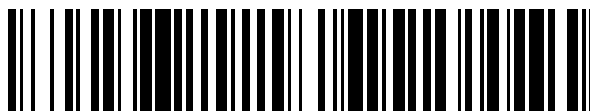


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 740**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2008** **E 08804623 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 2215476**

54 Título: **Procedimiento y sistema de detección de un tipo seleccionado de moléculas en una muestra**

30 Prioridad:

22.10.2007 EP 07380283

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

13.09.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (50.0%)
C/ Serrano 117
28006 Madrid, ES y
INTA INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA
AEROSPACIAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MERTENS, JOHANN;
TAMAYO DE MIGUEL, FRANCISCO JAVIER;
CALLEJA GÓMEZ, MONTSERRAT;
VEGA RAMOS, DANIEL;
ROGERO BLANCO, CELIA;
MARTÍN GAGO, JOSÉ ÁNGEL y
BRIONES LLORENTE, CARLOS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 422 740 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

Procedimiento y sistema de detección de un tipo seleccionado de moléculas en una muestra

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del análisis químico y/o biológico y a la detección mediante el uso de estructuras micro- o nanomecánicas, tales como micro- y nanovoladizos, micro- y nanopuentes, micro- o nanomembranas, etc.

Estado de la técnica

10 Existe un creciente interés por los sistemas y procedimientos a base de elementos nano- y micromecánicos: [H. G. Craighead, "Nanoelectromechanical systems", *Science* 290, pp. 1532-1535 (2000) y M. Li, H. X. Tang, M. L. Roukes, "Ultra-sensitive NEMS-based cantilevers for sensing, scanned probe and very high-frequency applications", *Nature Nanotechnology* 2, pp. 114-120 (2007)]. Los sistemas micro- y nanomecánicos (MMS) y los dispositivos basados en microvoladizos son dos ejemplos significativos de este tipo de sistemas.

15 Por ejemplo, los microvoladizos pueden usarse como sensores nanomecánicos, biológicos y químicos ultrasensibles: [B. Ilic, D. Czaplewski, H.G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo y C. Batt "Mechanical resonant immunospecific biological detector", *Applied Physics Letters* 77, páginas 450-452 (2000)]. La medición en tiempo real de la forma, el perfil, movimiento, tensión y/o deformación es muy útil para monitorizar la respuesta mecánica de, por ejemplo, sensores biológicos y químicos basados en la forma, el perfil, el movimiento, la tensión o la deformación de MMS o de micro- o nanovoladizos.

20 Los sistemas MMS y de microvoladizos incluyen sistemas a base de voladizos que poseen un extremo fijo y otro móvil; en estos sistemas, lo que se detecta habitualmente es el desplazamiento y/o movimiento del extremo "libre". Sin embargo, también existen sistemas basados en voladizos sujetos con abrazaderas en ambos extremos, en los que se detecta el movimiento de la parte central. Además, existen otras estructuras micro- y nanomecánicas que son móviles y flexibles, tales como paletas sujetas por dos abrazaderas cuya dirección de movimiento "fácil" corresponde a la torsión de la paleta situada alrededor del eje de las bisagras que unen la paleta a un marco (básicamente, como una raqueta cuadrada fijada a un marco mediante dos asas opuestas de dicha raqueta que se extienden a lo largo del eje). Otros sistemas conocidos usan membranas que se unen a un marco mediante dos conjuntos de bisagras, lo que permite dos grados angulares de libertad.

25 En sensores biológicos/químicos a base de SMM y microvoladizos, la superficie del elemento micro- o nanomecánico se sensibiliza con unas moléculas receptoras o "sonda" que reconocen selectivamente la sustancia diana. La interacción entre la sonda inmovilizada y la sustancia diana en la superficie del elemento micro- o nanomecánico produce un cambio en la forma, el perfil, la deformación, la tensión y el movimiento (vibración) del elemento mecánico. Por ejemplo, Stachowiak J. C. y col. divulgan como cambia la tensión de superficie de un microvoladizo después de hibridación de ADN (*Langmuir* 2006, 22: 263-268). El seguimiento de este cambio se realiza habitualmente midiendo el desplazamiento de una parte representativa del elemento mecánico (habitualmente el extremo libre de un microvoladizo sujeto con una sola abrazadera, aunque también puede ser el centro de un microvoladizo sujeto con dos abrazaderas, una parte de una lámina de membrana, etc.). Este desplazamiento puede encontrarse en el orden de aproximadamente 1-100 nanómetros (nm) y, en muchos casos, es necesario obtener una resolución mejor que 1 nm, dependiendo de la aplicación. Existen varias técnicas de lectura para el desplazamiento, tales como: la detección capacitiva, la detección a base de corriente por efecto túnel, la interferometría óptica, la lectura piezorresistiva y la técnica por deflexión de haz óptico.

30 Se divulgan ejemplos de sistemas de MMS y microvoladizo en, por ejemplo:

Engel y col., "Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work", *Trends in Cell Biology*, Volumen 9, páginas 77-80 (1999)

35 P. Vettiger y col., "The millipede-more than one thousand tips for future AFM storage", *IBM J. Res. Develop.*, Volumen 44, Número 3, páginas 323-339 (2000).

Documento WO-A-2001/33226

Documento WO-A-2003/091458

Documento WO-A-2005/086172

Documento WO-A-2007/006834

40 El procedimiento por deflexión de haz óptico es quizá el más sensible y tiene la ventaja de que puede realizarse fácilmente. La figura 1 ilustra esquemáticamente una disposición de la técnica anterior convencional para la deflexión de haces ópticos. Una fuente de luz (tal como una fuente de láser) genera un haz de luz (tal como un haz de luz láser, en el espectro visible, ultravioleta o infrarrojo) que se enfoca (es decir, se enfoca bien directamente o

bien mediante medios de enfoque que implican uno o más espejos, etc.) en la parte del elemento mecánico en la que se va a medir el desplazamiento, por ejemplo en el extremo de un microvoladizo que forma parte del dispositivo micromecánico. La deflexión del haz reflejado en el microvoladizo se mide con un detector sensible a la posición (tal como un fotodetector, por ejemplo un fotodetector segmentado, un fotodetector sensible a la posición en continuo, una serie de fotodetectores, una CCD, etc.). Por ejemplo, puede usarse un fotodetector segmentado que está dividido en dos segmentos. La deflexión del voladizo produce un desplazamiento del punto de láser reflejado en el fotodetector. Por lo tanto, la diferencia de fotocorrientes entre los dos segmentos es proporcional a la deflexión del voladizo. De modo similar, la técnica de deflexión de haz óptico puede aplicarse a otros tipos de elementos mecánicos tales como: voladizos sujetos con dos abrazaderas, láminas de membrana, micropaletas, etc. También puede aplicarse en la lectura de otros tipos de desplazamiento en lugar del desplazamiento fuera del plano, tales como el movimiento de torsión de microvoladizos y micropaletas, etc. (G. Meyer y N.M. Amer, "Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope", Applied Physics Letters, vol. 57, páginas 2089-2091 (1990)).

Este sistema es adecuado para medir tanto el comportamiento estático como el dinámico de elementos mecánicos tales como voladizos, por ejemplo la deflexión máxima, el valor medio de deflexión, la amplitud en una frecuencia de referencia (el elemento puede manejarse desde el exterior mediante una fuerza de excitación que oscila a la frecuencia de referencia), la fase del movimiento con respecto a una señal conductora externa, la frecuencia etc. El desplazamiento estático medido, la amplitud, la frecuencia, etc., pueden relacionarse después con el objeto que se va a medir y que interactúa con el voladizo, y con señales y/o procedimientos usados para estimular el objeto y/o el voladizo.

Ahora bien, la técnica descrita anteriormente es práctica cuando se desea medir el desplazamiento/movimiento de una única parte de un único elemento mecánico. Sin embargo, esta técnica no puede aplicarse en dispositivos basados en series que comprenden una pluralidad de elementos mecánicos, en los que es preciso medir el desplazamiento/movimiento de cada elemento. Estos dispositivos proporcionan la posibilidad de realizar varias funciones y más velocidad y/o información más completa que los dispositivos a base de un único elemento mecánico. Por ejemplo, los sensores químicos y biológicos a base de series de microvoladizos pueden detectar varias sustancias sensibilizando cada voladizo con un receptor diferente [R. McKendry R y col., "Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array", Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States Of America 99, pp. 9783-9788, 2002]. Además, puede ser ventajoso obtener más información sobre el desplazamiento de varias regiones del elemento mecánico, a fin de obtener más información sobre el estímulo externo objeto de la medición o sobre diferentes estímulos que interactúan con diferentes partes del elemento mecánico.

La solicitud de patente *WO-A-2005/086172*, mencionada anteriormente, divulga un sistema tal como el representado en la figura 2, en el que los microvoladizos de una serie están iluminadas por una única fuente de luz láser dispuesta en un actuador de una bobina móvil unidimensional, con lo que el haz de láser incidente está preparado para explorar periódicamente la serie en una dirección perpendicular a los ejes longitudinales de los microvoladizos. De este modo, el extremo libre de cada microvoladizo de la microserie se ilumina de modo secuencial. Cuando el haz de láser se refleja en la superficie de un microvoladizo de la serie, se detecta un aumento de la fotocorriente total de un detector sensible a la posición (que está dispuesto para recoger el haz de láser reflejado en el voladizo), correspondiendo este aumento a los picos de la fotocorriente detectada. Cuando se detecta el aumento de fotocorriente, las coordenadas de posición del punto correspondiente en el que el haz de láser reflejado incide en el fotodetector se determinan en base a las señales de fotocorriente generadas por el detector, y estas coordenadas pueden usarse para determinar la deflexión del voladizo.

Por otra parte, algunas veces es necesario medir no solo el desplazamiento de una parte concreta del voladizo u otro tipo de elemento mecánico, sino además el cambio general en la curvatura o en la forma del voladizo o elemento similar, o de una parte concreta de la misma. Así, se conoce una técnica que se ha aplicado a sensores de microvoladizos que usan la flexión de un voladizo que tiene estructura de doble capa (por ejemplo, una lámina delgada de oro sobre silicio o nitrato de silicio). Las curvaturas de los voladizos sufren un cambio en respuesta a cualquier cambio de temperatura o tensión de superficie diferencial debido a la adsorción molecular. Para obtener el cambio en el radio de curvatura se conoce un sistema de medición basado en el uso de ocho diodos emisores de luz enfocados en diversas posiciones de un voladizo de silicio recubierta con oro. La deflexión en cada punto del voladizo se mide con precisión subnanométrica mediante un detector sensible a la posición usando la técnica de deflexión de haz óptico, obteniéndose, de este modo, la curvatura del voladizo. Este procedimiento se divulga por Sangmin Jeon y col., "Instant curvature measurement for microcantilever sensors", Applied Physics Letters, vol. 85, Nº 6, páginas 1083-1084 (2004).

Además de los sistemas de voladizo en los que se mide el desplazamiento de una parte específica del voladizo o en los que se mide la curvatura del voladizo, existen estructuras mecánicas tales como láminas de membrana sensibilizadas en diferentes regiones a diferentes estímulos de tal modo que para obtener la información sobre cada estímulo es necesario medir el desplazamiento de cada región sensibilizada de la estructura mecánica.

El documento *WO-A-2007/006834* mencionado anteriormente divulga un sistema como el representado en la figura 3. El sistema está dispuesto para detectar características relativas de desplazamiento y/o vibración de una pluralidad

de puntos situados en una pluralidad de elementos que forman parte de la estructura mecánica, y comprende una fuente de luz dispuesta para generar al menos un haz de luz, un detector sensible a la posición dispuesto para recibir el haz de luz cuando este se refleja en la estructura mecánica y para generar al menos una señal de salida en respuesta a la recepción de dicho haz de luz, un sistema de control electrónico y medios de exploración para medir el desplazamiento relativo de dicho haz de luz con respecto a la estructura mecánica, así como para realizar un exploración de dicha estructura mecánica mediante el haz de luz, siguiendo las instrucciones del sistema electrónico de control. El sistema electrónico de control está dispuesto para controlar los medios de exploración para desplazar el haz de luz a lo largo de la estructura mecánica a lo largo de una primera trayectoria (A), para detectar una pluralidad de posiciones de referencia posteriores (C) a lo largo de dicha primera trayectoria (A), y dicho sistema de control electrónico está asociado operativamente a dicho detector sensible a la posición para determinar determinadas posiciones de referencia C como resultado de un análisis de al menos una señal de salida procedente de dicho detector sensible a la posición. Además, el sistema electrónico está dispuesto para controlar los medios de exploración para desplazar el haz de luz a lo largo de la estructura mecánica a lo largo de una pluralidad de segundas trayectorias (B), estando asociada cada una de dichas segundas trayectorias (B) con una de dichas posiciones de referencia (C). El sistema electrónico de control está también dispuesto para obtener, durante el desplazamiento del haz de luz a lo largo de cada una de dichas segundas trayectorias (B), una pluralidad de señales de salida de posición procedentes de dicho detector sensible a la posición.

Con este sistema es posible obtener mediciones en tiempo real del desplazamiento y el movimiento de una pluralidad de localizaciones seleccionadas de una estructura mecánica o de una región de interés de esa estructura. Esto proporciona más información de cómo cambia la estructura mecánica con respecto al objeto que se va a medir que, a su vez, implicarían mayor sensibilidad y una relación señal-ruido más elevada. Por ejemplo, en algunos sensores de microvoladizos, la curvatura que se extiende a lo largo del microvoladizo está relacionada con moléculas adsorbidas en la superficie del microvoladizo. Para obtener esta curvatura es necesario medir el desplazamiento de diversas localizaciones a lo largo del microvoladizo.

En el caso de sensores químicos o biosensores, el elemento mecánico (tal como un nano- o microvoladizo) usado para la detección tiene, tal como se ha mencionado anteriormente, una porción dispuesta para interactuar con el tipo (o tipos) de moléculas que se desea detectar, de modo que la presencia de dichas moléculas en una muestra en contacto con dicha porción provoca un cambio en sus propiedades mecánicas, tales como un cambio en la curvatura, tensión de superficie y/o características de vibración, que puede detectarse, por ejemplo, con los procedimientos descritos anteriormente.

Por ejemplo, una de las superficies más extensas del voladizo puede funcionalizarse con una capa de sustancias o moléculas que actúan como receptores o "sondas". La funcionalización puede realizarse mediante interacciones químicas o físicas de esas sustancias o moléculas con la superficie del voladizo. Por ejemplo, puede usarse una molécula reticulante, en la que uno de sus extremos forma enlaces covalentes con la superficie del voladizo y el otro extremo tiene una fuerte afinidad con la molécula sonda. Los procedimientos más ampliamente usados se basan en la silanización de la superficie del voladizo, así como en la inmovilización de monocapas autoensambladas de moléculas sonda en la superficie del voladizo. Los receptores o sondas pueden seleccionarse para estudiar su interacción con otra sustancia o molécula diana y eventualmente para determinar la concentración de la sustancia diana en la muestra analizada. En esta aplicación, los receptores se unen específicamente a la diana y esta interacción específica se conoce a menudo como reconocimiento molecular. Los ejemplos de moléculas receptoras o sonda incluyen ácidos nucleicos (ADN, ARN, APN u otros), proteínas (anticuerpos, enzimas u otros), biopolímeros alternativos, etc. La molécula o sustancia diana se puede encontrar diluida en una muestra gaseosa o líquida. Las dianas biológicas se encuentran frecuentemente en soluciones acuosas [Briones, C. y Martin-Gago, J.A., "Nucleic acids and their analogs as nanomaterials for biosensor development", *Current Nanoscience* 2, 257-273 (2006)].

Por ejemplo, un elemento mecánico puede tener al menos una superficie receptora (por ejemplo un voladizo en la que uno de los lados se ha funcionalizado con receptores moleculares, tales como ADN, anticuerpos, etc.) dispuesta (por ejemplo, el voladizo sumergido en una solución tampón en una célula microfluídica con canales de entrada y salida para inyectar la solución tampón que contiene las moléculas diana) de modo que pueda interactuar con al menos un tipo de moléculas cuando están presentes en una muestra que está en contacto con la superficie de dicho receptor. El elemento mecánico puede disponerse de modo que al menos una característica mecánica detectable (tal como la curvatura de una porción del elemento, la posición de una porción de la superficie del elemento y/o una característica de vibración) de dicho elemento cambie cuando la superficie de dicho receptor interactúa con dichas moléculas diana, y posteriormente se lleva a cabo un procedimiento de medición para determinar si dicha característica ha cambiado y la medida de dicho cambio. Si ha cambiado (hasta una medida determinada) se da por hecho que la muestra contiene el tipo de moléculas que pueden interactuar específicamente con las moléculas sonda inmovilizadas. En ocasiones, se realiza un seguimiento del cambio en la característica mecánica durante un periodo, es decir, el elemento se pone en contacto con la muestra y la característica mecánica (como la curvatura de un voladizo) se mide y se detecta si cambia en función del tiempo. Si se detecta dicho cambio, se asume que las moléculas diana estaban presentes en la muestra.

De todas las maneras, las técnicas desarrolladas hasta el momento tienen algunos problemas:

- En ocasiones el "cambio" detectado proviene de otros factores y no de la interacción entre la superficie receptora

y las moléculas diana. Esto puede producirse, por ejemplo, mediante interacciones no específicas de la diana con el elemento mecánico, pequeñas variaciones de temperatura, fluctuaciones pequeñas en los iones de soluciones líquidas, turbulencias de fluido, cambios en el índice de refracción, variaciones lentas en función del tiempo en las posiciones de los elementos ópticos que detectan el movimiento del elemento mecánico, etc.

5 - También, para detectar el cambio, es necesario realizar un seguimiento del elemento mecánico en tiempo real, es decir, básicamente, desde el momento en el que entra en contacto con la muestra, de modo que el cambio debe detectarse mientras tiene lugar (debe estar disponible como dato referido a la característica tanto antes como después del cambio) .

10 - También, la magnitud del cambio (tal como un cambio en la curvatura) puede ser bastante pequeño, lo que, obviamente, hace que la detección sea una tarea complicada.

Definiciones:

15 **Anticuerpo.** Proteína en forma de “Y” (inmunoglobina) situada en la superficie de linfocitos B que se segrega a la sangre o la linfa en respuesta a un estímulo antigénico tal como una bacteria, un virus, un parásito o un órgano trasplantado y que neutraliza el antígeno uniéndose a él específicamente. La detección de la formación de pares anticuerpo-antígeno puede seguirse mediante diversos procedimientos y constituye la base de muchos biosensores.

Antígeno. Una sustancia que estimula la producción o movilización de anticuerpos. Un antígeno puede ser una proteína, toxina, bacteria u otra sustancia extraña.

20 **Aptámero.** Una molécula de ácido nucleico diseñada *in vitro* para interactuar de modo específico con una molécula ligando. La especificidad de un par aptámero-ligando puede ser tan elevada como la del par anticuerpo-antígeno. La formación de un par aptámero-ligando puede seguirse mediante diversos procedimientos.

Biosensor. Dispositivo de análisis que comprende un elemento de reconocimiento biológico (por ejemplo, enzima, receptor, ADN, anticuerpo o microorganismo) en contacto íntimo con un transductor de señales electroquímicas, ópticas, térmicas o acústicas que conjuntamente permite analizar propiedades químicas o cantidades. Muestra un desarrollo potencial en algunos sectores, incluido el seguimiento medioambiental.

25 **Biochip.** Matriz de elevada densidad de moléculas de ADN de cadena sencilla unidas a una superficie sólida (cristal, silicio, etc.) para reconocer rápidamente (hibridación) miles de genes al mismo tiempo, lo que facilita un alto análisis de procesamiento de miles de genes simultáneamente.

30 **Voladizo.** Estructura mecánica, tal como una viga, que está soportado en un extremo; la deflexión del extremo es proporcional a la carga o las fuerzas ejercidas desde el exterior. Las voladizos se microfabrican ampliamente usando tecnología del silicio para usar como biosensores.

ADN. Un ácido orgánico y polímero compuesto por cuatro bases nitrogenadas: adenina timina, citosina y guanina, unidas por unidades interpuestas de fosfato y el azúcar pentosa desoxirribosa. El ADN es el material genético de la mayor parte de los organismos y habitualmente se encuentra como una molécula bicatenaria en la que dos cadenas paralelas están unidas conjuntamente mediante enlaces de hidrógeno entre adenina-timina y citosina-guanina.

35 **Hibridación.** Procedimiento de enlace mediante hidrógeno entre dos cadenas complementarias de ADN o una de ADN y otra de ARN para formar una molécula bicatenaria.

40 **Reconocimiento molecular.** Capacidad de las moléculas biológicas para unirse específicamente a otra molécula que tiene una forma complementaria. El reconocimiento molecular dirige toda la biología, por ejemplo, las interacciones entre hormona y receptor o anticuerpo-antígeno o la organización de moléculas para formar entidades biológicamente activas mayores.

45 **MEMS.** Sistemas microelectromecánicos. Se usa generalmente para referirse a sistemas en la escala micrométrica que combinan componentes mecánicos y electrónicos y se fabrican usando técnicas de fabricación de semiconductores. Los MEMS responden a un estímulo o generan fuerzas físicas (sensores y actuadores). Los acelerómetros en miniatura son los productos con mayor éxito en este campo y se usan para accionar los *air bag* de los automóviles. Cuando dichos sistemas pueden fabricarse con dimensiones a escala nanométrica, pueden clasificarse como MEMS.

Desapareamiento (o disparidad). Ocurre cuando en al menos una posición de un ácido nucleico bicatenario, ambas cadenas tiene dos nucleótidos no complementarios y que no se hibridan.

50 **Mutación.** También conocida como “polimorfismo de un solo nucleótido” (SNP), se trata de una alteración de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico con respecto a otra secuencia de referencia. Esta alteración puede corresponder a la sustitución de un nucleótido por otro, a una inserción o a una supresión de uno o más nucleótidos.

NEMS. Véase MEMS.

Oligonucleótido. Molécula de ácido nucleico monocatenaria de entre 3 y 250 nt de longitud que puede hibridarse con una secuencia de ácido nucleico complementaria.

Ácido peptidonucleico (PNA). Tipo artificial de molécula de ácido nucleico en la que el esqueleto de azúcar-fosfato se ha reemplazado por una estructura peptidomimética. Cada monómero de PNA está compuesto por una molécula de N-(2-aminoetil)glicina enlazada, mediante una unidad de metilencarbonilo, a la base nitrogenada de un grupo formado por A, G, C y T. El PNA presenta unas propiedades fisicoquímicas únicas, siendo un polímero sin carga, aciral y relativamente rígido de alta estabilidad biológica y química.

Sonda. Se refiere a oligonucleótidos con una longitud constituida por secuencias específicas de nucleótidos que permiten una hibridación total o parcial con secuencias diana complementarias en determinadas circunstancias. En el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos sonda se inmovilizan en las estructuras micro- o nanomecánicas y, en determinadas circunstancias, son capaces de formar monocapas autoensambladas sobre las mismas.

Proteína. Molécula compuesta por una o más cadenas de polipéptidos, compuesta cada una por una cadena lineal de aminoácidos unida covalentemente mediante enlaces peptídicos.

Resonancia. Una condición en la que un sistema que vibra responde con amplitud máxima a una fuerza motriz alternante. La condición existe cuando la frecuencia de la fuerza motriz coincide con la frecuencia de oscilación natural no amortiguada del sistema.

Monocapa autoensamblada (SAM). Película bidimensional, del grosor de una molécula, ensamblada covalentemente a una interfaz. Los reactivos más comunes usarán la reacción de un tiol y con oro o un triclorosilano con grupos SiOH.

Sensibilización. Véase Funcionalización de superficies y Monocapa autoensamblada.

Funcionalización de superficies. Procedimiento o técnica para introducir grupos funcionales químicos en una superficie. En biosensores se usa para inmovilizar los receptores biomoleculares en el sensor.

Deformación. Se refiere a la expresión geométrica de una deformación causada por la acción de una tensión en un cuerpo sólido.

Tensión. Se refiere a una medida de fuerza por área unidad dentro de un cuerpo.

Tensión de superficie. La deformación derivada de la energía de la superficie libre total, dividida por el área de la superficie.

Secuencias diana. Moléculas o secuencias de ácidos nucleicos presentes en la muestra analizada y susceptibles de hibridarse con las sondas de oligonucleótidos inmovilizadas.

Descripción de la invención

Un primer objeto de la invención es un procedimiento para detectar un tipo seleccionado de moléculas o sustancia en una muestra que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una superficie receptora de un elemento micromecánico con la muestra, estando dispuesta dicha superficie receptora para interactuar con dichas moléculas o sustancia cuando dichas moléculas o sustancia están presentes en dicha muestra, estando dispuesto el elemento micromecánico de modo que al menos una característica mecánica detectable de dicho elemento cambia cuando dicha superficie receptora interactúa con dichas moléculas o sustancia;

b) medir dicha característica mecánica para obtener datos referidos a dicha característica mecánica;

c) determinar, en base a dichos datos, si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancia;

caracterizado porque al menos una condición a la que al menos la superficie receptora del elemento micromecánico está sometida se varía, con lo que dicha característica mecánica se mide una pluralidad de veces, de modo que los datos referidos a dicha característica mecánica se obtienen para diferentes valores de dicha condición, con lo que la relación entre dichos datos y dichos valores de la condición se usan para determinar si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancia o para determinar si existen fenómenos asociativos entre la superficie receptora y las moléculas o sustancia detectadas, en el que dicha característica mecánica se selecciona de entre la curvatura de una porción del elemento micromecánico, la posición de una porción del elemento micromecánico, al menos una característica de vibración del elemento micromecánico o tensión de superficie en una porción del elemento mecánico, en el que dichas moléculas son moléculas de ácidos nucleicos y proteínas o péptidos y dichas sustancias son células eucariotas, bacterias, virus o tiroides, y en el que dicha condición es al menos humedad o humedad

relativa.

5 Por lo tanto, por medio del procedimiento de la invención, en vez de medir solo el valor “absoluto” de la característica mecánica (para detectar, por ejemplo, un cambio “absoluto” en la curvatura), que puede ser pequeño o estar oculto por otros cambios en parámetros externos para los que el elemento micromecánico es también sensible o por un cambio en la calibración del aparato de medición, la característica mecánica se detecta en condiciones variables. Así, el modo en el que la característica mecánica cambia en estas condiciones puede usarse para determinar si las moléculas o sustancia dianas de interés están presentes en la muestra.

10 Esto es posible debido al hecho de que la interacción entre las moléculas o la sustancia que se desean detectar y el elemento micromecánico mismo y/o entre dichas moléculas y las moléculas sonda unidas a la superficie receptora puede variar según las condiciones a las que está sometida la superficie receptora. Entonces, la unión de las moléculas al receptor modifica la característica mecánica frente a la condición. Los ejemplos de condiciones que pueden variar además de la humedad o la humedad relativa son el pH y la fuerza iónica del fluido o disolvente en los que está dispuesto el elemento mecánico; el contenido relativo de una mezcla de gases o líquidos en los que está dispuesto el voladizo (por ejemplo, se puede obtener un efecto de humedad de forma similar en una mezcla de hidratación con agua y deshidratación con etanol) la radiación a la que se somete la superficie receptora, el campo eléctrico, el campo magnético, etc.

15 Este procedimiento para detectar la presencia de moléculas en la muestra es ventajoso, puesto que aumenta la sensibilidad (no depende ya solo de la “magnitud” absoluta del cambio inducido cuando las moléculas se acoplan a los receptores), y también posibilita comprobar la presencia sin necesidad de comparar la característica mecánica relevante antes y después de someter el elemento censor a la muestra. Es suficiente con realizar las mediciones después de haber sometido el elemento micromecánico a contacto con la muestra, ya que lo que se mide es el modo en que dicha característica mecánica varía cuando cambia la condición y no el modo en que varía después de poner en contacto el elemento mecánico con la muestra.

20 De este modo, en la presente invención, en vez de medir la variación de la característica mecánica en función del tiempo, la variación de la característica mecánica se mide para distintos valores de la condición, por ejemplo diferentes niveles de humedad relativa, etc.

25 Es decir, la “interacción” entre las moléculas que se desean detectar y la superficie receptora ya no tiene que “detectarse” en tiempo real. Por el contrario, usando el procedimiento según la invención, el elemento micromecánico (por ejemplo, un microvoladizo que puede formar parte de una serie) puede ponerse en contacto con la muestra y, en una etapa posterior, analizarse por medio del procedimiento de la invención. En base a conocimientos precedentes con respecto al comportamiento de una característica mecánica relevante del elemento (tal como su curvatura) cuando la condición (tal como la humedad relativa) cambia, con o sin interacción entre la superficie receptora y las moléculas que se desean detectar, es posible determinar si dichas moléculas están presentes en la muestra (es decir, que interactúan con la superficie receptora, básicamente, acopladas a la misma) o no. Asimismo, la diferencia de “comportamiento” de la característica mecánica cuando la condición cambia, dependiendo de si las moléculas que se desean detectar están presentes o no, implica lo que podría denominarse “huellas digitales” de dichas moléculas, permitiendo de este modo determinar la presencia de las mismas usando el procedimiento de la invención.

30 Además de la detección de una molécula o sustancia diana determinada con alta sensibilidad, este procedimiento permite la detección de límites inferiores a 1 fM del ADN diana, el procedimiento de la invención permite determinar diferentes fenómenos que se producen entre la molécula detectada y el receptor, es decir, fenómenos relacionados con el modo en que las moléculas (receptora y diana) se asocian o se unen unas con otras.

35 Esto puede explicarse fácilmente mediante referencia a un caso específico, por ejemplo, cuando el procedimiento se aplica para detectar una molécula de ADN en una muestra. En tal caso, la superficie receptora puede funcionalizarse con moléculas sonda de ácido nucleico (normalmente, ADN), que sean complementarias a la molécula (la molécula completa o una parte específica de su secuencia) que se desea detectar en la muestra. Cuando existe el 100 % de complementariedad de secuencia entre la sonda y la diana, se producirá una hibridación total en la superficie del voladizo. Como se ha explicado anteriormente, posteriormente, el procedimiento implica el cambio de una condición determinada (tal como la humedad) para obtener la ‘huella digital’ de la molécula bajo valores variables de dicha condición (por ejemplo la humedad relativa). Sin embargo, si no existe el 100 % de complementariedad pero, por ejemplo, la molécula diana difiere en un único nucleótido (o incluso en dos o más nucleótidos en diferentes posiciones de apareamiento), la hibridación podría producirse de todos modos (según las condiciones experimentales) aunque la “huella digital” será diferente debido al comportamiento diferente del par sonda-diana. Esta aplicación es de mucha importancia en los campos de la biología molecular y la genómica, puesto que permite analizar las mutaciones o SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) presentes en un gen determinado o en genes determinados de un modo simple y eficaz.

40 Esta realización particular de la invención se puede considerar el ejemplo más claro y significativo, aunque el procedimiento es aplicable a la determinación de otros fenómenos asociativos entre moléculas, incluidas interacciones tales como anticuerpo-antígeno o aptámero-ligando, así como fenómenos de adhesión entre células,

célula-superficie, virus-célula, etc.

Debido a la elevada sensibilidad conseguida por el procedimiento de la invención (sensibilidad femtomolar), cuando se aplica a la detección de ácido nucleico, cabe la posibilidad de evitar la amplificación previa de la muestra. El etiquetado de la muestra también es evitable. Así, el procedimiento de la presente invención se aplica directamente en biotecnología sin necesidad de procesamientos de la muestra costosos, lentos y complicados.

En una realización preferente, la condición que varía es la humedad relativa (HR). Cuando la HR a la que está sometida la superficie receptora del elemento mecánico se varía, dicha característica mecánica se mide para distintos valores de HR, de modo que los datos referidos a dicha característica mecánica se obtienen para distintos niveles de humedad y la relación dichos datos y dichos niveles de humedad se usa para determinar si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancias y, en el caso de moléculas de ácido nucleico, si son total o parcialmente complementarias con las sondas inmovilizadas.

Se ha comprobado que la humedad relativa puede ser un parámetro especialmente útil en este contexto, ya que el cambio en la humedad relativa puede afectar sustancialmente a la interacción entre muchos tipos de moléculas cuando están unidas a una superficie. Los cambios en la humedad relativa se ajustan al número de moléculas de agua que rodean a las moléculas. El patrón de hidratación de biomoléculas representa un papel importante en su función biológica y su estructura. Además, la hidratación de las moléculas produce cambios en las interacciones entre las mismas, por ejemplo: fuerzas de hidratación, fuerzas dipolo- dipolo, fuerzas electroestáticas, fuerzas de Van der Waals, fuerzas de solvatación, etc.

Por lo tanto, cuando varía la humedad relativa, las propiedades mecánicas de la capa de moléculas acopladas a los receptores varían, induciendo de este modo cambios en las características mecánicas del elemento micromecánico. Por ejemplo, al variar la humedad también puede modificarse la curvatura de un voladizo, debido a la variación en el acoplamiento entre moléculas unidas a los receptores dispuestos en el elemento micromecánico.

En el procedimiento de la invención, la interferencia provocada por la presencia de una molécula diana en una muestra o la presencia de un determinado fenómeno asociativo entre el receptor y la molécula detectada proviene de la medición de a lo que se ha denominado característica mecánica en el contexto de la invención. Este término se refiere a una característica determinada que se mide en el elemento mecánico del biosensor cuando se induce algún cambio en sus propiedades mecánicas mediante el enlace de la molécula a la superficie receptora. La característica mecánica sobre la que realizar la medición puede seleccionarse a partir de la posición de una porción del elemento mecánico o al menos una característica de vibración del elemento mecánico o, preferentemente, la tensión de superficie de una porción del elemento mecánico.

En una realización preferente de la invención la etapa de medición de la característica mecánica comprende dirigir un haz de luz contra una superficie de dicho elemento mecánico, recibir un haz de luz reflejado en dicha superficie del elemento mecánico con un detector sensible a la posición (2 en la figura 8) dispuesto para producir al menos una señal de salida en respuesta a la recepción de dicho haz de luz. De todas las maneras, otros medios cualesquiera adaptados para medir la característica mecánica están, naturalmente, dentro del alcance de la presente invención tal como se dará cuenta fácilmente un experto en la materia.

Típicamente, el procedimiento de la invención se puede aplicar para la detección de casi cualquier tipo de sustancia, puesto que cada sustancia tendrá una "huella dactilar" clásica, aunque el procedimiento es especialmente útil en el campo de la biología, con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Entre las diferentes moléculas que se pueden detectar, el ADN, el ARN, las proteínas y los péptidos son moléculas dianas especialmente preferentes, ya que muestran un comportamiento muy fluctuante cuando cambia una condición experimental tal como la humedad relativa. El procedimiento también está adaptado para determinar y analizar fenómenos de asociación entre este tipo de moléculas, por ejemplo fenómenos de hibridación de ácidos nucleicos o fenómenos de unión anticuerpo-antígeno. En el caso de fenómenos de hibridación de ADN o ARN, pueden analizarse e identificarse desapareamientos en uno o más nucleótidos entre la sonda y la diana. Por lo tanto, este procedimiento es una herramienta poderosa para el análisis y la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de un modo sencillo y eficaz. Con respecto al fenómeno de unión antígeno-anticuerpo, puede analizarse la asociación anticuerpo-epítipo.

Por otra parte, el procedimiento también puede aplicarse a la detección de sustancias más complejas tales como bacterias, virus, células eucariotas, protozoos, etc. También pueden analizarse e identificarse fenómenos de asociación tales como fenómenos de adhesión célula-célula o virus-célula o bacteria-célula.

En una realización preferente de la invención el elemento mecánico es un microvoladizo y dicho microvoladizo forma parte de una serie de microvoladizos, realizándose el procedimiento en dicha serie de microvoladizos para detectar la presencia de una pluralidad de tipos de moléculas en una muestra, estando asociados dichos tipos de moléculas con diferentes microvoladizos de dicha serie de microvoladizos.

El segundo objeto de la invención se representa esquemáticamente en la figura 8 y representa un sistema para llevar a cabo el procedimiento de la invención. Es un sistema de inspección de superficie dispuesto para detectar el desplazamiento relativo y/o características de vibración de una pluralidad de puntos de una pluralidad de elementos

(51) que forman parte de una estructura mecánica (5), comprendiendo dicho sistema:

una fuente de luz (1) dispuesta para generar al menos un haz de luz (11);

un detector sensible a la posición (2) dispuesto para recibir el haz de luz cuando este se refleje en la estructura mecánica (5) y para producir al menos una señal de salida en respuesta a la recepción de dicho haz de luz;

5 un sistema de control electrónico (3);

medios de exploración (4) para determinar el desplazamiento relativo de dicho haz de luz con respecto a la estructura mecánica (5) para realizar un exploración de dicha estructura mecánica con el haz de luz, siguiendo las instrucciones del sistema de control electrónico (3);

10 en el que dicho sistema de control electrónico (3) está dispuesto para controlar dichos medios de exploración (4) para desplazar el haz de luz a lo largo de la estructura mecánica a lo largo de la primera trayectoria (etiqueta A en Fig. 8B), para detectar una pluralidad de posiciones de referencia posteriores (C) a lo largo de la primera trayectoria (A), estando asociado operativamente dicho sistema de control electrónico (3) con dicho detector sensible a la posición (2) para determinar dichas posiciones de referencia (C) como resultado de un análisis de al menos una señal de salida procedente de dicho detector sensible a la posición (2);

15 en el que dicho sistema de control electrónico (3) está dispuesto también para controlar los medios de exploración (4) para desplazar el haz de luz a lo largo de la estructura mecánica a lo largo de varias segundas trayectorias (B), estando asociada cada una de dichas segundas trayectorias con una de dichas posiciones de referencia (C);

20 estando dispuesto dicho sistema de control electrónico para obtener, durante el desplazamiento del haz de luz a lo largo de cada una de dichas segundas trayectorias (B), una pluralidad de señales de salida de posición procedentes del detector sensible a la posición (2) y estando caracterizado porque la estructura mecánica está dispuesta dentro de una cámara (6) con medios para variar y controlar una condición (7).

25 Este sistema es útil para llevar a cabo el procedimiento de la invención. En una realización preferente de la invención, el sistema comprende medios para variar o controlar la humedad relativa dentro de la cámara, aunque también son parte de la presente invención los medios para controlar otras condiciones tales como la temperatura, el pH y la fuerza iónica del fluido en el que está dispuesto el elemento micromecánico, el contenido relativo de una mezcla de gases o líquidos en la que está dispuesto el voladizo, la radiación a la que está sometida la superficie receptora, el campo eléctrico, el campo magnético, etc.

Breve descripción de los dibujos

30 Para completar la descripción y para proporcionar una mejor comprensión de la invención, se proporciona un conjunto de dibujos. Dichos dibujos forman una parte integral de la descripción e ilustran una realización preferente de la invención, que no debe interpretarse como restrictiva del alcance de la invención, sino solo como un ejemplo de como se realiza la invención. Los dibujos comprenden las siguientes figuras:

Las figuras 1, 2, 3A y 3B son vistas esquemáticas de un sistema diferente de la técnica anterior para la lectura del voladizo usando la técnica de la deflexión de haz óptico.

35 La figura 4 muestra la configuración experimental de la realización preferente de la invención.

La figura 5 muestra la gran histéresis de un voladizo sensibilizado a ADN_{mc} (ADN monocatenario) mientras se somete a un ciclo de hidratación-deshidratación, en comparación con una histéresis muy reducida del mismo con ADN_{bc} (ADN bicatenario) (tras una hibridación total sonda complementaria-diana) sometida al mismo ciclo de hidratación-deshidratación.

40 La figura 6. IZQUIERDA: Cambio en la tensión de superficie durante el ciclo de hidratación para ADN_{bc} en momentos diferentes y una concentración de la diana 1 pM. DERECHA: Variación de la tensión de superficie cuando la HR = 5 % para diferentes concentraciones (de 1 fM a 1000 fM) de la diana de ADN totalmente complementaria.

La figura 7 muestra una variación en la tensión de superficie en la superficie del voladizo durante la hidratación para tres secuencias diana de ADN desapareadas distintas.

45 La figura 8 representa un sistema de inspección de superficies según la invención. A representa la aplicación de todo el sistema y B el elemento mecánico.

Descripción de una realización preferente de la invención: un biosensor de ADN

50 Las micromatrices de ADN son una de las herramientas más importantes en la era posgenómica. Permiten una detección y una cuantificación de alto rendimiento de muchas moléculas de ácido nucleico, aunque estos ensayos requieren muchas etapas de prehibridación, de amplificación y de etiquetado fluorescente de la muestra diana que son costosas, lentas e implican una sensibilidad limitada. Además, el etiquetado de ADN diana puede afectar a sus

capacidades de reconocimiento molecular, y, paralelamente, la composición relativa de las moléculas diana detectables que se encuentran en la muestra analizada puede verse falseada [Levicky, R., Horgan, A. "Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies". Trends Biochem. 23, 143 (2005)].

5 De modo alternativo, nuestra investigación ha mostrado que la hibridación de ácido nucleico se puede medir rápidamente y con sensibilidad sin la necesidad de marcadores o de etapas de preamplificación midiendo la tensión de superficie generada por las interacciones intermoleculares entre los ácidos nucleicos anclados a la superficie de un microvoladizo en un sistema en el que se puede ajustar la humedad relativa.

10 El procedimiento de la presente invención muestra que la hibridación de ácido nucleico se puede medir rápidamente y con sensibilidad sin necesidad de marcadores o de preamplificación del ADN diana midiendo el efecto de la hidratación en las interacciones moleculares entre los ácidos nucleicos sonda anclados a la superficie de un microvoladizo antes y después de la hibridación con las moléculas diana. La técnica propuesta proporciona sensibilidad subfemtomolar en volúmenes de muestra de pocos microlitros, lo que asegura una sensibilidad de al menos tres órdenes de magnitud mejor que la de micromatrices de ADN estándar actuales usadas en aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Además, la transcripción nanomecánica de la evolución de fuerzas intermoleculares mediante la hidratación de la biocapa de ADN permite discernir entre ADNbc perfectamente apareado y desapareado en un solo nucleótido a temperatura ambiente.

1- Descripción de la técnica

15 La configuración experimental se representa en la figura 4 y en la figura 8. Se eligió como un modo alternativo para mejorar la sensibilidad de sensores de ADN nanomecánicos, para modular externamente las interacciones entre las moléculas adyacentes de ADN ancladas al voladizo mientras se realiza un seguimiento del proceso de cómo cambia la tensión de superficie. Las sondas de ADN monocatenarias se inmovilizaron en un lado recubierto con oro de los microvoladizos mediante un enlace de tiol. En una realización particular de la invención, se utilizó una sonda de ADNmc de 16 nt de longitud con la secuencia 5'-HS-CTACCTTTTTTTCTG-3'. Después de un tiempo de inmovilización largo (de 12 a 24 horas) el ADNmc formó una capa muy empaquetada con una densidad superficial del orden de 10^{13} cm⁻², determinada mediante experimentos de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Estas densidades se corresponden con distancias inter-ADN inferiores a 0,3 nm. En este intervalo de separación, las fuerzas intermoleculares están dominadas por fuerzas repulsivas de hidratación que son consecuencia de la perturbación de la red de enlaces de hidrógeno que rodea las moléculas de ADN. Las fuerzas de hidratación aumentan de modo exponencial con una distancia característica de 0,25-0,35 nm. La cubierta de hidratación primaria está formada por 30 moléculas de agua por par de nucleótidos, y esa capa de agua está en estado intermedio entre el agua líquida y el hielo [M. Rovere y P. Gallo, "Effects of confinement on static and dynamical properties of water", Eur. Phys. J. E. 12, 77-81 (2003) y N. Floquet, J. P. Coulomb, N. Dufau, G. Andre, & R. Kahn, "Structural and dynamic properties of confined water in nanometric porous materials", Physica B 350, 265-269 (2004)]. Esta primera cubierta de hidratación representa un papel clave en la función biológica y en las interacciones intermoleculares. En base a este conocimiento previo, se desarrolló un enfoque novedoso para profundizar en la caracterización físico-química de la hidratación de ADN unido a superficie y, paralelamente, para mejorar la sensibilidad de los biosensores basados en microvoladizos. Se demostró que es posible modular externamente las fuerzas de hidratación disponiendo en primer lugar los microvoladizos recubiertos con ADN en una atmósfera de nitrógeno seco y, después, controlando el grado de hidratación ajustando la humedad relativa con la entrada de nitrógeno. Este procedimiento, aplicado en un sistema para la inspección de superficies según la presente invención, permite observar el cambio de la tensión de superficie inducido por hidratación con una sensibilidad sin precedentes de una molécula de agua por nucleótido.

La secuencia de experimentos realizados en los ensayos es:

- 45 i) medir la tensión de superficie inducida por la hidratación/deshidratación de voladizos funcionalizados con ADNmc cambiando la HR (humedad relativa) del 0 al 100 % e inversamente;
- ii) exponer el voladizo funcionalizado a una muestra de solución de ácido nucleico que puede contener: a) la molécula diana de ADNmc completamente complementaria; b) una diana de ADNmc con (de uno a tres) desapareamientos ;c) un ADNmc no complementario (control negativo); después se limpia y se seca el voladizo y
- 50 iii) medir la tensión de superficie a medida que el sistema se somete a un segundo ciclo de hidratación/deshidratación.

En una realización particular de la invención, la molécula completamente complementaria de ADNmc muestra la secuencia 5'-CAGAAAAAAGGTAG-3', mientras que las secuencias desapareadas son: 1) diana "T" con un único desapareamiento T/T cerca de la posición central del dúplex (secuencia 5'-CAGAAAATAAGGTAG-3'); 2) diana "TTT" con tres desapareamientos T/T posteriores a la posición central (secuencia 5'-CAGAAATTTAAGGTAG-3'); 3) diana "T...T...C con tres únicos desapareamientos T/T, T/T y C/C separados por tres pares de bases (secuencia 5'-CAGTAAATAACGTAG-3'). Las temperaturas de hibridación teóricas para estas secuencias son 34 ± 1 °C, 15 ± 1 °C y 11 ± 4 °C, respectivamente, en cambio es de 43 ± 1 °C para la secuencia diana completamente complementaria. El ADNmc no complementario (control negativo) tenía la secuencia 5'-AGCTTCCGTACTIONCGAT-3'.

II- Inmovilización e hibridación

La respuesta de un voladizo sensibilizado al ADNmc a un ciclo de hidratación-deshidratación muestra una histéresis elevada, en cambio para los voladizos que se han sometido a una hibridación completamente complementaria la histéresis se reduce enormemente (véase la figura 5). Se sabe que las capas de ADN completamente hibridadas presentan propiedades de impermeabilización debido a las constricciones estéricas dadas por las moléculas densamente empaquetadas en la capa, mientras que la capa de ADNmc es proclive a la intercalación de moléculas de agua dentro del biopolímero, lo cual explicaría la gran tensión de tracción que se observa cuando la capa se hidrata [J. Mao, S. Chang, S. Yang, Q. Ouyang y L. Jian, "Tunable non-equilibrium gating of flexible DNA nanochannel in response to transport flux, Nature Nanotechnology 2, 366-371 (2007) y B. Schneider y H. M. Berrnan, "Hydration of the DNA bases is local", Biophys. J. 69, 2661-2669 (1995)]. Para el voladizo sensibilizado (ADNmc), la tensión superficial sufre una acusada subida (de tracción) durante la hidratación inicial hasta alcanzar una humedad relativa del 5 %. Luego la tensión superficial decrece hasta ser relativamente independiente de la hidratación con HR > 60 %.

Es interesante realizar un seguimiento de la respuesta de la capa de ADNmc en función del tiempo cuando se sumerge en una solución muy diluida de ADNmc complementario. La fig. 6A muestra la tensión de superficie frente a la humedad para un voladizo de silicio sensibilizado con el ADNmc sonda (guión), y para el mismo voladizo sensibilizado tras su exposición a una diana de ADN complementaria con una concentración de 1 pM y distintos períodos de exposición (de 0 h a 8 h) en un tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH = 7,5) a una temperatura de 21 °C. El voladizo hibridado logra una respuesta asintótica para exposiciones sonda-objetivo superiores a 6 horas. La tensión de superficie decrece monótonamente (compresiva) hasta alcanzar aproximadamente 0,2 N/m del estado de deshidratación al de hidratación, produciéndose la mayor disminución entre HR = 0 % y 25 %. La respuesta de la sonda de ADNmc unida al ADNmc complementario a exposiciones para períodos de exposición más cortos muestra un comportamiento intermedio, en el que se observan dos picos a una HR del 10-20 % y del 30-40 % respectivamente. Estos picos podrían corresponder a transiciones estructurales en el ADN de doble hélice (formas A a B).

La capa complementaria completamente hibridada de ADN (ADNbc) muestra un comportamiento muy diferente durante el ciclo de hidratación-deshidratación. La histéresis se reduce, por la ausencia de tensión compresiva durante el ciclo de hidratación a baja HR. Esta diferencia fundamental surge de las interacciones de ADN con moléculas de agua intercaladas que forman una estructura estabilizadora con el esqueleto de ADN y las bases nitrogenadas. Además, la respuesta compresiva de ADNbc a una HR baja (cuyo rango es del 0-5 %), de modo contrario a la tensión de tracción en una capa de ADNmc sin hibridar, puede estar relacionada cualitativamente con la hibridación de la sonda de ADNmc con la molécula diana. Este efecto habla sobre el alto rendimiento del sistema para aplicaciones biosensoras.

III- Sensibilidad y especificidad del sistema

Entre los diferentes parámetros que se pueden medir en un ciclo de hidratación-deshidratación, hemos hallado que la tensión de superficie durante la primera fase de hidratación es muy sensible a la forma del ADN, es decir, ADNmc sin hibridar y ADNbc hibridado. Por lo tanto, hemos elegido esta para que sea el parámetro de medición del biosensor. En la figura 6B representamos la variación de la tensión de superficie a una HR=5 % con respecto a la respuesta de un control negativo de ADNmc completamente no complementario, que es idéntica a la respuesta del voladizo sensibilizado, como función del tiempo de hibridación para concentraciones diana distintas. En todas las curvas, la tensión de superficie decrece rápidamente durante las primeras tres horas de exposición a la secuencia complementaria. Lo que es más importante, se halló que la técnica es capaz de detectar una concentración de ADN 1 fM en periodos de exposición de una hora, siendo la señal detectada de 100 mN/m. Esta es muy superior al 1 mN/m de ruido de detección del sistema. Relacionamos esta sensibilidad sin precedentes a la congestión estérica física. En monocapas altamente empaquetadas de ADNmc, la formación de un número relativamente pequeño de dúplex pueden tener un efecto importante en las propiedades colectivas de la película de ADN, debido a la naturaleza exponencial y cooperativa de las fuerzas de hidratación. Finalmente, para caracterizar la especificidad del biosensor desarrollado, expusimos las voladizos sensibilizadas a tres secuencias diana desapareadas con una concentración superior a 1 μM (Fig. 7). Como se ha mencionado anteriormente, se diseñaron tres ADNmc diana desapareados: la diana "T" (con un único desapareamiento central T/T), el objetivo "TTT" (con tres desapareamientos T/T posteriores en posición central) y la diana "T...T...C", (con tres únicos desapareamientos T/T, T/T y C/C, separados por tres pares de bases A/T).

En estos experimentos, mientras que en el caso del ADN totalmente complementario la tensión de superficie disminuye con la humedad relativa, todos los ADN desapareados proporcionan un aumento inicial de la tensión de superficie (de tracción). De forma interesante, este pico de tensión de superficie de tracción aparece en todas las secuencias desapareadas estudiadas, pero el pico aparece a distintas humedades relativas. Como la hibridación se realizó en todos los experimentos a 21 °C, no se esperan variaciones significativas en el rendimiento de hibridación de las secuencias completamente complementarias y de un único desapareamiento (los cálculos teóricos muestran que la temperatura discriminadora para estas dianas debería oscilar dentro de un intervalo de 34-43 °C). Proponemos que esta tensión de tracción inducida por la hidratación inicial se debe a la estabilización de una "burbuja" inducida por desapareamiento en el dúplex mediante enlace de oxígeno. Como consecuencia, una

característica relevante del procedimiento desarrollado es que, a diferencia de lo que ocurre con las micromatrices de ADN y otros biosensores actuales, el comportamiento diferencial de la diana desapareada no se relaciona con su tendencia a deshibridar a una temperatura de trabajo finamente regulada y optimizada, sino con la interacción particular de la “burbuja” inducida por desapareamiento con las moléculas de agua a cualquier temperatura bastante inferior a su temperatura de fusión.

5

En conclusión, las fuerzas intermoleculares en monocapas de ácidos nucleicos dependen de forma crítica del grado de hidratación. La baja permeabilidad de las monocapas de ADNmc hace que la hibridación de aproximadamente una molécula objetivo por millón de sondas produzca un efecto dramático en el patrón de la tensión con respecto a la hibridación. Este principio permite también discriminar mutaciones puntuales e incluso distinguir entre diferentes secuencias desapareadas. Ningún biosensor capaz de detectar muestras diana sin etiquetar ha alcanzado la sensibilidad sin precedentes conseguida mediante la hidratación de capas de ADN. Anticipamos que nuestros experimentos son un punto de partida en la determinación rápida y directa de genotipos o realización del mapa SNP a temperatura ambiente, sin necesidad de amplificar la muestra ni de etiquetarla. Además estos nuevos fenómenos pueden explotarse en aplicaciones potenciales únicas en nanofluidos, en administración de fármacos y en detección.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de un tipo seleccionado de moléculas o sustancia en una muestra que comprende las etapas de:

5 a) poner en contacto la superficie receptora de un elemento micromecánico con la muestra, estando dispuesta dicha superficie receptora para interactuar con dichas moléculas o sustancia cuando dichas moléculas o sustancia están presentes en dicha muestra, estando dispuesto el elemento micromecánico de modo que al menos una característica mecánica detectable de dicho elemento cambia cuando dicha superficie receptora interactúa con dichas moléculas o sustancia;

b) medir dicha característica mecánica para obtener datos referidos a dicha característica mecánica;

10 c) determinar, en base a dichos datos, si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancia;

en el que

15 al menos una condición a la que al menos la superficie receptora del elemento micromecánico está sometida, se varía, con lo que dicha característica mecánica se mide una pluralidad de veces, de modo que los datos referidos a dicha característica mecánica se obtienen para diferentes valores de dicha condición, con lo que la relación entre dichos datos y dichos valores de la condición son usados para determinar si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancia o para determinar si existen fenómenos asociativos entre la superficie receptora y las moléculas o sustancia detectadas,

20 en el que dicha característica mecánica es seleccionada de entre la curvatura de una porción del elemento micromecánico, la posición de una porción del elemento micromecánico, al menos una característica de vibración del elemento micromecánico o tensión superficial en una porción del elemento mecánico, en el que dichas moléculas son moléculas de ácidos nucleicos y proteínas o péptidos y dichas sustancias son células eucariotas, bacterias, virus o viroides,

y en el que

dicha condición es al menos humedad o humedad relativa.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha condición es solo humedad o humedad relativa, de modo que se varía la humedad a la que se somete la superficie receptora del elemento micromecánico, con lo que dicha característica mecánica se mide para distintos valores de la humedad, de modo que los datos referidos a dicha característica mecánica se obtienen para diferentes niveles de humedad, con lo que la relación entre dichos datos y dichos niveles de humedad se usa para determinar si la muestra contiene dicho tipo de moléculas o sustancia.

30 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento micromecánico es un microvoladizo, siendo una superficie de dicho microvoladizo la superficie receptora.

35 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el fenómeno asociativo determinado es un fenómeno de hibridación ADN-ADN, una hibridación ADN-APN, una hibridación ADN-ARN, una hibridación APN-ARN, una interacción anticuerpo-antígeno que implica un anticuerpo policlonal o monoclonal, una interacción aptámero-ligando, una interacción enzima-sustrato, una interacción ribozima-sustrato, una interacción proteína-ligando, un fenómeno de adhesión célula-célula, un fenómeno de adhesión virus-célula, un fenómeno de adhesión viroide-célula o un fenómeno de adhesión bacteria-célula eucariota.

40 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el fenómeno asociativo determinado es un fenómeno de hibridación de ADN **caracterizado porque** contiene uno o más desapareamientos de nucleótidos entre la sonda y la diana.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el fenómeno asociativo determinado es un fenómeno anticuerpo-antígeno que consiste en una asociación anticuerpo-epítipo.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho microvoladizo es parte de una serie de microvoladizos, realizándose el procedimiento en dicha serie de microvoladizos para detectar la presencia de una pluralidad de diferentes tipos de moléculas en la muestra, estando asociados dichos diferentes tipos de moléculas con diferentes microvoladizos de dicha serie de microvoladizos.

50 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de medición de la característica mecánica comprende dirigir un haz de luz contra una superficie de dicho elemento micromecánico, que recibe un haz de luz reflejado por dicho elemento micromecánico con un detector sensible a la posición (2) dispuesto para producir al menos una señal de salida en respuesta a la recepción de dicho haz de luz.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que además de la humedad o la humedad relativa se varía otra condición seleccionada entre el pH y la fuerza iónica del fluido en el que está

dispuesto el elemento micromecánico, el contenido relativo de una mezcla de gases o líquidos en la que está dispuesto el elemento micromecánico, la radiación a la que se somete la superficie receptora, el campo eléctrico o el campo magnético.

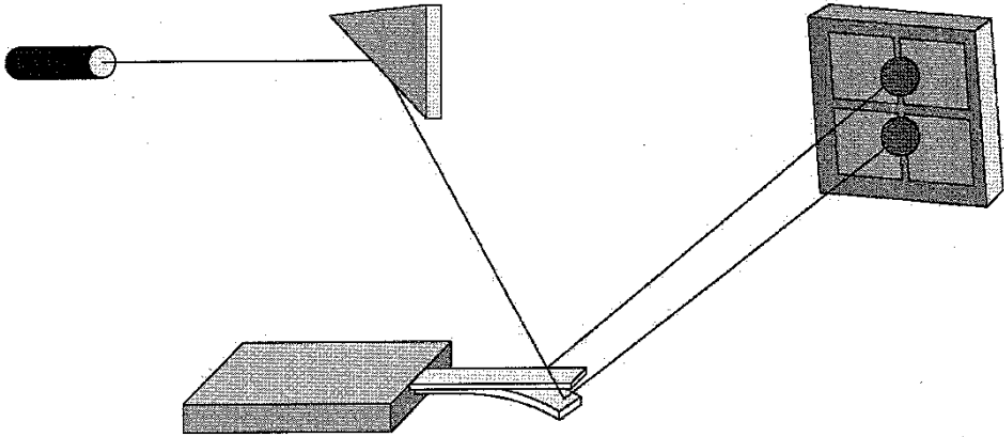


FIG. 1

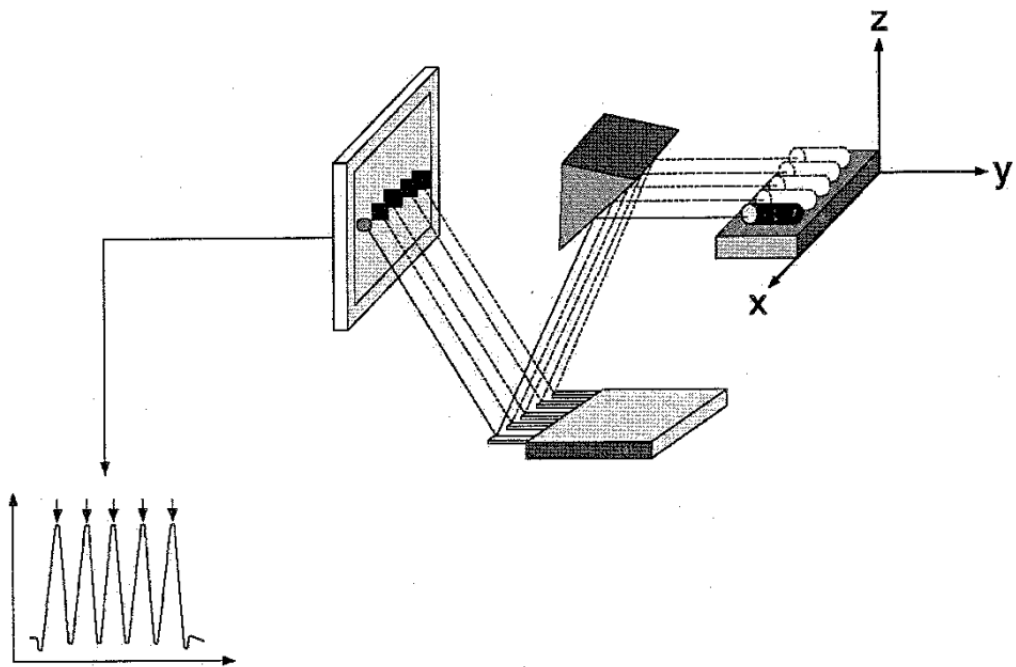


FIG. 2

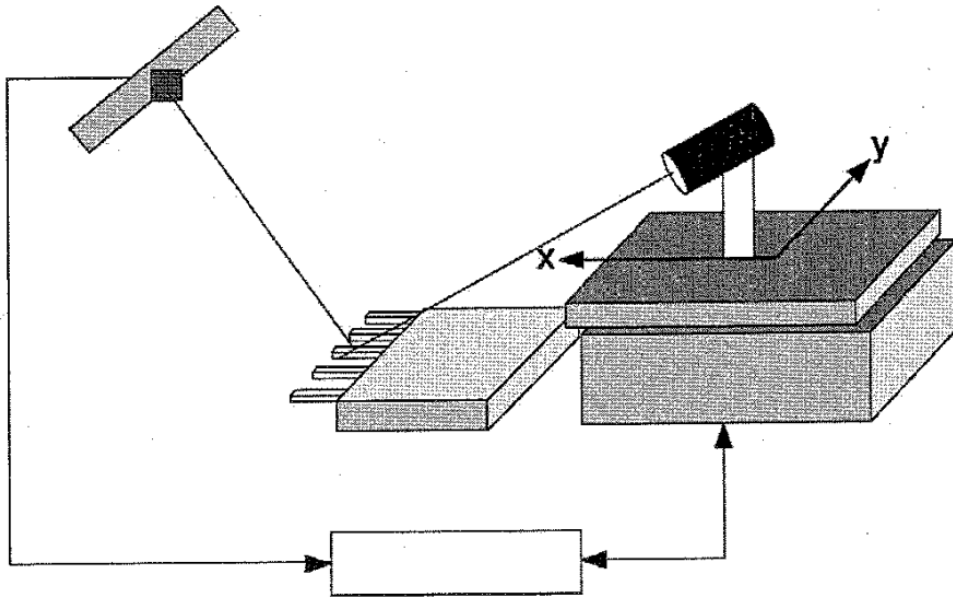


FIG. 3A

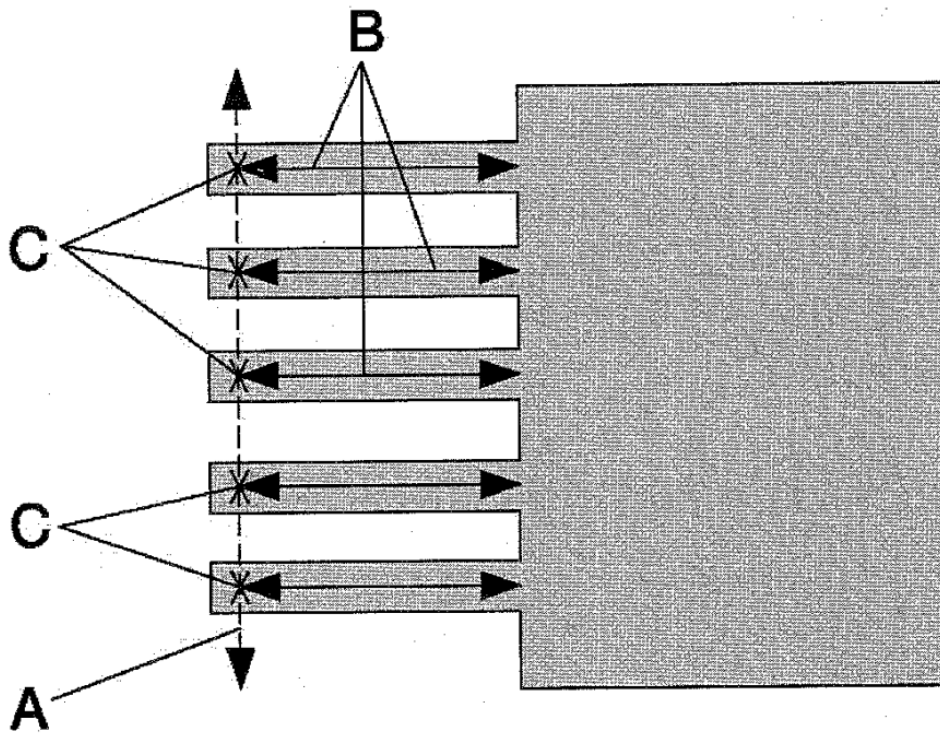


FIG. 3B

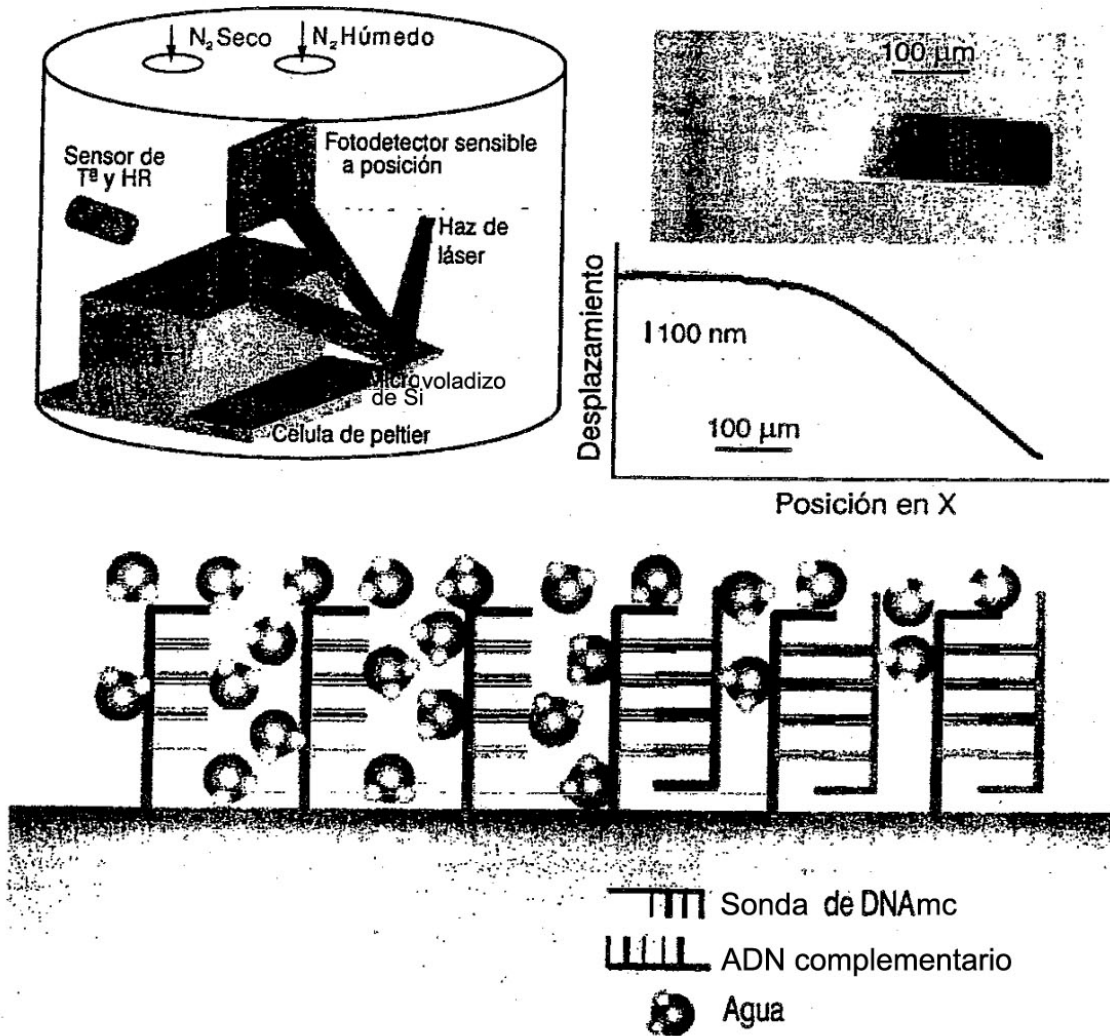


FIG. 4

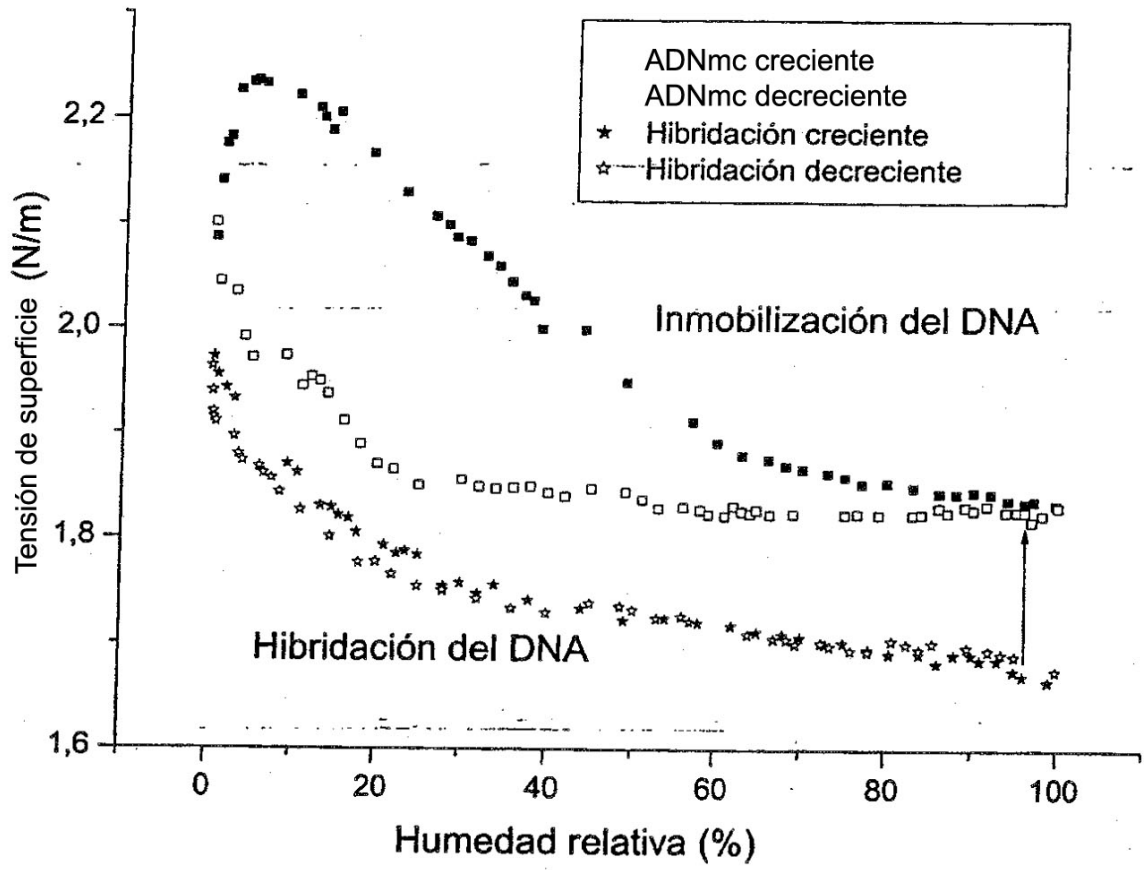


FIG. 5

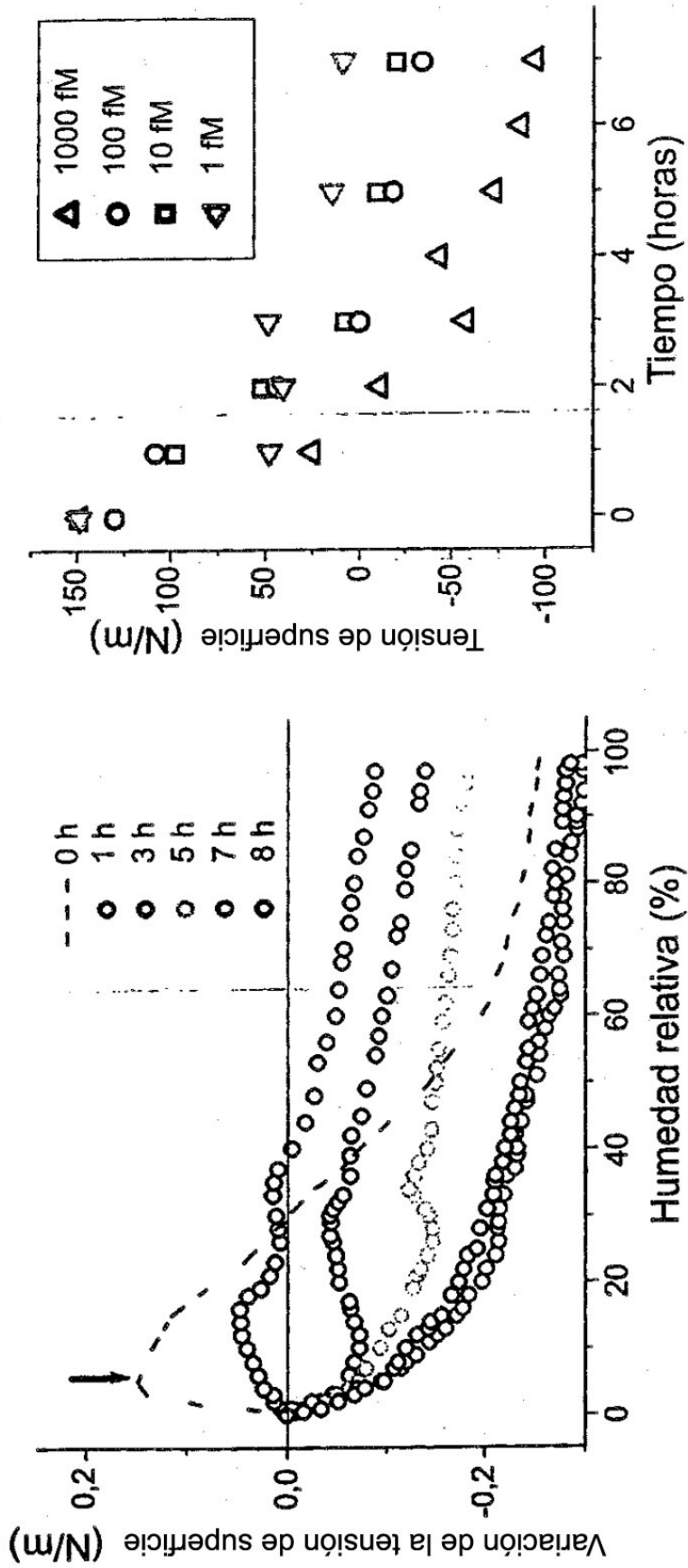


FIG. 6

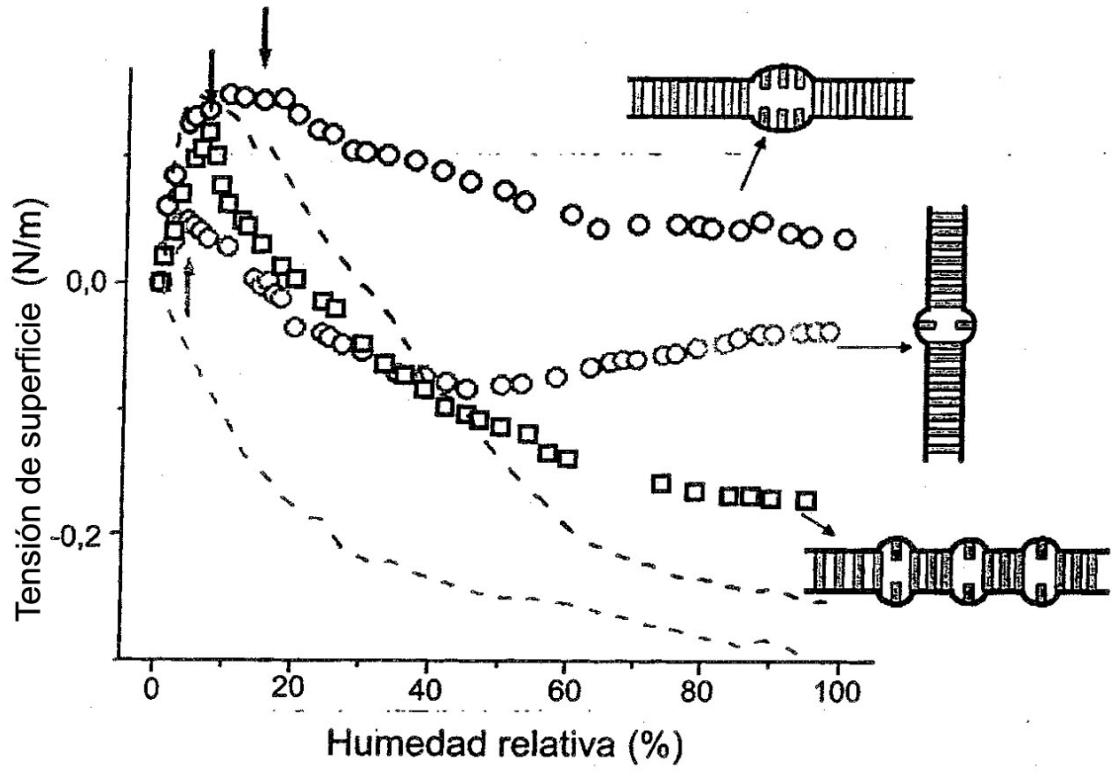


FIG. 7

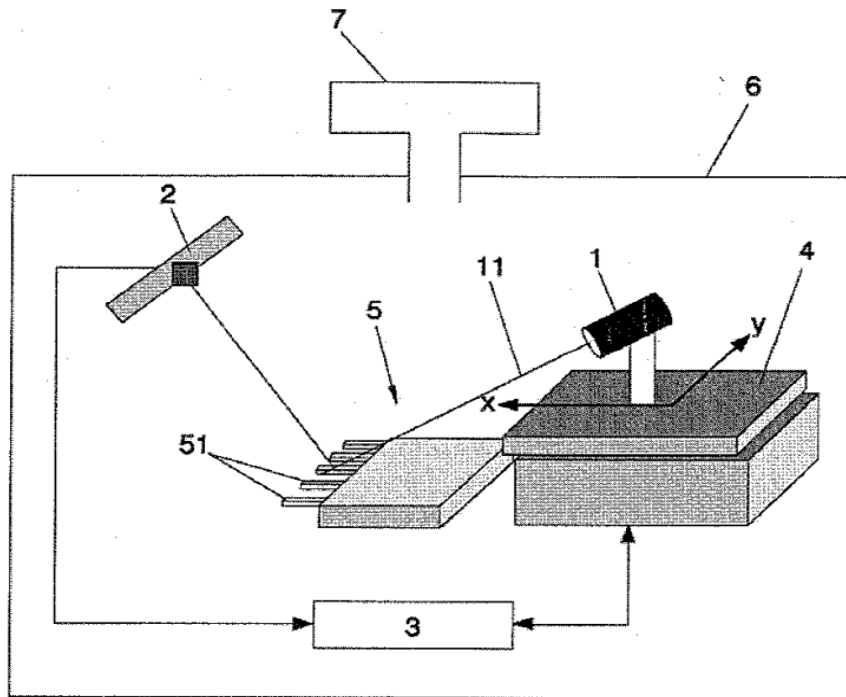


FIG. 8A

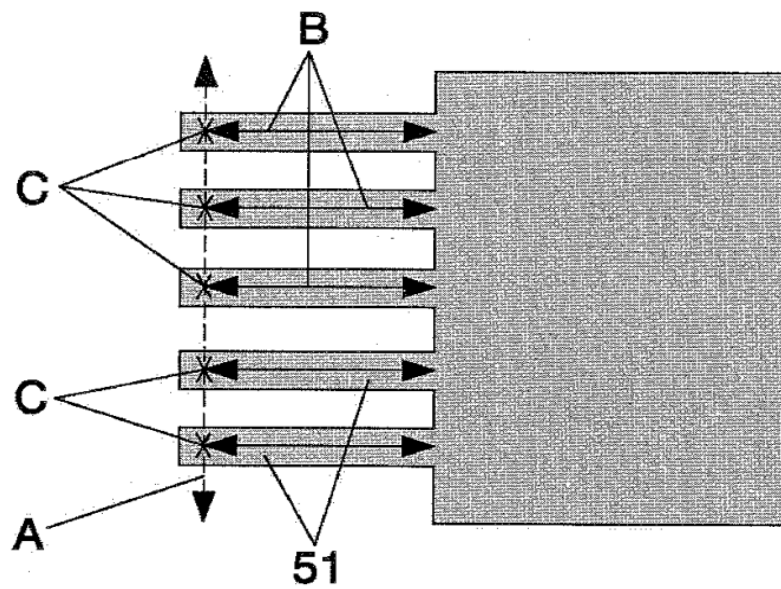


FIG. 8B