conjunto de secuencias de ADN que forman una vía para la detección, el funcionamiento de la vía se puede diseñar y controlar con precisión. Mediante la combinación de la detección, amplificación y respuesta se puede permitir una detección muy sensible.

30 Preferiblemente, dos o más de las formaciones están unidas a un cuerpo común. Al colocar de este modo las formaciones, se puede permitir una interacción eficiente entre las formaciones. Preferiblemente, el detector, al menos parte del amplificador y el respondedor están unidos al cuerpo común. Las formaciones pueden estar unidas a un cuerpo común mediante un enlace o un ancla. El enlace puede adaptarse para permitir que diferentes formaciones de ADN se acerquen entre sí. De manera alternativa, las formaciones de ADN pueden estar unidas al cuerpo común en una parte de anclaje de la formación de ADN.

35 Por versatilidad y para permitir un diseño y ensamblaje precisos, el cuerpo común puede ser una formación de ADN. Por simplicidad, el cuerpo común puede ser una nanopartícula. Para la integración con características macroscópicas adicionales, el cuerpo común puede ser un sustrato. Para controlar las interacciones, dos o más formaciones pueden unirse al cuerpo común en una disposición predeterminada. Por ejemplo, se puede colocar un amplificador entre un detector y un respondedor.

40 El detector puede adaptarse para aceptar una secuencia de ADN diana y, de ese modo, liberar una secuencia de ADN activadora ("trigger"). La detección de una secuencia de ADN diana como biomarcador puede permitir una detección muy selectiva y proporcionar una alta especificidad. La secuencia de ADN diana puede ser ADN tumoral circulante. El detector puede adaptarse para aceptar una secuencia de ARN diana (preferiblemente, ARN tumoral circulante) y, de ese modo, liberar una secuencia de ADN activadora. El detector puede adaptarse para aceptar una proteína diana (preferiblemente, una proteína tumoral circulante) y, de ese modo, liberar una secuencia de ADN activadora.

45 Para una mayor especificidad, el detector puede adaptarse para la hibridación con una pluralidad de biomarcadores y, de este modo, para liberar una o más secuencias de ADN activadoras.

50

Preferiblemente, el detector comprende una o más secuencias de ADN sonda unidas (preferiblemente, en una disposición predeterminada, opcionalmente mediante un enlace) a un cuerpo de ADN y adaptadas para hibridarse con una secuencia de ADN diana y liberar una secuencia de ADN activadora.

5 La secuencia de ADN sonda puede configurarse para hibridarse con la secuencia de ADN diana y liberar la secuencia de ADN activadora mediante hibridación competitiva, preferiblemente mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o mediante intercambio de la región "toehold". Preferiblemente, la secuencia de ADN sonda se hibrida con la secuencia de ADN activadora y está adaptada para hibridar preferentemente con la secuencia de ADN diana y, de ese modo, liberar la secuencia de ADN activadora.

10 Para una mayor especificidad y menos falsos positivos, el conjunto de formaciones de ADN puede comprender, además, un bloqueador adaptado para hibridar una secuencia de ADN de interferencia y, opcionalmente, liberar de ese modo una secuencia de ADN de no interacción. La secuencia de ADN de interferencia es preferiblemente ADN libre de células. El bloqueador puede ser una secuencia de ADN bloqueadora configurada para hibridarse con la secuencia de ADN de interferencia y opcionalmente liberar la secuencia de ADN de no interacción mediante hibridación competitiva, preferiblemente mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o mediante intercambio de la región "toehold".

15 Preferiblemente, el amplificador comprende una pluralidad de subunidades del amplificador, estando cada subunidad del amplificador adaptada para hibridar una secuencia de ADN activadora y para liberar una secuencia de ADN llave ("key") y la secuencia de ADN activadora o una secuencia de ADN activadora adicional. La secuencia de ADN activadora adicional tiene preferiblemente la misma secuencia de ADN que la secuencia de ADN activadora. La pluralidad de subunidades del amplificador son preferiblemente funcionalmente idénticas entre sí y preferiblemente liberan copias de la misma secuencia llave de ADN. Se puede adaptar una pluralidad de primeras subunidades del amplificador para liberar primeras secuencias de ADN llave y se puede adaptar una pluralidad de segundas subunidades del amplificador para liberar segundas secuencias de ADN llave.

20 El amplificador puede comprender uno o más casos de una o más secuencias de ADN amplificadoras (de manera opcional ancladas a un cuerpo común, preferiblemente un cuerpo de ADN, preferiblemente en una disposición predeterminada, de manera opcional mediante un enlace) adaptadas para hibridarse con una secuencia de ADN activadora; y uno o más casos de una secuencia de ADN portadora de llave ("key holder") (de manera opcional anclada a un cuerpo común, preferiblemente un cuerpo de ADN, preferiblemente en una disposición predeterminada, de manera opcional mediante un enlace) adaptada para liberar una secuencia de ADN llave.

25 Se puede adaptar una primera secuencia de ADN amplificadora para cambiar la conformación tras la hibridación con la secuencia de ADN activadora. Se puede adaptar una segunda secuencia de ADN amplificadora para cambiar su conformación tras la hibridación con la primera secuencia de ADN y, de ese modo, liberar la secuencia de ADN activadora. La primera secuencia de ADN amplificadora puede configurarse para hibridarse con la segunda secuencia de ADN amplificadora y liberar la secuencia de ADN activadora mediante hibridación competitiva (preferiblemente mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o mediante intercambio de la región "toehold") y/o uno o más cambios de conformación (preferiblemente mediante un cambio de conformación de la primera secuencia de ADN amplificadora y un cambio de conformación de la segunda secuencia de ADN amplificadora).

30 La secuencia de ADN portadora de llave puede hibridarse con la secuencia de ADN llave. La secuencia de ADN portadora de llave puede adaptarse para hibridarse preferentemente con la secuencia de ADN amplificadora o una parte de la misma y, de este modo, liberar la secuencia de ADN llave, preferiblemente mediante hibridación competitiva (preferiblemente mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o mediante intercambio de la región "toehold") y/o cambio de conformación (preferiblemente mediante un cambio de conformación de una o más de las secuencias de ADN amplificadoras).

35 Para una robustez y evitar falsos positivos, el amplificador puede comprender una pluralidad de vías de amplificación para la liberación de diferentes especies de secuencias de ADN llave. Se puede adaptar una pluralidad de primeras subunidades del amplificador para liberar primeras secuencias de ADN llave y se puede adaptar una pluralidad de segundas subunidades del amplificador para liberar segundas secuencias de ADN llave. Para una amplificación elevada mediante un bucle de alimentación directa, la pluralidad de vías de amplificación puede adaptarse para amplificarse entre sí.

40 Preferiblemente, el respondedor comprende una formación de captura de ADN adaptada al menos parcialmente para encerrar a un reportero en una primera configuración, y para liberar el reportero en una segunda configuración. Esto puede permitir la liberación condicional.

45 Para facilitar la producción de una señal detectable por un observador, el reportero puede ser un gen reportero con una parte promotora, y la formación de captura de ADN puede adaptarse al menos parcialmente para encerrar la parte promotora en la primera configuración.

65

5 La formación de captura de ADN puede adaptarse para cambiar de la primera configuración a la segunda configuración tras la hibridación de al menos una secuencia de ADN llave con al menos una parte de secuencia de ADN de bloqueo de la formación de captura de ADN. La secuencia de ADN de bloqueo puede configurarse para hibridarse con la secuencia de ADN llave mediante hibridación competitiva (preferiblemente mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o mediante intercambio de la región "toehold").

10 Según otro aspecto, se da a conocer un procedimiento para detectar un biomarcador diana que comprende introducir un conjunto de formaciones de ADN, según cualquier reivindicación anterior, en una muestra de fluido corporal, preferiblemente sangre, preferiblemente in vitro.

15 Según otro aspecto, se da a conocer un procedimiento para detectar un biomarcador diana, tal como se define en las reivindicaciones.

20 La hibridación de la secuencia de ADN activadora con una secuencia de ADN amplificadora y la provocación así de uno o más cambios conformacionales de la secuencia de ADN amplificadora, la liberación de una secuencia de ADN llave y la liberación de la secuencia o una secuencia de ADN activadora puede realizarse por medio de una segunda cadena de ADN amplificadora adaptada para la hibridación con la secuencia de ADN amplificadora. La hibridación de la secuencia de ADN llave con una parte de secuencia de ADN de bloqueo de una formación de captura de ADN y, por lo tanto, la provocación para que se produzca una señal detectable para un observador puede ser cambiando la configuración de la formación de captura de ADN para liberar un reportero.

25 La secuencia de ADN amplificadora puede comprender uno o más casos de una o más secuencias de ADN amplificadoras adaptadas para hibridarse con una secuencia de ADN activadora; y uno o más casos de una secuencia de ADN portadora de llave adaptada para liberar una secuencia de ADN llave.

30 La sonda, la secuencia de ADN amplificadora y/o la formación de captura de ADN pueden ser como se mencionó anteriormente. El procedimiento puede utilizar un conjunto de formaciones de ADN, tal como se mencionó anteriormente.

35 La sonda, la secuencia de ADN amplificadora y/o la formación de captura de ADN pueden colocarse en un cuerpo común, preferiblemente una estructura de ADN.

40 El procedimiento puede comprender, además, introducir la estructura del ADN en una muestra de fluido corporal, preferiblemente sangre, preferiblemente in vitro.

45 Según otro aspecto, se da a conocer un producto de programa informático que comprende un código de software adaptado para generar, cuando se ejecuta, una simulación del conjunto de formaciones de ADN, tal como se ha mencionado anteriormente.

50 Según otro aspecto, se da a conocer un procedimiento para producir un conjunto de formaciones de ADN, tal como se ha mencionado anteriormente, que comprende simular el conjunto de formaciones de ADN; determinar, basándose en la simulación, secuencias de ADN para las formaciones de ADN; y producir el conjunto de formaciones de ADN a partir de las secuencias de ADN así determinadas.

55 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "secuencia de ADN" y "cadena de ADN" son preferiblemente intercambiables y preferiblemente se refieren a una cadena de ADN que tiene una secuencia determinada.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amplificación" se refiere preferiblemente a un proceso en el que la entrada de un número de casos de una especie de entrada da como resultado la liberación de una mayor cantidad de casos de una especie de salida. Un "amplificador" se refiere preferiblemente a una unidad funcional adaptada para aceptar un conjuntos de casos de una especie de entrada y, como resultado de ello, liberar un mayor conjunto de casos de una especie de salida.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "conjunto de formaciones de ADN" se refiere preferiblemente a una pluralidad de formaciones de ADN en una solución común, unidas a un sustrato común o unidas a un cuerpo común. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "formación de ADN" se refiere preferiblemente a una cadena de ADN, que tiene preferiblemente una secuencia específica y/o forma una estructura específica. Dicha cadena de ADN puede hibridarse con o sin otra cadena de ADN. Dicha cadena de ADN puede estar en una de las diferentes conformaciones posibles.

Según otro aspecto, se proporciona un programa informático y un producto de programa informático para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y/o para incorporar cualquiera de las características del aparato descritas en el presente documento. Según otro aspecto, se da a conocer un medio no transitorio legible por ordenador que tiene almacenado en el mismo un programa para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y/o para incorporar cualquiera de las características del aparato

5 descritas en el presente documento. Según otro aspecto, se da a conocer un producto de programa informático que comprende un código de software para llevar a cabo cualquier procedimiento, tal como se describe en el presente documento. Las características implementadas en el hardware generalmente pueden implementarse en software y viceversa. Cualquier referencia a las características de software y hardware en el presente documento debe interpretarse en consecuencia.

10 La presente invención también da a conocer una señal que incorpora un programa informático para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y/o para incorporar cualquiera de las características del aparato descritas en el presente documento, un procedimiento para transmitir dicha señal y un producto informático que tiene un sistema operativo que soporta un programa de ordenador para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento y/o para incorporar cualquiera de las características del aparato descritas en el presente documento.

15 Tal como se usa en el presente documento, las características de medio más función pueden expresarse alternativamente en términos de su estructura correspondiente, tal como un procesador adecuadamente programado y una memoria asociada.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes a partir de las siguientes realizaciones de ejemplo que se describen con referencia a las siguientes figuras en las que:

- 20 La Figura 1 es un esquema de un nanodispositivo de ADN;
- Las Figuras 2a-c son diagramas de una parte detectora de un nanodispositivo de ADN en diferentes estados;
- Las Figuras 3a-d son diagramas de una parte amplificadora de un nanodispositivo de ADN en diferentes estados;
- Las Figuras 4a y 4b son diagramas de una parte de respuesta de un nanodispositivo de ADN en diferentes estados;
- 25 Las Figuras 5a-d son diagramas de una parte amplificadora alternativa de un nanodispositivo de ADN en diferentes estados;
- La Figura 6 es un diagrama de otra parte amplificadora alternativa de un nanodispositivo de ADN;
- La Figura 7 es un diagrama de un nanodispositivo de ADN con una parte de bloqueo;
- La Figura 8 es un diagrama de una parte de bloqueo de un nanodispositivo de ADN; y
- 30 La Figura 9 ilustra un ejemplo de un procedimiento para generar un nanodispositivo de ADN.

La Figura 1 muestra un nanodispositivo de ADN 2 (también denominado nanorobot). El nanodispositivo de ADN 2 está diseñado para permitir la detección temprana del cáncer utilizando una muestra de sangre. El nanodispositivo de ADN es lo suficientemente sensible como para distinguir entre el ADN tumoral circulante (ADN_{tc}) 18 y el ADN libre de células (ADN_{lc}), ambos presentes en la sangre; el fragmento diana de ADN_{tc} 18 puede simplemente portar una única mutación puntual 19 en comparación con el ADN_{lc}. Cuando se detecta ADN_{tc}, el nanodispositivo de ADN genera una señal que es observable para el usuario (por ejemplo, una señal fluorescente), proporcionando así una respuesta rápida al médico para el diagnóstico. Dado que el nanodispositivo de ADN identifica mutaciones genéticas específicas que se originan en las células tumorales, puede proporcionar información sobre el tipo y el estadio de la enfermedad.

40 El nanodispositivo de ADN 2 está formado por oligonucleótidos (moléculas de ADN cortas y monocatenarias) mediante un proceso de autoensamblaje, tal como es bien conocido en el campo.

45 El nanodispositivo de ADN 2 incluye un conjunto de formaciones de ADN funcionales que están ancladas a una estructura de ADN común más grande, en el ejemplo ilustrado un cuerpo rectangular 3. Las formaciones de ADN funcionales pueden tener de longitud entre 10 y 90 pares de bases en algunos ejemplos, pero también pueden ser más largos (o más cortos), por ejemplo, 100 pares de bases de largo, 250 pares de bases de largo, 300 pares de bases de largo, 400 pares de bases de largo o más.

50 En las ilustraciones, las cadenas de ADN que forman formaciones de ADN funcionales se indican mediante líneas, con los extremos 3' de las cadenas de ADN indicados con ganchos, y los puntos de anclaje de las formaciones de ADN al cuerpo 3 se indican con un símbolo, tal como se indica en la leyenda de la Figura 1. La posición de una mutación puntual en la cadena de ADN_{cf} diana se indica con un símbolo, tal como se indica en la leyenda de la Figura 1. En las figuras que ilustran las cadenas de ADN con más detalle, los grupos de bases de ADN, también denominados dominios, se representan como letras minúsculas, tales como a, b, c, etc. Las letras con asterisco indican dominios complementarios; por ejemplo, el dominio a* es complementario del dominio a. La hibridación de dominios complementarios se indica en la ilustración mediante una serie de líneas de conexión entre los dominios complementarios. Los dominios son una construcción que ayuda a comprender el comportamiento y la interacción de las cadenas de ADN. Se puede proporcionar la secuencia de bases de ADN en un dominio (por ejemplo, para una diana específica) o se puede seleccionar para diseñar el comportamiento de una cadena de ADN (por ejemplo, propensión a formar un bucle en horquilla). En un ejemplo, un dominio puede tener una longitud entre 5 y 50 pares de bases, por ejemplo 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 25 pares de bases, 30 pares de bases o 40 pares de bases. Diferentes dominios en la misma cadena pueden tener diferentes longitudes.

55 Se puede utilizar una amplia variedad de formas bidimensionales y tridimensionales para el cuerpo 3 del nanodispositivo 2, por ejemplo una forma tubular, una forma irregular o, tal como se ilustra, una lámina de ADN. El nanodispositivo de ADN 2 incluye una serie de formaciones funcionales que están diseñadas para interactuar con

- el entorno (incluida la muestra) y entre sí. Las formaciones funcionales están ancladas al cuerpo 3 en posiciones adecuadas. Esto puede permitir la colocación de características funcionales destinadas a interactuar entre sí y facilitar su interacción. El ADN es un material particularmente ventajoso para el cuerpo 3, ya que puede permitir un anclaje altamente controlable de características funcionales en posiciones específicas relativas entre sí. Las formaciones funcionales incluyen partes que pueden liberarse, intercambiarse o aceptar otras partes. Esto puede permitir la interacción de características funcionales con el entorno y entre sí. En virtud de la colocación y la capacidad de incorporar formaciones que realizan diferentes funciones, los eventos moleculares que dan como resultado una señal observable pueden diseñarse para optimizar el rendimiento del nanodispositivo de ADN 2.
- 5
- 10 El nanodispositivo de ADN 2 ilustrado en la Figura 1 incluye tres partes o módulos funcionales:
 - detector 4,
 - amplificador 6 y
 - respondedor 8.
- 15 Cada módulo realiza una función específica y al interactuar realizan la detección y señalización prevista.
- Las formaciones funcionales de ADN interactúan según los principios de la hibridación competitiva para aceptarse y liberarse entre sí de forma espontánea, de forma destacada mediante desplazamiento de cadenas mediado por la región "toehold" e intercambio de la región "toehold". Algunas de las formaciones funcionales de ADN incluyen partes con configuraciones biestables y pueden cambiar de configuración en respuesta a interacciones entre sí (esto también se conoce como lógica molecular).
- 20
- El módulo detector 4 y el módulo amplificador 6 se basan en principios de computación del ADN, tales como desplazamiento de cadenas mediado por la región "toehold", intercambio de la región "toehold" y puertas lógicas moleculares (moléculas que realizan una operación lógica basada en una o más entradas físicas o químicas y una salida única).
- 25
- El respondedor 8 se basa en principios dinámicos de nanotecnología del ADN (origami de ADN) y en un sistema de expresión libre de células para producir una señal fluorescente.
- 30
- Los módulos individuales y sus interacciones se describen ahora con más detalle.
- Las figuras 2a a 2c muestran el detector 4 con más detalle en diferentes estados de funcionamiento. Las Figuras 2a y 2b muestran un detector 4 antes y después de la exposición a una diana T, y la Figura 2c muestra las cadenas de ADN del detector 4 con más detalle.
- 35
- El detector 4 comprende una cadena de ADN que actúa como sonda P. La sonda P está anclada al cuerpo 3 del nanodispositivo de ADN 2 en un punto de anclaje 12 (las ilustraciones generalmente muestran puntos de anclaje con un símbolo tal como se indica en la leyenda de la Figura 1). La sonda P en la Figura 2a se muestra antes de la exposición a la diana T (la secuencia de ADN_{Tc} que se va a detectar). En la configuración inicial, una cadena de salida O, también denominada cadena o secuencia de ADN "activadora", se hibrida (parcialmente) con la cadena sonda P.
- 40
- En la Figura 2b, la diana T ha desplazado la salida O mediante un desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold". La diana T se hibrida con la sonda P y se libera la salida O.
- 45
- AL utilizarse, la cadena de ADN diana T se une a la región "toehold" de la sonda P y vence por competición a la cadena de salida O para desplazarla de la sonda P.
- 50
- La sonda P y la salida O están diseñadas de manera que la sonda P pueda distinguir entre el ADN_{Tc} de T diana (que porta mutaciones cancerosas) y el ADN_{Nc}. La sonda P es complementaria a la diana T, mientras que la salida O tiene mayor afinidad por la sonda que el ADN_{Nc}, pero tiene una menor complementariedad que la diana T.
- La salida O activa el módulo en dirección 3', el amplificador 6.
- 55
- Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d muestran una subunidad de un amplificador 6 con más detalle en diferentes estados de funcionamiento.
- La subunidad del amplificador 6 ilustrada incluye tres cadenas de ADN: dos cadenas que actúan como amplificadores A1 y A2 y una tercera cadena que actúa como porta llaves ("key holder") H. Tanto los amplificadores A1, A2 como el porta llaves H están unidos al cuerpo del nanodispositivo de ADN 2 mediante enlaces 13 que están unidos al cuerpo 3 en puntos de anclaje 12.
- 60
- En la Figura 3a, la subunidad del amplificador 6 se muestra en su configuración inicial antes de la exposición a la salida O. En la configuración inicial, una cadena de ADN llave K se hibrida con el portador de llave H. Las dos cadenas amplificadoras A1, A2 incluyen cada una una puerta lógica molecular; es decir, cada una tiene una configuración metaestable en bucle e nhorquilla que se puede abrir o cerrar dependiendo de las circunstancias.
- 65

- En la Figura 3b se muestra la subunidad del amplificador 6 después de la exposición a la salida O (del módulo detector 4). La cadena de activación O facilita el cambio conformacional de la puerta lógica de la primera cadena amplificadora A1, es decir, O se hibrida con A1, cambiando así la configuración (abriendo el bucle en horquilla) de A1.
- En la Figura 3c se muestra la subunidad del amplificador 6 en una etapa adicional del procedimiento de amplificación. La parte expuesta de A1, a continuación, se hibrida con A2, durante lo cual, el bucle en horquilla de A2 se abre y A2 desplaza a O. Posteriormente o al mismo tiempo, H se hibrida con A1 y de este modo K se libera.
- La Figura 3d muestra la subunidad del amplificador 6 donde la segunda cadena amplificadora A2 y la cadena portadora de llave H están ambas hibridadas con la primera cadena amplificadora A1, y la llave K y la cadena activadora O se han liberado.
- Como resultado del funcionamiento de la subunidad del amplificador 6, se liberan dos cadenas: una única cadena llave K y la cadena de activación original O. La cadena de activación O se recicla, a continuación, a otra subunidad del amplificador 6 similar. La salida O liberada continúa hacia una subunidad de amplificador adicional en la condición inicial, tal como se muestra en la Figura 3a y mediante la secuencia análoga de etapas en esa subunidad se libera una llave adicional K 28, así como la cadena de salida O.
- Las llaves K activan el módulo en dirección 3', el respondedor 8.
- De forma catalítica, se puede reutilizar una única entrada O para liberar múltiples cadenas llave K de múltiples subunidades del amplificador. Cada subunidad del amplificador 6 toma una salida O y emite una llave K, así como una salida O para consumo posterior. En el ejemplo ilustrado en la Figura 1 se muestran tres subunidades del amplificador 6 (cada una de las cuales comprende dos cadenas de amplificador y un portador de llaves), pero se puede incluir cualquier número de subunidades en el amplificador 6. El número de subunidades del amplificador se puede variar para variar la amplificación deseada, es decir, el número de cadenas de llave liberadas para cada cadena activadora (salida O del detector). Mediante la inclusión de n subunidades del amplificador, se liberan n llaves K. Una única cadena de salida inicial O se amplifica a n cadenas llave K. Esto permite la detección de bajas concentraciones del ADNtc diana mediante la disposición de una respuesta amplificada en forma de n cadenas llave K para una única cadena diana T.
- Se pueden usar otros procesos de amplificación específicos (generalmente conocidos como amplificación en cascada de ADN en horquilla) para producir múltiples cadenas llave de forma catalítica a partir de una única cadena activadora (cadena de salida O del detector).
- Las figuras 4a y 4b muestran un respondedor 8 con más detalle en diferentes estados de funcionamiento. La Figura 4a muestra un respondedor 8 antes de la exposición a una llave K.
- En la configuración inicial mostrada en la Figura 4a, el respondedor ilustrado 8 incluye una caja de captura C y un gen reportero R capturado por la caja de captura C.
- La caja de captura C incluye una cantidad de cadenas de ADN que pueden formar un recinto que restringe el gen reportero R y evita la exposición de la parte encerrada. La parte encerrada del gen reportero es una secuencia promotora, por lo que se evita la expresión del gen reportero hasta el momento en que el gen reportero R se libera de la caja de captura C y la parte promotora queda expuesta. El gen reportero R codifica una proteína fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente, que puede producirse mediante la expresión de proteínas libres de células, tal como se conoce en la técnica.
- La caja de captura C es una formación de ADN biestable con una configuración cerrada y abierta. El respondedor 8 incluye una cadena de ADN de bloqueo L. La hibridación de una cadena llave K con la cadena de bloqueo L hace que la caja de captura C experimente un cambio de la configuración cerrada a la configuración abierta.
- En la Figura 4b, la cadena llave K está hibridada con la cadena de bloqueo L, la caja de captura C está en la configuración abierta y el gen reportero R está liberado.
- Se expresa el gen reportero liberado y la fluorescencia de la proteína expresada puede indicar a un observador la presencia del ADNtc diana en la muestra.
- El respondedor puede incluir un conjunto de casos de la caja de captura C, cada una con el gen reportero R. Cada caja de captura C puede abrirse mediante una de las secuencias llave K y producir así una señal fluorescente observable para una cantidad traza de analito.
- Las figuras 5a a 5d ilustran otra subunidad del amplificador 6 donde cada subunidad de amplificación incluye una cadena amplificadora A y una cadena portadora de llave H, ambas ancladas al cuerpo de ADN 3 en los puntos de

anclaje 12. Las figuras 5a-5c muestran la subunidad del amplificador 6 en diferentes estados de funcionamiento, y la Figura 5d muestra las cadenas de ADN de la subunidad del amplificador 6 con más detalle.

5 La Figura 5a muestra la configuración inicial en la que dos cadenas de ADN se hibridan (parcialmente) con el amplificador A: una copia adicional de la cadena de salida O y una cadena de ADN intermedia I. En el ejemplo ilustrado, la cadena de salida O está en una configuración metaestable de bucle en horquilla.

10 En la Figura 5b, la salida O se ha hibridado con el amplificador A mediante un desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold". La salida O se une a la región "toehold" del amplificador A y vence por competición al intermedio I para desplazarlo del amplificador A. Se libera el híbrido {intermedio I + salida O}.

En la Figura 5c, el intermedio I se ha hibridado con el portador de llave H mediante desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold". Se libera la salida O, al igual que la llave K.

15 En la siguiente etapa, la salida O liberada continúa a una subunidad de un amplificador adicional en la condición inicial, tal como se muestra en la Figura 4a, y la cadena de salida O se hibrida con un amplificador adicional A, desplazando así un híbrido {intermedio I + salida O} adicional y mediante la secuencia análoga de etapas se libera una llave adicional K.

20 La Figura 6 muestra una variante de la subunidad del amplificador, tal como se describió anteriormente con referencia a las Figuras 3a a 3d. En esta variante, el respondedor requiere dos llaves, K1, K2 para operar (es decir, cambiar la configuración de cerrado a abierto para liberar al reportero). El amplificador incluye dos vías: una vía derecha y una vía izquierda (correspondiente al ADN_{tc} inicial que se detecta); para cada vía una sonda PR, PL proporciona el activador apropiado OR, OL. Debido a que el respondedor requiere dos llaves en este ejemplo, se puede habilitar una alta estabilidad del respondedor en la configuración inicial y se puede evitar la activación espontánea del respondedor, lo que permite una tasa baja de falsos positivos. En una variante relacionada, una única sonda P lleva dos activadores, OR y OL, y ambos se liberan tras la hibridación de la diana T con la sonda P.

30 En una variante adicional, ambas vías (derecha e izquierda) están adaptadas para amplificarse entre sí, creando un bucle de retroalimentación. En este caso, la detección de una única molécula de ADN_{tc} diana puede provocar una reacción en cadena, con el efecto de una alta sensibilidad y un tiempo de respuesta del nanodispositivo de ADN muy corto.

35 La Figura 7 muestra una variante del nanodispositivo de ADN descrito anteriormente. Un nanodispositivo de ADN 50 incluye el detector 4, el módulo amplificador 6 y el respondedor 8, tal como se describió anteriormente. Además, el nanodispositivo de ADN 50 incluye una parte (o módulo) de bloqueo 40 para capturar el ADN_{cf} (presente de forma natural en la sangre) y liberar cadenas que son de no interacción con el resto del dispositivo. El módulo de bloqueo 40 incluye una serie de sondas de bloqueo B. Las sondas de bloqueo B son similares a las sondas P del detector 4 descrito anteriormente, excepto que se hibridan mejor con la cadena de ADN_{ic} de interferencia X, mientras que la sonda P se hibrida mejor con la cadena de ADN_{tc} diana T.

45 La Figura 8 muestra una sonda P, tal como se describió anteriormente con referencia al detector 8, y una sonda de bloqueo B con más detalle. La sonda de bloqueo B es una cadena de ADN que está anclada al cuerpo 3 del nanodispositivo de ADN 50 en un punto de anclaje. En la configuración inicial, una cadena de no interacción N se hibrida (parcialmente) con la sonda de bloqueo B. Una cadena de interferencia X, tal como una cadena de ADN_{ic}, se hibrida con la sonda de bloqueo B y desplaza una cadena de no interacción N mediante desplazamiento de cadenas mediado por la región "toehold". La cadena de no interacción N liberada de la sonda de bloqueo B no interacciona con el resto del nanodispositivo de ADN 50. Al capturar las cadenas de interferencia X, tales como ADN_{cf}, las sondas de bloqueo 40 pueden evitar que las cadenas de ADN X no dianas provoquen la liberación no deseada de secuencias de ADN activadoras O, y de este modo reduzcan o eviten la interferencia y aumenten la especificidad del detector.

50 La parte de bloqueo 40 puede incluir una cantidad de casos de la misma especie de sonda de bloqueo, tal como se ilustra en la Figura 7, o la parte de bloqueo 40 puede incluir una cantidad de especies diferentes de sonda de bloqueo (con una o más casos de cada especie de sonda de bloqueo).

55 En los ejemplos ilustrados anteriormente, las cadenas de ADN funcionales que participan en las hibridaciones diseñadas están ancladas directamente al cuerpo principal de ADN 3 en un punto de anclaje 12 (ilustrado por ejemplo en la Figura 2a), o están ancladas mediante un enlace 13 que conecta las cadenas de ADN funcionales al cuerpo principal 3 en un punto de anclaje 12 (tal como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 3a). En una variante, algunas cadenas de ADN funcionales están ancladas directamente, otras mediante un enlace. De manera opcional, algunas (o todas) las cadenas de ADN funcionales pueden proporcionarse sin enlaces (por ejemplo, la segunda cadena amplificadora A2 de una subunidad del amplificador), en una solución libre que rodea el nanodispositivo de ADN. El anclaje directo proporciona un buen control sobre la ubicación y colocación de diferentes especies de cadenas de ADN funcionales para facilitar su interacción. El enlace proporciona menos control sobre la ubicación, pero permite una mayor libertad de movimiento y cambio de conformación e interacción (hibridación) con otras cadenas de ADN funcionales, y puede proporcionar una mejor exposición de las cadenas de ADN funcionales. El suministro de la

5 solución libre puede requerir concentraciones relativamente altas para garantizar una disponibilidad suficiente. El enlace puede ser una secuencia de ADN que se selecciona para desalentar la interacción con otras partes del sistema y desalentar la formación de estructuras secundarias, tales como bucles en horquilla. El enlace puede ser de un material distinto del ADN, tal como un biopolímero (por ejemplo, actina, lignina, tubulina). La longitud del enlace se puede seleccionar para proporcionar a la cadena de ADN funcional descrita anteriormente un cierto rango de movimiento.

10 En una variante, el cuerpo al que están unidas las unidades funcionales (cadenas de ADN) no es una estructura de ADN, tal como se describe anteriormente, sino otro material. Por ejemplo, el cuerpo puede ser una nanopartícula (orgánica o inorgánica), un nanotubo de carbono, una micela o un liposoma. En una variante, el cuerpo es un sustrato (por ejemplo, vidrio, silicio, polímero, cerámica) que puede formar parte de un dispositivo más grande, tal como un dispositivo de microfluidos, una celda de flujo, una placa de pocillos, una cubeta, una tira reactiva u otros dispositivos de ensayo. El modelado de diferentes unidades funcionales en un sustrato puede realizarse con técnicas de microfabricación, tales como fotolitografía o litografía blanda. Los enlaces covalentes, por ejemplo, pueden anclar o unir las unidades funcionales al cuerpo.

15 Para diseñar un nanodispositivo de ADN, tal como se describe anteriormente, se utiliza un producto de programa informático. El diseño del nanodispositivo de ADN es un problema multivariado y la secuencia exacta de cadenas de ADN necesarias para construir un nanodispositivo de ADN adecuado depende de muchos factores. Estos incluyen, pero sin limitación:

- 20 - La secuencia de ADN objetivo deseada, que está determinada por las mutaciones genéticas o biomarcadores de interés para el diagnóstico médico u otros fines.
- La estabilidad química del nanorobot en su conjunto en el entorno de la muestra.
- Las velocidades de reacción
- 25 - La estructura de los módulos individuales, es decir, el número de sondas y amplificadores necesarios para la sensibilidad deseada y el mecanismo deseado de transferencia de salidas/entradas entre los mismos.
- La minimización de las interferencias: por ejemplo, la especificidad de la parte detectora, cuántas y qué estructura de sondas de bloqueo, interferencia entre partes funcionales y unidades del mismo nanodispositivo de ADN, y también interferencia entre diferentes vías (ya sea en un nanodispositivo de ADN habitual o en nanodispositivos de ADN separados) destinados a detectar diferentes dianas. Por ejemplo, un activador del tipo X (liberado al detectar ADN_{tc} de tipo X) solo debe interactuar con amplificadores de tipo X. No debe interactuar con amplificadores de tipo Y y Z que indican otro tipo de mutaciones y posiblemente otros tipos de cáncer.

30 El rendimiento del nanodispositivo de ADN se puede optimizar en función de estos factores. Se proporciona un sistema de aprendizaje automático para realizar dicha optimización multivariada y diseñar el nanodispositivo de ADN de acuerdo con las características deseadas y con un conjunto de mutaciones cancerosas para detectar.

35 Los datos de entrenamiento para la IA pueden proporcionarse mediante datos de simulación, datos experimentales o ambos.

40 La Figura 8 muestra un ejemplo de un conjunto de entradas, salidas y el nanodispositivo de ADN 2 resultante. El software 62 simula 60 el rendimiento del nanodispositivo de ADN 2 dependiendo de las entradas. Para el nanodispositivo 2 de ADN simulado óptimo, el software 50 genera secuencias de ADN para formar el nanodispositivo de ADN y, potencialmente, un diseño de características y/o información adicional de fabricación.

45 Se genera un nanodispositivo de ADN 2 según lo especificado por las salidas. Las propiedades del nanodispositivo de ADN 2 se prueban y se retroalimentan al software 50 para validar la simulación 60.

50 En los ejemplos descritos anteriormente, el nanodispositivo de ADN es para el análisis in vitro de una muestra de sangre; se entenderá que la muestra de sangre puede someterse a preparación, por ejemplo, separación del componente plasmático, amplificación del ADN, adición de reactivos u otro procesamiento. En una variante, el nanodispositivo de ADN se puede utilizar de manera similar con otro fluido o excreción corporal, tal como líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, jugo pancreático, jugo biliar, orina, saliva, esputo, heces, líquido pleural, líquido amniótico, líquido lagrimal o sudor. En una variante, el nanodispositivo de ADN se puede utilizar para la detección in vivo.

55 En los ejemplos descritos anteriormente, el nanodispositivo de ADN es para la detección de ADN_{tc}; en una variante, el nanodispositivo de ADN está adaptado para detectar el ARN tumoral circulante.

60 En otros ejemplos, el nanodispositivo de ADN está adaptado para detectar una proteína tumoral circulante u otros biomarcadores, tales como la alfa-feto proteína, proteínas de canales iónicos o marcadores inflamatorios. En este ejemplo, la sonda descrita anteriormente puede adaptarse para liberar una secuencia de ADN activadora al exponerse al biomarcador, y la secuencia de ADN activadora provoca que la amplificación y la respuesta se desarrollen tal como se describió anteriormente. En un ejemplo, el detector descrito anteriormente con referencia a la Figura 1 incluye una secuencia de ADN sonda que está adaptada (mediante selección de una secuencia adecuada) para formar un aptámero capaz de unirse a una molécula diana, tal como un biomarcador. Un aptámero es un oligonucleótido

monocatenario con una estructura tridimensional única y capaz de unirse a dianas (normalmente ligandos) con alta selectividad y especificidad. El aptámero se selecciona de manera que la unión a una molécula diana provoque un cambio conformacional del aptámero (por ejemplo, un cambio en la estructura secundaria del aptámero). El cambio conformacional del aptámero provoca entonces la liberación de una secuencia de ADN activadora, y la secuencia de ADN activadora provoca que la amplificación y la respuesta se desarrollen como se describe anteriormente. En otra variante, el módulo detector del nanodispositivo de ADN incluye, además del híbrido de la secuencia de ADN sonda P y la secuencia de ADN activadora O, tal como se describe con referencia a la Figura 1, un aptámero (de manera opcional unido al cuerpo de ADN) adaptado para unirse a un biomarcador diana. En la configuración inicial, el aptámero no se une a la sonda P. El aptámero está adaptado para cambiar de conformación al unirse al biomarcador diana, exponiendo así una región que a continuación se hibrida con la sonda P y provoca así la liberación de la secuencia de ADN activadora O de la sonda P; a continuación, la secuencia de ADN activadora hace que la amplificación y la respuesta se desarrollen, tal como se describe anteriormente.

En otro ejemplo, el nanodispositivo de ADN es para la detección de otras trazas de ADN, ARN u otros biomarcadores, por ejemplo en análisis forense.

Si bien los ejemplos descritos anteriormente se refieren a un nanodispositivo de ADN para detectar una única especie diana de ADN_{tc}, en una variante, un nanodispositivo de ADN contiene una biblioteca de sondas, cada una para una especie de ADN_{tc} diferente. Todas las sondas pueden utilizar la misma vía, o cada sonda puede desencadenar una vía distinta alojada en el nanodispositivo de ADN y puede producir una señal observable específica para un tipo de sonda.

En los ejemplos descritos anteriormente, los nanodispositivos de ADN responden a través de un gen reportero para la expresión libre de células de una proteína fluorescente. En variantes, se pueden implementar otros medios de señalización, por ejemplo mediante:

- fluorescencia donde una salida de llave K en la etapa de amplificación se adapta para desplazar un "quencher" de una etiqueta fluorescente adecuada;
- transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) donde una salida de llave K en la etapa de amplificación se adapta para incluir una molécula donadora o aceptora de FRET, y una cadena reportera incluye un aceptor/donante de FRET complementario y se adapta para recibir una cadena de llave K;
- marcaje radiactivo, decoración con partículas magnéticas, espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS), decoración con nanopartículas de oro o plata

Se entenderá que la presente invención se ha descrito anteriormente únicamente a modo de ejemplo, y se pueden realizar modificaciones de detalle dentro del alcance de la presente invención.

Los números de referencia que aparecen en las reivindicaciones son sólo a modo de ilustración y no tendrán ningún efecto limitante sobre el alcance de las reivindicaciones.

El término "que comprende", tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, significa preferiblemente "que consiste al menos en parte en".

REIVINDICACIONES

1. Conjunto de formaciones de ADN para detectar un biomarcador, incluyendo las formaciones:
 un detector adaptado para aceptar un biomarcador diana y, de este modo, liberar una secuencia de ADN activadora mediante hibridación competitiva;
 un amplificador adaptado para la hibridación con la secuencia de ADN activadora y, de este modo, liberar una secuencia de ADN llave y la secuencia de ADN activadora o una secuencia de ADN activadora adicional, en el que la liberación se realiza mediante hibridación competitiva; y
 un respondedor adaptado para la hibridación con la secuencia de ADN llave y, de este modo, provocar que se produzca una señal detectable por un observador.
2. Conjunto de formaciones de ADN, según la reivindicación 1, en el que la hibridación competitiva es un desplazamiento de cadena mediado por la región "toehold" o un intercambio de la región "toehold".
3. Conjunto de formaciones de ADN, según la reivindicación 1 o 2, en el que dos o más de las formaciones están unidas a un cuerpo común, preferiblemente en una disposición predeterminada.
4. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el detector está adaptado para aceptar una secuencia de ADN diana, preferiblemente ADN tumoral circulante, y, de este modo, liberar una secuencia de ADN activadora; y/o en el que el detector está adaptado para la hibridación con una pluralidad de biomarcadores y, de este modo, liberar una o más secuencias de ADN activadoras.
5. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el detector comprende una o más secuencias de ADN sonda unidas a un cuerpo de ADN y adaptadas para hibridarse con una secuencia de ADN diana y liberar una secuencia de ADN activadora.
6. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, un bloqueador adaptado para hibridarse con una secuencia de ADN de interferencia.
7. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el amplificador comprende una pluralidad de subunidades del amplificador, estando cada subunidad del amplificador adaptada para hibridarse con una secuencia de ADN activadora y para liberar una secuencia de ADN llave y la secuencia de ADN activadora o una secuencia de ADN activadora adicional.
8. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el amplificador comprende uno o más casos de una o más secuencias de ADN amplificadoras adaptadas para hibridarse con una secuencia de ADN activadora; y uno o más casos de una secuencia de ADN portadora de llave adaptada para liberar una secuencia de ADN llave.
9. Conjunto de formaciones de ADN, según la reivindicación 8, en el que una primera secuencia de ADN amplificadora está adaptada para cambiar de conformación tras la hibridación con la secuencia de ADN activadora.
10. Conjunto de formaciones de ADN, según la reivindicación 9, en el que una segunda secuencia de ADN amplificadora está adaptada para cambiar de conformación tras la hibridación con la primera secuencia de ADN y, de este modo, liberar la secuencia de ADN activadora.
11. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el amplificador comprende una pluralidad de vías de amplificación para la liberación de diferentes especies de secuencias de ADN llave.
12. Conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el respondedor comprende una formación de captura de ADN adaptada al menos parcialmente para encerrar a un reportero en una primera configuración, y para liberar el reportero en una segunda configuración.
13. Procedimiento para detectar un biomarcador diana que comprende introducir un conjunto de formaciones de ADN, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en una muestra de fluido corporal *in vitro*.
14. Procedimiento para detectar un biomarcador diana, que comprende:
 hibridar un biomarcador diana con una sonda y, de este modo, liberar una secuencia de ADN activadora mediante hibridación competitiva;
 hibridar la secuencia de ADN activadora con una secuencia de ADN amplificadora y, de este modo, provocar uno o más cambios conformacionales de la secuencia de ADN amplificadora, liberar una secuencia de ADN llave y liberar la secuencia de ADN activadora o una secuencia de ADN activadora, en el que la liberación se realiza mediante hibridación competitiva; e

hibridar la secuencia de ADN llave con una parte de secuencia de ADN de bloqueo de una formación de captura de ADN y, de este modo, provocar que se produzca una señal detectable por un observador, preferiblemente cambiando la configuración de la formación de captura de ADN para liberar un reportero.

- 5 15. Producto de programa informático que comprende un código de software adaptado para generar, cuando se ejecuta, una simulación del conjunto de formaciones de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

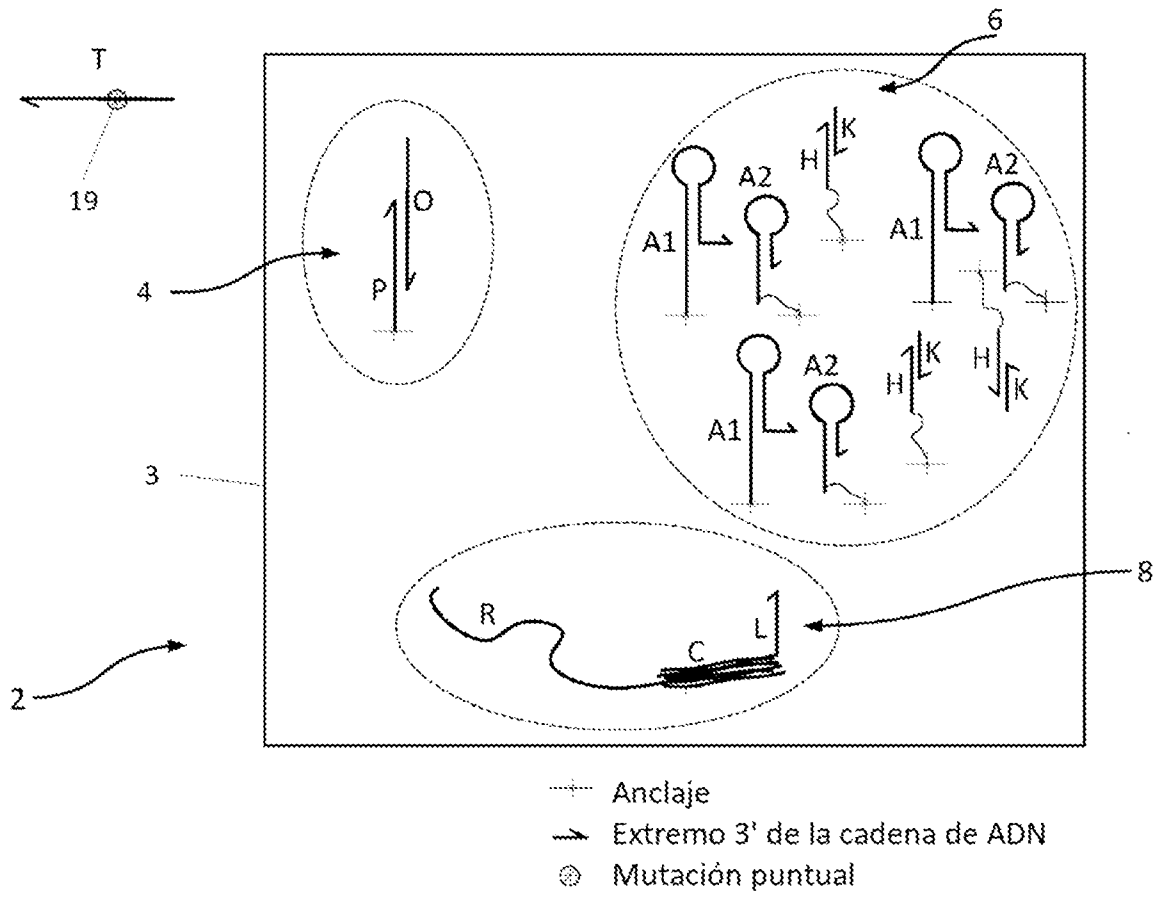


Figura 1

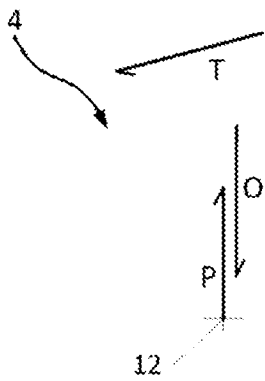


Figura 2a

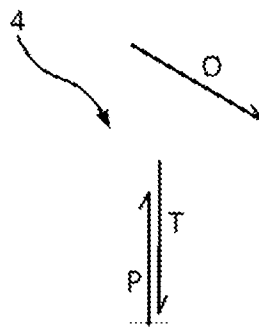


Figura 2b

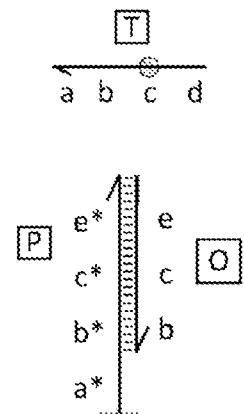


Figura 2c

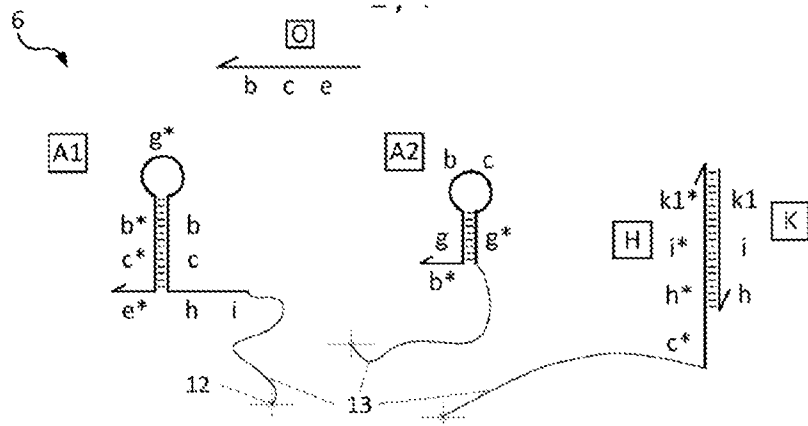


Figura 3a

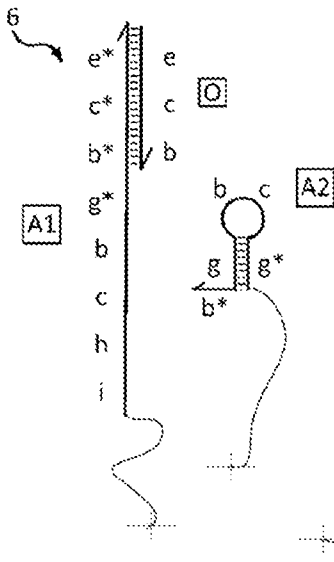


Figura 3b

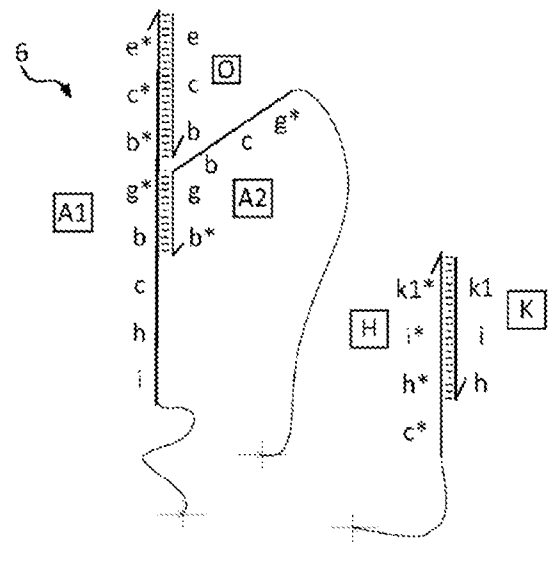


Figura 3c

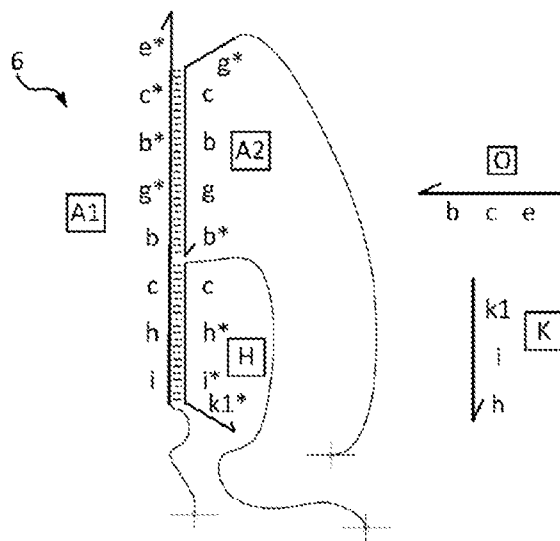


Figura 3d

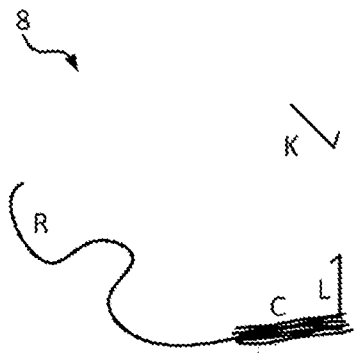


Figura 4a

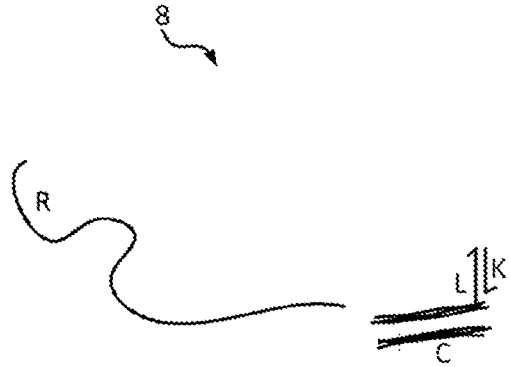


Figura 4b

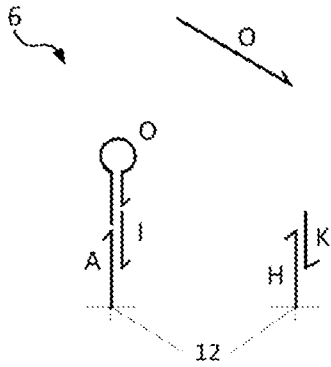


Figura 5a

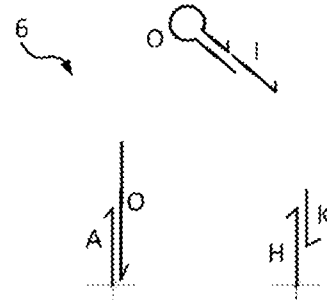


Figura 5b

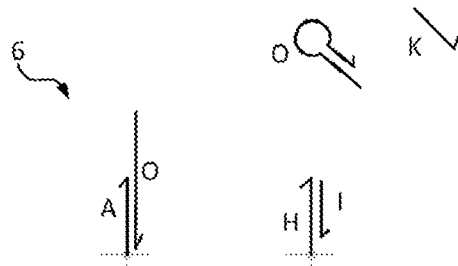


Figura 5c

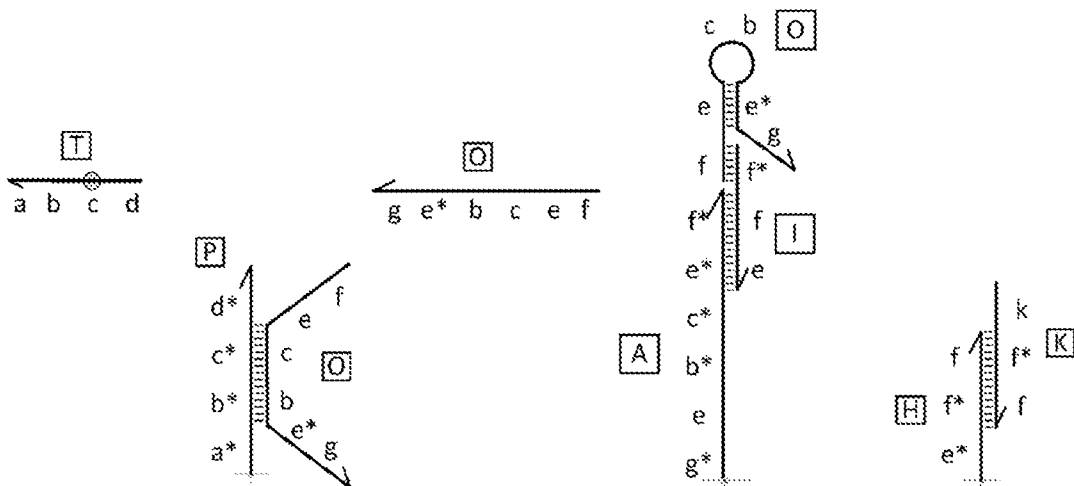


Figura 5d

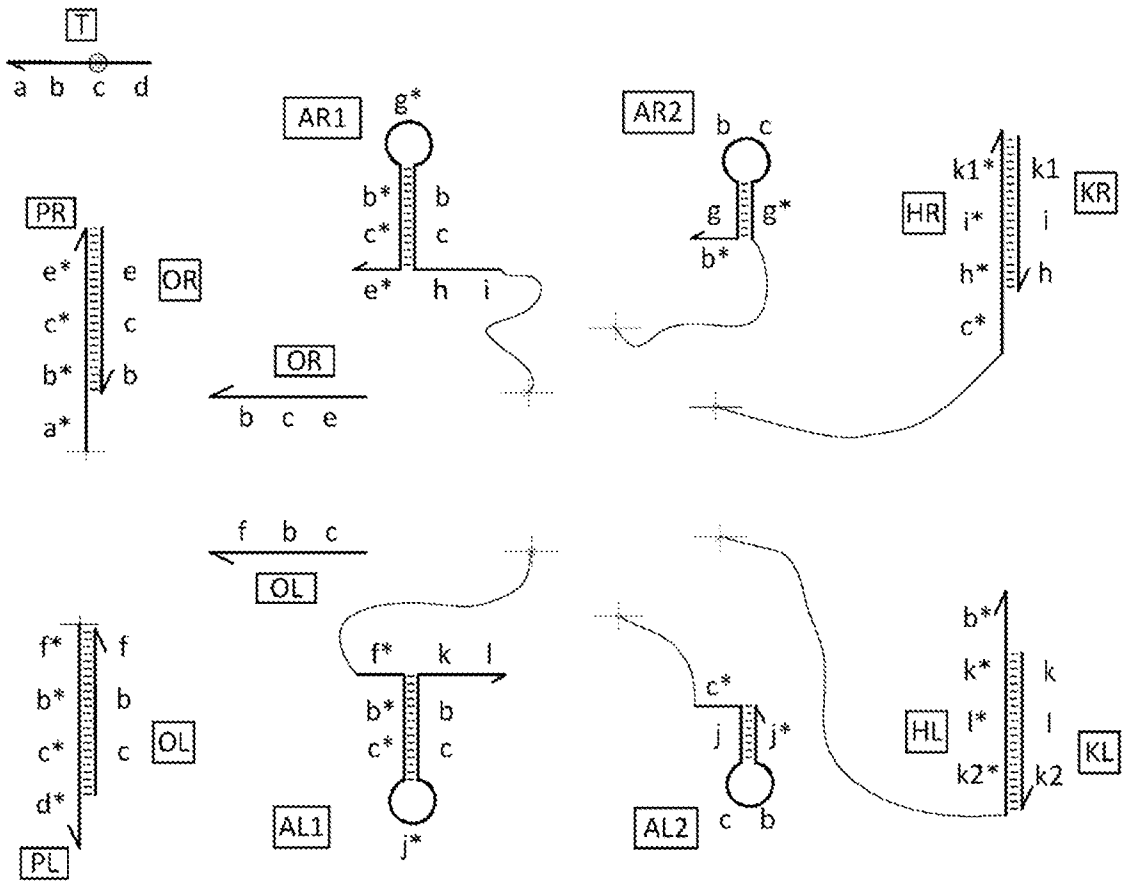


Figura 6

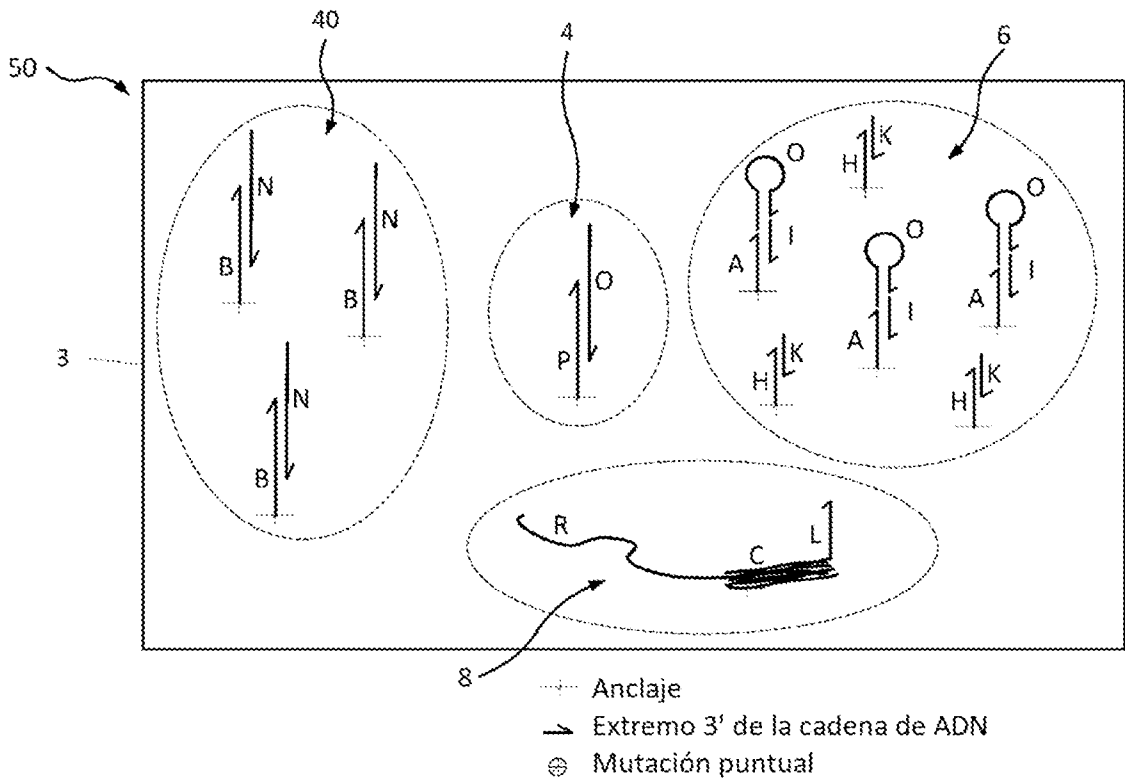


Figura 7

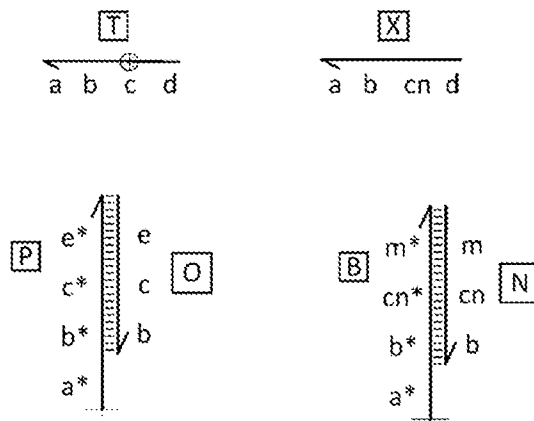


Figura 8

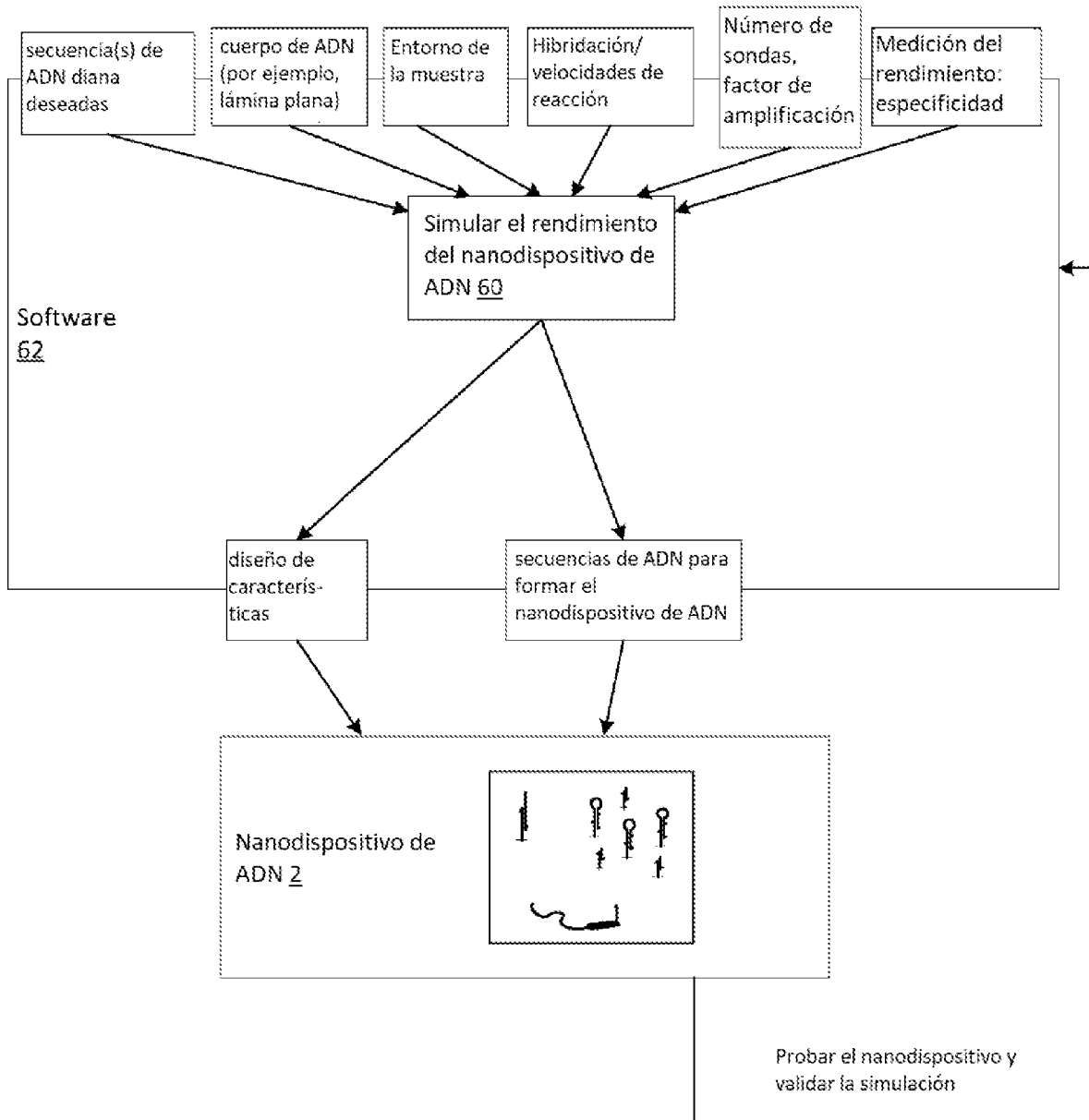


Figura 9