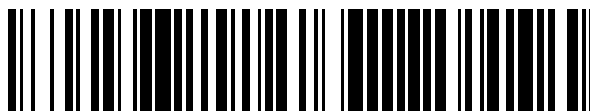


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 767**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2010 E 10382010 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2348132**

54 Título: **Procedimiento de bioanálisis de moléculas de ácido nucleico en una muestra y biosensor para su implementación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2014

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (100.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MONTEIRO KOSAKA, PRISCILA;
MERTENS, JOHANN;
TAMAYO DE MIGUEL, FRANCISCO JAVIER y
CALLEJA GÓMEZ, MONTSERRAT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 767 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 de bioanálisis de moléculas de ácido nucleico en una muestra y biosensor para su implementación

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de biosensores de ácidos nucleicos. Más específicamente, se refiere a un procedimiento de bioanálisis de un tipo seleccionado de molécula de ácido nucleico en una muestra en base al comportamiento de un elemento de oro/silicio funcionalizado con capas de ácido nucleico cuando se somete a ciclos de temperatura, siendo el comportamiento de las capas diferente cuando la molécula diana está en la muestra (cuando hay hibridación) o no. El procedimiento de la invención también puede distinguir la presencia de apareamientos erróneos únicos en las moléculas diana. La invención también se refiere al sistema para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

Estado de la técnica

Los biosensores de ácidos nucleicos son herramientas importantes en diferentes áreas tales como biología molecular y genómica funcional. Por ejemplo, cada vez se han vuelto más útiles para la detección de enfermedades y patógenos.

15 En el campo específico de los biosensores de ácidos nucleicos, un tipo muy conocido de biosensor de ácidos nucleicos se basa en la inmovilización de una capa de ácidos nucleicos (algunas veces denominada sonda de ácido nucleico), con una secuencia elegida para unirse específicamente a una molécula diana, sobre un soporte sólido. Entonces se expone esta capa a una muestra en la que pueden estar presentes las moléculas diana (ácidos nucleicos complementarios). Habitualmente, tras la exposición de la superficie del sensor a la muestra, se aclara cuidadosamente el sensor con diferentes disoluciones tampón con el fin de eliminar moléculas que no son diana que pueden haber interactuado con la sonda de ácido nucleico. También es común usar la temperatura para eliminar esta clase de interacciones no específicas.

20 Por ejemplo, si la sonda de ácido nucleico comprende un ADN monocatenario (ADNmc), las moléculas que se unirán al mismo con mayor afinidad serán ADN monocatenario con la secuencia complementaria (según las reglas de Watson-Crick, A con T y G con C). Sin embargo, habitualmente las muestras son una compleja mezcla de secuencias diferentes de ADNmc (o ARN) que pueden contener regiones que pueden ser complementarias a una región de la sonda de ADN monocatenario. Esto da lugar a la formación de uniones no específicas entre la sonda y moléculas que no son diana. Dado que la fuerza de estas uniones tiende a ser más débil que las uniones entre la sonda y las moléculas diana, el control de la temperatura es útil para desprender las moléculas que no son diana de la sonda de ácido nucleico, es decir, de la superficie del biosensor. Por tanto se aumenta la temperatura hasta un valor algo inferior a la "temperatura de fusión" de la unión sonda-y-diana, "desprendiendo" o "eliminando" así sólo las moléculas que no son diana. Se ha encontrado que esta clase de control de la temperatura es útil para distinguir la presencia de moléculas diana de la presencia de secuencias con un apareamiento erróneo único con la sonda de ADN.

35 Actualmente se usan sensores de ácidos nucleicos en formatos de matriz (con frecuencia denominados matrices de ADN), de tal manera que se inmovilizan miles de sondas de ácidos nucleicos sobre soporte sólido usando técnicas de microdispensación. Por tanto, se puede estudiar por ejemplo la expresión génica diferencial entre células sanas y células enfermas y se pueden determinar los genes responsables de una enfermedad.

40 La detección de la interacción entre las sondas de ácidos nucleicos sobre el soporte sólido y las moléculas complementarias (tales como las moléculas diana) se realiza con frecuencia mediante microscopía de fluorescencia. Esto requiere un tratamiento previo de la muestra con tintes fluorescentes.

45 Recientemente, el uso de microsoportes flexibles tales como micropalancas ha hecho posible medir la unión entre ácidos nucleicos complementarios directamente, sin necesidad de marcadores fluorescentes. De ese modo, se puede ahorrar tiempo y dinero, y se puede reducir el riesgo de errores humanos en la tediosa etapa de etiquetar la muestra. En estos dispositivos de microsoporte, se miden las interacciones biológicas mediante la flexión, la deformación, el alargamiento y/o propiedades resonantes del soporte flexible.

50 Estos sistemas de microsoporte incluyen sistemas basados en palancas que tienen un extremo fijo y un extremo móvil; en estos sistemas, habitualmente lo que se detecta es el desplazamiento y/o movimiento del extremo "libre". Sin embargo, también hay sistemas basados en palancas sujetas en ambos extremos, en los que se puede detectar el movimiento de la parte central. Además, hay otras micro y nanoestructuras mecánicas que son móviles y flexibles, tales como paletas con doble sujeción cuya dirección de movimiento "fácil" corresponde a la torsión de la paleta alrededor del eje de las bisagras que conectan la paleta a un marco (básicamente, como una raqueta cuadrada sujeta a un marco mediante dos mangos opuestos de la raqueta, que se extienden a lo largo de un eje). Otros sistemas conocidos utilizan membranas que están conectadas a un marco a través de dos conjuntos de bisagras, lo que permite dos grados angulares de libertad. En sensores químicos/biológicos basados en esta clase de sistemas, la superficie del micro o nanoelemento mecánico se sensibiliza con las moléculas de receptor o "sonda" que reconocen selectivamente la sustancia a la que se dirigen. Por tanto, la interacción entre la sonda inmovilizada y la

sustancia a la que se dirige sobre la superficie del micro o nanoelemento mecánico produce un cambio de la forma, el perfil, el alargamiento, el esfuerzo y/o el movimiento (vibración) del elemento mecánico. Este cambio se controla habitualmente midiendo el desplazamiento de una parte representativa del elemento mecánico (habitualmente el extremo libre de una micropalanca con una única sujeción, aunque también puede ser el centro de una micropalanca con doble sujeción, una parte de una lámina de membrana, etc.). Este desplazamiento puede ser del orden de aproximadamente 1-100 nanómetros (nm) y en muchos casos es necesario obtener una resolución mejor que 1 nm, dependiendo de la aplicación. Para la lectura del desplazamiento, hay varias técnicas tales como detección capacitiva, detección basada en la corriente túnel, interferometría óptica, lectura piezorresistente y la técnica de desviación del haz óptico.

10 Se divulgan ejemplos de MMS (micro o nanosistemas mecánicos) y sistemas de micropalanca, por ejemplo en:

Engel et al, "Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work", Trends in Cell Biology, volumen 9, págs. 77-80 (1999).

P. Vettiger et al, "The millipede-more than one thousand tips for future AFM storage", IBM J. Res. Develop., volumen 44, número 3, págs. 323-339 (2000).

15 Documento WO-A-2001/33226

Documento WO-A-2003/091458

Documento WO-A-2005/086172

Documento WO-A-2007/006834

20 Con frecuencia, el rasgo mecánico (características de vibración, desplazamiento del haz) se controla en tiempo real durante el desarrollo de la interacción entre las moléculas de sonda inmovilizadas y la diana o cuando se rompe la interacción. Un ejemplo típico es la detección de los cambios en el rasgo mecánico mientras se pone la sonda en contacto con la muestra (normalmente, un fluido que puede contener las moléculas diana) y las moléculas diana se unen a la sonda. Otro ejemplo es la realización de experimentos de fusión con ADN, en los que se observa un rasgo mecánico mientras se aumenta la temperatura hasta o más allá de la temperatura para la separación de ciertas cadenas de ADN, mediante lo cual se produce el desprendimiento de las moléculas diana (*Nanomechanical Detection of DNA Melting on Microcantilever Surfaces; S.L. Biswal, D. Raorane, A. Chaiken, H. Birecki, A. Majumdar, Analytical Chemistry 78, 7104-7109 (2006).*)

Ahora bien, los sistemas de la técnica anterior parecen implicar ciertos problemas. Por ejemplo:

30 - Algunas veces, el "cambio" detectado en el rasgo mecánico (tal como el desplazamiento de una parte de un elemento mecánico) surge debido a otros factores y no debido a la interacción entre la superficie receptora y las moléculas diana. Por ejemplo, el cambio se puede producir mediante interacciones no específicas de moléculas que no son diana con la sonda, pequeñas variaciones en la temperatura, pequeñas fluctuaciones en las concentraciones de iones en la muestra líquida, turbulencias fluidas, lentas variaciones con el tiempo en las posiciones de los elementos ópticos que detectan el desplazamiento del elemento mecánico, etc.

35 - Además, con el fin de detectar el cambio, a menudo es necesario controlar el 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 se detecta mientras tiene lugar. Se deben medir datos relativos al rasgo tanto antes como después del cambio exactamente en las mismas condiciones, sin eliminación del elemento mecánico de la disolución. La eliminación y sustitución del elemento mecánico o cualquier otro cambio menor en las condiciones implica la pérdida de referencia para la medición.

40 - Las mediciones en tiempo real implican la necesidad de realizar la detección óptica del rasgo mecánico mientras el elemento mecánico está sumergido en el líquido. La detección en líquido es tecnológicamente difícil. La respuesta mecánica siempre muestra una desviación. Es muy sensible a cambios en la presión del líquido, pequeñas diferencias de temperatura entre la disolución de fondo y la disolución de muestra inyectada, inestabilidades en el momento de la inyección y retrasos en la respuesta derivados de la difusión de las moléculas diana en el líquido.

45 - Además, la magnitud del cambio (tal como un cambio en la curvatura) puede ser bastante pequeña, lo que obviamente hace que la detección sea una tarea aún más difícil.

50 - Los experimentos de fusión se realizan en entorno líquido. Se basan en el hecho de que la doble hélice se puede separar a una temperatura definida que depende de la concentración iónica del medio, la composición de bases y la longitud del ADN. Esto implica que variaciones imperceptibles en la concentración iónica, que en muchos casos pueden no ser controlables, desviarán la medición de la temperatura de fusión y degradarán la respuesta del sensor.

- Muchos de los procedimientos de la técnica anterior, si no todos, a los que se hizo referencia anteriormente se basan en la detección en entornos líquidos. Esto implica la necesidad de sistemas microfluidos para evitar el uso

de grandes cantidades de muestras valiosas. La formación de burbujas en estos sistemas es una dificultad añadida durante las mediciones.

El documento WO-A-2009/053195 divulga un procedimiento diferente que permite la detección “*ex situ*”, es decir, no divulga un procedimiento de detección en tiempo real. Básicamente, según este procedimiento, en primer lugar se sensibiliza el elemento mecánico con la capa receptora, y posteriormente se incuba con la disolución de muestra de modo que puede tener lugar la interacción diana-receptor. No se realiza un seguimiento de la interacción en tiempo real, es decir, no se controlan los cambios en el rasgo mecánico relevante mientras está teniendo lugar la interacción entre la diana y la sonda. En vez de eso, la detección se realiza *ex situ*. La característica distintiva para la detección de las moléculas diana es la respuesta distinta de la biocapa que ha reaccionado y la que no ha reaccionado con respecto a cambios en una condición; básicamente, se mide un rasgo mecánico (desplazamiento, vibración, etc.) para una pluralidad de “valores” diferentes de la condición, y se usa la relación entre el rasgo mecánico y los “valores” diferentes de la condición para determinar, por ejemplo, si una molécula diana está presente en la muestra. Es decir, se usa la “relación” entre los valores de la condición y los datos medidos con respecto al rasgo mecánico como una clase de “huella” para detectar, por ejemplo, la presencia de una molécula diana en la muestra. El documento WO-A-2009/053195 también menciona algunos ejemplos de “condiciones” que pueden variar, incluyendo temperatura, humedad relativa, pH y concentración iónica de un fluido en el que se coloca el elemento mecánico, el contenido relativo de una mezcla de gases o líquidos en la que se coloca el elemento mecánico, radiación, campo eléctrico o campo magnético. Sin embargo, el único ejemplo tratado en cierta medida usa la humedad relativa como la condición sometida a cambios. No resulta directamente evidente a partir del documento WO-A-2009/053195 como se podrían usar las demás “condiciones”.

En lo que se refiere a la humedad relativa, el control de la humedad relativa en la proximidad de un sensor de micropalanca de ácidos nucleicos hace posible detectar específicamente ADN con una sensibilidad femtomolar, cuatro órdenes de magnitud mejor que con las matrices de ADN convencionales. El origen de la flexión de la palanca está en las fuerzas en el plano que surgen cuando moléculas de agua se adsorben en la capa de ácido nucleico muy empaquetada. Estas fuerzas son resultado de una compleja interacción entre fuerzas electrostáticas entre moléculas de ADN ancladas a palanca (el ADN es una molécula muy cargada), fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y la elasticidad entrópica conformacional de las moléculas de ADN. A pesar de su complejidad, el patrón de la flexión de la palanca frente a la humedad relativa (una medición relativa de la adsorción de agua en la biocapa) es extremadamente sensible al grado de hibridación y a la presencia de desapareamiento de una sola base.

Ahora, los autores de la presente invención han descubierto que monocapas autoensambladas de ADN monocatenario y bicatenario muestran propiedades térmicas extraordinarias en intervalos de temperatura próximos a la temperatura ambiente (es decir, a temperaturas en las que no se produce la fusión). Los autores han descubierto que capas de ADN_{mc} y ADN_{bc} muestran grandes coeficientes de expansión térmica negativos en dichos intervalos de temperatura. Los inventores también han observado que la expansión/contracción de las capas de ADN muestra un comportamiento reversible con cierta histéresis.

Este descubrimiento representa la base de la presente invención. Los inventores han usado estas propiedades térmicas extraordinarias para desarrollar un procedimiento no de fusión para la caracterización térmica de biocapas de ADN y especialmente un procedimiento para la detección de moléculas de ácido nucleico a partir de una muestra con alta sensibilidad.

Descripción de la invención

Antes de la descripción de la invención hay algunos términos que se deberían definir con el fin de entender mejor el ámbito de la invención.

Ácido nucleico o molécula de ácido nucleico. Cualquier molécula polimérica u oligomérica que tiene una estructura principal que contiene una secuencia de bases nitrogenadas (adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G)). En el contexto de la presente invención las moléculas de ácido nucleico incluyen, entre otras cosas, moléculas de ADN, moléculas de ARN, aptámeros o moléculas de ANP.

ADN. Un ácido orgánico y polímero compuesto por cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina) unidas mediante unidades intermedias de fosfato y el azúcar pentosa desoxirribosa. El ADN es el material genético de la mayoría de los organismos y habitualmente existe como molécula bicatenaria en la que dos cadenas antiparalelas se mantienen juntas mediante puentes de hidrógeno entre adenina-timina y citosina-guanina.

ARN. Un ácido orgánico y polímero compuesto por cuatro bases nitrogenadas (adenina, uracilo, citosina y guanina) unidas mediante unidades intermedias de fosfato y el azúcar pentosa ribosa. El ARN es un material genético presente en la mayoría de los organismos y habitualmente existe como una molécula monocatenaria aunque se puede hibridar con secuencias homólogas de ADN o ARN mediante puentes de hidrógeno entre adenina-uracilo y citosina-guanina.

Aptámero. Una molécula de ácido nucleico diseñada *in vitro* para interaccionar específicamente con una

molécula de ligando. La especificidad de un par aptámero-ligando puede ser tan alta como la de un par anticuerpo-antígeno.

5 **Ácido nucleico peptídico (ANP).** Una clase artificial de molécula de ácido nucleico en la que la estructura principal de azúcar-fosfato se ha sustituido por una estructura peptidomimética. Cada monómero de ANP está compuesto por una molécula de N-(2-aminoetil)glicina unida, mediante una unidad de metilencarbonilo, a una nucleobase del grupo formado por A, G, C y T. ANP muestra propiedades fisicoquímicas únicas, al ser un polímero sin carga, aquiral y relativamente rígido de alta estabilidad biológica y química.

Muestra. Una preparación líquida que contiene el material que se va a bioanalizar mediante el procedimiento de la invención.

10 **Molécula diana.** Una molécula que se puede hibridar con las moléculas de ácido nucleico dispuestas en la capa bioactiva con suficiente fuerza como para no eliminarse tras el lavado para la eliminación de moléculas unidas de manera no específica de la superficie receptora o tras aumentar la temperatura durante la realización del procedimiento de la invención. La molécula diana deriva su propiedad de unión de su secuencia que habitualmente es totalmente complementaria a la secuencia de la molécula de ácido nucleico dispuesta en la
15 capa bioactiva. Las moléculas diana también comprenden secuencias que no son totalmente complementarias que conservan suficiente fuerza en su unión como para no eliminarse con el lavado o el aumento de temperatura durante la realización del procedimiento. Normalmente estas secuencias que no son totalmente complementarias no contienen más de 1 a 3 apareamientos erróneos con la molécula de ADN dispuesta en la capa bioactiva.

20 **Hibridación.** El proceso de formación de puentes de hidrógeno entre dos cadenas complementarias de ácidos nucleicos tales como dos cadenas complementarias de ADN o una de cada uno de ADN y ARN para formar una molécula bicatenaria.

Apareamiento erróneo (o desapareamiento). Se produce cuando en al menos una posición de un ácido nucleico bicatenario, ambas cadenas tienen dos nucleótidos no complementarios que no se hibridan.

25 **Capa bioactiva.** Capa de ácido nucleico inmovilizada sobre los elementos mecánicos (por ejemplo, silicio/oro) que proporciona una detección específica de moléculas diana.

Capa bioactiva modificada. Si la muestra contiene cualquier molécula diana, cuando se pone la muestra en contacto con la capa bioactiva de ácido nucleico, tendrá lugar una hibridación dando lugar a una capa bioactiva modificada. Una capa bioactiva modificada muestra diferentes propiedades a las de la capa bioactiva de ácido nucleico original, por ejemplo en cuanto a elasticidad, expansión térmica, humectabilidad.

30 **Oligonucleótido.** Una molécula de ácido nucleico monocatenario de entre 3 y 250 nucleótidos de longitud que se puede hibridar con una secuencia de ácido nucleico complementaria.

35 **Sonda.** Se refiere a oligonucleótidos de una longitud dada compuestos por secuencias de nucleótidos específicas que permiten una hibridación total o parcial con secuencias diana complementarias en ciertas condiciones. En el contexto de esta invención, los oligonucleótidos de sonda se inmovilizan sobre soportes de silicio/oro para formar las capas bioactivas.

40 **Elemento transductor mecánico.** Parte móvil y/o deformable, relacionada con la capa bioactiva de modo que un cambio en un rasgo de la capa bioactiva afecta al menos a un rasgo detectable del elemento transductor mecánico, por ejemplo, sus características de vibración, deformación, desviación, posición, entre otras. Los ejemplos de elementos transductores mecánicos incluyen una palanca, una paleta, una membrana, etc. Algunas veces, el rasgo detectable (o cambio en dicho rasgo) se lee aplicando un estímulo al elemento transductor electromecánico, por ejemplo induciendo vibración del mismo.

45 **Rasgo mecánico.** En el contexto de la presente invención, el "rasgo mecánico" de la capa bioactiva es cualquier propiedad que puede afectar o influir en el comportamiento o las características del elemento transductor mecánico con el que está íntimamente asociado, de modo que se afecta a un rasgo de dicho elemento transductor mecánico. Los ejemplos de rasgos mecánicos son alargamiento, extensión, deformación, desplazamiento (de una parte), rigidez, frecuencia resonante, factor de calidad y expansión/contracción de dicha capa bioactiva, entre otros.

Bioanálisis. Comprende la determinación de una característica de la muestra.

50 **Determinación de una característica de la muestra.** Incluye la determinación entre otras cosas de la presencia o no de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra, y/o la concentración de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra, y/o la presencia de cualquier apareamiento erróneo entre la molécula de ácido nucleico diana y la sonda.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para el bioanálisis de un tipo seleccionado de molécula de ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner una superficie receptora de un elemento transductor mecánico (tal como una palanca, una paleta, una membrana, etc., tal como se hizo referencia anteriormente) en contacto con la muestra, comprendiendo dicha superficie receptora una capa bioactiva de ácidos nucleicos dispuesta para interactuar con una molécula de ácido nucleico diana, de modo que, tras el contacto con la muestra, dicha capa bioactiva de ácidos nucleicos se convierte en una capa bioactiva modificada debido a la interacción con las moléculas de ácido nucleico de la muestra (mediante lo cual ciertas características de la capa bioactiva modificada dependerán de si la diana está presente en la muestra o no, y/o en qué medida; por ejemplo, estas características pueden incluir la tensión en dicha capa, tal como el esfuerzo en el plano de dicha capa, el módulo elástico de dicha capa y el coeficiente de expansión térmica de dicha capa; por supuesto, estas características también dependerán de la manera en la que el elemento transductor mecánico se ha tratado tras el contacto con la muestra, por ejemplo, de si permanece en contacto con la muestra líquida o si se ha aclarado y secado en un entorno controlado, por ejemplo, en un entorno gaseoso o a vacío);

caracterizado porque el procedimiento comprende además las etapas de:

b) variar la temperatura de la capa bioactiva modificada de manera que se produce un cambio en al menos un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada, produciendo así un cambio de al menos un rasgo de dicho elemento transductor mecánico (tal como el alargamiento o la deformación mecánica o el desplazamiento de una parte o las características de vibración -tales como la frecuencia resonante y/o el factor de calidad- de dicho elemento transductor mecánico);

c) medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes de dicha capa bioactiva modificada, seleccionándose dichas temperaturas de manera que no se produce ninguna eliminación (o desorción) de la molécula de ácido nucleico detectada y/o diana a partir de la capa bioactiva modificada (es decir, no se produce ninguna "fusión" entre dicha secuencia diana y la capa bioactiva de ácido nucleico; esto significa que la capa bioactiva modificada se puede mantener sin alterar de modo que, por ejemplo, las mediciones se pueden repetir en una fase posterior; es decir, estas etapas del procedimiento pueden ser "reversibles"; por ejemplo, no se desea ninguna separación, o al menos ninguna separación sustancial o completa, entre la diana y la capa bioactiva, por ejemplo, ninguna fusión que "destruya" la capa bioactiva modificada);

d) determinar, basándose en dichos datos, al menos una característica de la muestra (esta característica de la muestra puede incluir, por ejemplo, la presencia o no de la diana en la muestra, y/o la concentración de la diana en la muestra, y/o la presencia y/o las concentraciones de elementos que no son idénticos pero son estructural o funcionalmente similares a la diana; por ejemplo, si la diana es una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia de ácido nucleico de la capa bioactiva, un elemento estructuralmente similar puede ser otra secuencia de ácido nucleico con uno o más apareamientos erróneos de ácido nucleico).

Este enfoque se diferencia de los enfoques de la técnica anterior porque usa datos obtenidos para temperaturas diferentes de la capa bioactiva modificada para determinar una o más características de la muestra. Es decir, en vez de basarse en la humedad relativa tal como se sugiere en el documento WO-A-2009/053195, y en vez de usar la temperatura para eliminar la diana mediante lo cual la temperatura a la que tiene lugar la eliminación o "fusión" se puede usar para llegar a conclusiones sobre las interacciones que se han producido en la biocapa, se usa la variación de la temperatura para obtener un conjunto de datos que se pueden comparar con "perfiles de temperatura" conocidos de hibridaciones específicas o fenómenos específicos tales como apareamientos erróneos (por ejemplo cuando se estudian polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)), para llegar a conclusiones sobre la muestra y su contenido. Es decir, la invención se basa en "perfiles de temperatura" o "huellas de temperatura". Por tanto, al igual que en el documento WO-A-2009/053195, el análisis se puede realizar "ex situ" y en el momento elegido por la persona que realiza el análisis, y no necesariamente cuando y donde tiene lugar la interacción entre la capa bioactiva y la muestra. El uso de la temperatura como condición variable, de modo que se pueden obtener datos para temperaturas diferentes y posteriormente se pueden comparar con "huellas" o "perfiles de temperatura" conocidos de elementos diana seleccionados, abre la puerta para una amplia gama de nuevas aplicaciones.

Dicho cambio en un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada puede comprender una contracción de la capa bioactiva modificada cuando se aumenta la temperatura, y/o expansión de la capa bioactiva modificada cuando se reduce la temperatura. Se ha observado que para biocapas de ácido nucleico, existe una contracción muy grande con el aumento de temperatura, que varía sustancialmente dependiendo de la composición específica de la capa. Este fenómeno se ha observado para capas que comprenden ADN, y se puede esperar un comportamiento similar para capas que comprenden otros ácidos nucleicos, tales como ARN, ANP y aptámeros. Por tanto, la expansión y contracción de la capa bioactiva modificada con el cambio de la temperatura puede ser muy útil para determinar no sólo si una diana específica estaba presente en la muestra, sino también para determinar, por ejemplo, si se producen fenómenos de asociación cuando, por ejemplo, están presentes secuencias de ácido nucleico similares pero no idénticas a una secuencia diana. Las diferencias importantes en el comportamiento de contracción térmica pueden hacer posible detectar apareamientos erróneos incluso de una sola base.

La capa bioactiva que comprende ácidos nucleicos puede mostrar como rasgo un coeficiente de expansión con la

temperatura (negativo) que varía sustancialmente con la composición de la capa, lo que hace que sea especialmente apropiado usar una temperatura variable para obtener conjuntos de datos que se pueden comparar con "huellas" conocidas de diferentes moléculas de ácido nucleico diana.

5 Según una posible implementación de este aspecto de la invención, el elemento mecánico se puede disponer, durante al menos las etapas b) y c), en una atmósfera gaseosa y/o a vacío. Debido al hecho de que el uso de datos obtenidos a temperaturas diferentes hace posible llevar a cabo las mediciones "ex situ", ya no es necesario llevar a cabo las mediciones mientras el elemento mecánico todavía está en contacto con la muestra líquida. Esto implica ventajas importantes, por ejemplo, en lo que se refiere al momento del análisis, y el lugar en el que (y las condiciones en las que) ha de llevarse a cabo el análisis. También implica ventajas importantes en lo que se refiere a la tecnología necesaria para llevar a cabo las mediciones ya que surgen muchas complicaciones cuando se necesita realizar la detección en líquidos y/o en tiempo real (burbujas, desviaciones térmicas, inestabilidades tras la inyección de la muestra, falta de reproducibilidad,...).

El procedimiento puede comprender además las etapas de:

- modificar la humedad relativa a la que se expone la capa bioactiva modificada; y

15 - llevar a cabo la etapa c) de modo que comprende medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener dichos datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes, para al menos dos humedades relativas diferentes.

También se ha encontrado que la expansión y contracción térmica de capas de ácido nucleico depende mucho del grado de hidratación, que se puede hacer variar modificando la humedad relativa de la atmósfera a la que se somete la capa. Por tanto, combinando la temperatura y la humedad relativa se pueden aumentar y optimizar la sensibilidad y la fiabilidad del procedimiento: por ejemplo, si dos moléculas diana diferentes muestran como rasgo perfiles de temperatura similares (es decir, relaciones entre datos medidos y temperatura) a una humedad relativa, éste puede no ser el caso a otras humedades relativas. Por tanto, y debido a la relación encontrada entre el grado de hidratación y el coeficiente de expansión térmica, la humedad relativa y la temperatura proporcionan, conjuntamente, una fiabilidad sinérgicamente mejorada del sistema, reduciendo el riesgo de errores en el análisis.

La temperatura de la capa modificada se puede controlar controlando al menos un rasgo (tal como la intensidad, y/o la duración de los pulsos luminosos, y/o el transcurso de tiempo entre pulsos luminosos posteriores) de luz dirigida sobre dicho elemento transductor mecánico (por ejemplo, directamente sobre la capa bioactiva).

30 En el procedimiento se puede usar una matriz de dichos elementos transductores mecánicos, y al menos algunos de los elementos transductores mecánicos de dicha matriz se pueden dotar de capas bioactivas de ácidos nucleicos que se diferencian de capas bioactivas de ácidos nucleicos de otros elementos transductores mecánicos de dicha matriz. De esta manera, en una única etapa se pueden obtener grandes cantidades de datos relativos a la muestra, relativos a varias moléculas de ácido nucleico diana diferentes.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para el bioanálisis de un tipo seleccionado de molécula de ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de:

35 a) poner una superficie receptora de un elemento transductor mecánico en contacto con la muestra, comprendiendo dicha superficie receptora una capa bioactiva de ácidos nucleicos dispuesta para interactuar con una molécula de ácido nucleico diana, de modo que, tras el contacto con la muestra, dicha capa bioactiva de ácidos nucleicos se convierte en una capa bioactiva modificada debido a la interacción con las moléculas de ácido nucleico de la muestra;

y que comprende además las etapas de:

b) variar la temperatura de la capa bioactiva modificada de manera que se produce un cambio en al menos un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada, produciendo así un cambio de al menos un rasgo de dicho elemento transductor mecánico;

45 c) medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes de dicha capa bioactiva modificada;

d) determinar, basándose en dichos datos, al menos una característica de la muestra;

50 en el que dicho cambio en un rasgo mecánico de dicha capa modificada comprende una contracción de la capa bioactiva modificada cuando se aumenta la temperatura, y/o una expansión de la capa bioactiva modificada cuando se reduce la temperatura.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para el bioanálisis de un tipo seleccionado de molécula de ácido nucleico en una muestra, que comprende la etapa de:

5 a) poner una superficie receptora de un elemento transductor mecánico en contacto con la muestra, comprendiendo dicha superficie receptora una capa bioactiva de ácidos nucleicos dispuesta para interactuar con una molécula de ácido nucleico diana, de modo que, tras el contacto con la muestra, dicha capa bioactiva de ácidos nucleicos se convierte en una capa bioactiva modificada debido a la interacción con las moléculas de ácido nucleico de la muestra;

y que comprende además las etapas de:

b) variar la temperatura de la capa bioactiva modificada de manera que se produce un cambio en al menos un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada, produciendo así un cambio de al menos un rasgo de dicho elemento transductor mecánico;

10 c) medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes de dicha capa bioactiva modificada;

d) determinar, basándose en dichos datos, al menos una característica de la muestra;

en el que el procedimiento comprende además las etapas de:

15 - modificar la humedad relativa a la que se expone la capa bioactiva modificada; y

- llevar a cabo la etapa c) de modo que comprende medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener dichos datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes, para al menos dos humedades relativas diferentes.

20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un sistema para la inspección de superficies dispuesto para detectar características de vibración y/o desplazamiento relativo de una pluralidad de elementos que forman parte de una estructura mecánica para el bioanálisis de una muestra, comprendiendo dicho sistema:

- una fuente luminosa dispuesta para generar al menos un haz luminoso;

- un detector sensible a la posición dispuesto para recibir el haz luminoso cuando se refleja de la estructura mecánica y para producir al menos una señal de salida en respuesta a la recepción de dicho haz luminoso;

25 - un sistema de control electrónico;

en el que

el sistema comprende además un subsistema para variar y controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos.

30 La estructura mecánica se puede disponer dentro de una cámara, y el sistema puede comprender además un subsistema para variar y controlar la humedad relativa dentro de la cámara.

Por ejemplo, se puede usar un sistema tal como el divulgado en el documento WO-A-2009/053195, si se completa con un subsistema adecuado para el control de la temperatura.

35 El subsistema para variar y controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos puede comprender al menos una fuente luminosa dispuesta para dirigir la luz sobre dicha pluralidad de elementos, y medios para controlar al menos una característica de la luz emitida por dicha fuente luminosa con el fin de controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos. Esta fuente luminosa puede ser la misma que la que genera el haz luminoso mencionado anteriormente, pero también puede ser una diferente. La característica de la luz que se controla puede ser, por ejemplo, la intensidad de la luz y/o la duración de los pulsos luminosos y/o el transcurso de tiempo entre pulsos luminosos posteriores. El uso de la luz como la fuente de calor en vez de usar medios tales como elementos de Peltier puede proveer un control sencillo y práctico de la temperatura.

40 El sistema se puede configurar para llevar a cabo el procedimiento de cualquiera de los aspectos descritos anteriormente de la invención (el sistema se puede configurar para llevar a cabo el procedimiento incorporando, por ejemplo, un programa adecuado).

Breve descripción de los dibujos

45 Para completar la descripción y con el fin de proveer un mejor entendimiento de la invención, se proporciona un conjunto de dibujos. Dichos dibujos forman una parte integral de la descripción e ilustran una realización preferente y ejemplos de la invención, que no se deberían interpretar como que limitan el ámbito de la invención, sino solamente como ejemplos de cómo se puede realizar la invención. Los dibujos comprenden las siguientes figuras:

Figura 1: ilustra esquemáticamente un sistema según una posible realización de la invención.

Figura 2: **A.** Ilustra esquemáticamente el efecto de la temperatura sobre un elemento de silicio descubierto (una palanca) con una capa de oro (I) y sobre un elemento de este tipo con capas de ácido nucleico tales como ADNmc (II), ADNbc (III) y ADNbc con un apareamiento erróneo único (IV) inmovilizadas sobre la capa de oro. **B.** Ilustra esquemáticamente el efecto combinado de la temperatura y la humedad relativa sobre capas de ácido nucleico monocatenario y bicatenario.

Figura 3: muestra la respuesta y la histéresis de una palanca sensibilizada (ADN) de ADNmc mientras se somete a un ciclo de temperatura, en comparación con la respuesta y la histéresis de la palanca con ADNbc (HIB) (tras la hibridación total de sonda complementaria-diana) sometida al mismo ciclo de temperatura. La respuesta siempre es reversible, esto indica que la biocapa no se está destruyendo ni cambiando permanentemente durante el experimento. La respuesta es diferente cuando se mantiene el entorno a una alta humedad relativa con respecto a un entorno de baja humedad relativa. La figura también muestra la variación de desviación y la histéresis para una secuencia diana de ADN con apareamiento erróneo (DAE) durante un ciclo de temperatura y la deformación de una palanca con revestimiento de oro con cambios en la temperatura (Oro). **A.** El coeficiente de expansión térmica mayor de la capa de oro con respecto a la película de silicio induce una flexión negativa de la micropalanca (hacia el lado de silicio sin revestimiento). Si la micropalanca de silicio/oro se reviste con una capa de ADNmc entonces la desviación es positiva (hacia el lado con revestimiento de oro) cuando se aumenta la temperatura, lo que significa que la capa de ADNmc se contrae con el aumento de la temperatura (ADN). Cuando se incubaba la micropalanca de ADNmc sensibilizada en una disolución con una cadena de ADN complementaria, se encuentra que para la capa hibridada (HIB) el comportamiento térmico es cualitativamente el mismo, pero la capa hibridada se contrae significativamente menos con la temperatura, proporcionando una nueva característica distintiva/parámetro de biosensibilización de la hibridación. Todos estos experimentos se realizaron en una atmósfera seca (HR del 1%). **B.** Se realizaron los mismos experimentos que en **A.** en un entorno de aire con alta humedad (HR del 90%). Se observa que en este caso la capa de ADNbc tras la hibridación se contrae significativamente más que la capa de ADNmc, debido al contenido diferente en agua de las biocapas.

Figura 4: desviación de la palanca frente a la temperatura para una palanca con revestimiento de oro tras la formación de monocapa autoensamblada de ADNmc (símbolos en blanco) y tras la hibridación (símbolos en negro). **A.** Las mediciones se llevaron a cabo en condiciones en seco, HR < 1%. **B.** Las mediciones se llevaron a cabo en condiciones húmedas, HR ≈ 90%. Se muestra la respuesta de tres secuencias de ADNmc tioladas: 16 meros 5'-HS-CTA CCT TTT TTT TCT G-3' (SEC ID N° 1), 25 meros 5'-HS- ACT GCA ACC AGT TTC CTC TTG GGT G-3' (SEC ID N° 2) y 25 meros 5'-HS- ACT GCA ACC AGT CTC CTC TTG GGT G-3' (SEC ID N° 3). La desviación de la palanca con revestimiento de oro descubierta se ha restado de todas las mediciones para eliminar cualquier efecto relacionado con el efecto bimetalico.

Descripción de una realización preferente de la invención y ejemplos

En la figura 1 se ilustra un sistema según una realización preferente de la invención. Se puede basar en un sistema tal como el divulgado en el documento WO-A-2009/053195, pero adaptado para controlar también la temperatura. Más específicamente, la figura 1 ilustra un sistema para la inspección de superficies dispuesto para detectar características de vibración y/o desplazamiento relativo de una pluralidad de puntos de una pluralidad de palancas 51 que forman parte de una estructura 5 mecánica. El sistema comprende:

una fuente 1 luminosa dispuesta para generar al menos un haz 11 luminoso;

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

un sistema 3 de control electrónico; y

medios 4 de barrido para el desplazamiento relativo de dicho haz luminoso con respecto a la estructura 5 mecánica de manera que se barre dicha estructura mecánica con el haz luminoso, siguiendo instrucciones del sistema 3 de control electrónico.

El sistema 3 de control electrónico puede disponerse para controlar los medios 4 de barrido de manera que se desplaza el haz luminoso a lo largo de una primera trayectoria, de manera que se detecta una pluralidad de posiciones de referencia posteriores a lo largo de dicha primera trayectoria, y el sistema de control electrónico puede asociarse operativamente con el detector 2 sensible a la posición de manera que se determinan dichas posiciones de referencia como resultado de un análisis de al menos una señal de salida a partir de dicho detector 2 sensible a la posición, tal como se describe en el documento WO-A-2009/053195. Además, el sistema de control puede disponerse adicionalmente para controlar los medios 4 de barrido de manera que se desplaza el haz luminoso a lo largo de la estructura mecánica a lo largo de una pluralidad de segundas trayectorias, estando asociada cada una de dichas segundas trayectorias con una de dichas posiciones de referencia, tal como también se describe en el documento WO-A-2009/053195.

La estructura 5 mecánica, o al menos las palancas 51, están dispuestas dentro de una cámara 6, y el sistema comprende un subsistema 7 para variar y controlar la humedad relativa dentro de la cámara 6, y un subsistema 8

para variar y controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos 51, bajo el control del sistema de control electrónico. El subsistema 8 para variar y controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos 51 puede comprender al menos una fuente luminosa dispuesta para dirigir luz sobre dicha pluralidad de elementos, y medios para controlar al menos una característica (tal como la intensidad, etc.) de la luz emitida por dicha fuente luminosa con el fin de controlar la temperatura de dicha pluralidad de elementos. Puede proporcionarse un sensor de temperatura para ayudar a controlar la temperatura 81.

Por tanto, este sistema puede proveer comprobar la "huella" de una muestra (o de la "capa modificada" tras la incubación con una disolución dada) obteniendo datos medidos relativos a los elementos mecánicos no sólo a temperaturas diferentes, sino también a humedades relativas diferentes, tal como se explicó anteriormente. El sistema también puede comprender componentes adicionales, tales como un higrómetro 9, etc.

Ejemplo

I - Descripción de la técnica

La configuración experimental usada en los experimentos se ilustra en la figura 1. Se anclaron moléculas de ADN a las palancas con el fin de controlar cómo cambiaba el esfuerzo de la superficie (desviación de la palanca). Se inmovilizaron sondas de ADN monocatenario sobre un lado con revestimiento de oro de micropalancas mediante un conector de tiol. Se aplicaron revestimientos a matrices de micropalanca de silicio monocristalino de 400 μm de largo, 100 μm de ancho y 1,0 μm de espesor mediante evaporación con pulverización con una capa de oro de 20 nm sobre la parte superior de una capa de adhesión de 2 nm de cromo. Se incubaron micropalancas con revestimiento recién aplicado con 1 μM del ADN monocatenario (ADNmc) modificado con tiol diluido en tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM; pH=7,5) a 25°C, durante 24-48 horas con el fin de inmovilizar una capa de ADN densamente empaquetada. Posteriormente, se aclararon vigorosamente las palancas en primer lugar en tampón PBS y posteriormente en agua Milli-Q para desechar interacciones no específicas, y después se secaron bajo una corriente de gas nitrógeno seco. Tras el largo tiempo de inmovilización el ADNmc formó una capa muy empaquetada con una densidad de superficie del orden de 10^{13} cm^{-2} , según se determinó mediante experimentos de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).

Los experimentos se realizaron en un entorno de gas/humedad controlado. La hibridación de la palanca sensibilizada con la secuencia complementaria se realizó en PBS a 24°C, a una concentración de 1 μM durante 2-4 horas.

Usando este enfoque experimental, se descubrió que las monocapas autoensambladas de ADN monocatenario y bicatenario muestran propiedades térmicas extraordinarias. Particularmente, capas de ADNmc y ADNbc muestran una gran contracción con la temperatura en un intervalo de temperatura próximo a la temperatura ambiente (véase la figura 3). Aunque la contracción térmica con el aumento de la temperatura se ha medido para una variedad de materiales, incluyendo películas de polímeros, ésta es la primera vez que se realiza una medición de la expansión/contracción térmica de capas de ADN. También se observó que la expansión/contracción de las capas de ADN muestra un comportamiento reversible con cierta histéresis (figura 3).

La expansión/contracción térmica de la monocapa autoensamblada de ADNmc y ADNbc se midió inmovilizando la biocapa sobre una micropalanca de silicio con revestimiento de oro. Entonces, pudo detectarse la expansión/contracción de la capa midiendo cómo cambiaba la tensión en la monocapa como resultado de un cambio de temperatura. El enfoque se basó en la flexión de la micropalanca en una cantidad que dependía de la tensión en la monocapa. La tensión traducida en una deformación de la micropalanca de silicio delgada se midió mediante un sistema de láser de barrido.

Estos estudios proporcionan información interesante sobre las propiedades térmicas de estas películas ultradelgadas. Las películas de ADN son particularmente relevantes para aplicaciones tecnológicas y son experimentalmente fáciles de controlar para desarrollar aplicaciones fundamentales relativas al efecto del confinamiento entre superficies de contacto película-aire y película-sustrato sobre nanomateriales blandos. De manera importante, estas mediciones se realizan en un intervalo de temperatura que está lejos de la temperatura de fusión para el ADNbc ya que así es un procedimiento no destructivo.

Una aplicación del registro de esta expansión/contracción térmica de películas de ADN es en el campo de los biosensores. Se encontró que la expansión/contracción térmica de películas de ADN cambia drásticamente cuando la monocapa interactúa con dianas de ADN monocatenario no complementarias, complementarias o con un apareamiento erróneo único.

También se observó un comportamiento de desviación distinto tras la variación de la temperatura cuando se realizaron experimentos a una humedad relativa del 1% o una humedad relativa del 90%. Este efecto se atribuye al contenido diferente en agua de las distintas biocapas dependiendo de la humedad relativa. La característica distintiva doble (a alta y baja humedad) aumenta la fiabilidad de un procedimiento de biodetección basado en este principio. La contracción es superior en el estado seco que en el estado húmedo para ADNmc. De manera más interesante, tras la hibridación, la película de ADN todavía se contrae al calentar, pero el comportamiento de

contracción con las condiciones de humedad es opuesto al de la película de ADNmc. La película de ADNmc hibridado se contrae significativamente con la temperatura más en entorno húmedo que en condiciones en seco. Las figuras 2A y 2B ilustran este comportamiento que se demuestra de manera experimental en la figura 3.

5 La comparación de la respuesta de desviación con respecto a la variación de temperatura de palancas con revestimiento de oro sin ninguna biocapa inmovilizada y la de palancas funcionalizadas o hibridadas permite descartar el efecto de la expansión térmica del oro (efecto bimetalico).

La secuencia de los experimentos en los ensayos fue:

- i) Medición de la desviación inducida por los cambios en la temperatura próxima a la temperatura ambiente en palancas con revestimiento de oro. Se aumentó la temperatura y se volvió a reducir hasta el valor inicial.
- 10 ii) Medición de la desviación inducida por los cambios en la temperatura próxima a la temperatura ambiente en palancas con revestimiento de oro inmovilizadas con ADNmc modificado con tiol. Se aumentó la temperatura y se volvió a reducir hasta el valor inicial.
- iii) Exposición de la palanca funcionalizada a una disolución de la muestra de ácido nucleico que contenía:
 - a) la molécula de ADNmc diana totalmente complementario;
 - 15 b) una diana de ADNmc con un apareamiento erróneo;
 - c) un ADNmc no complementario (control negativo); entonces se aclararon y se secaron las palancas y
 - iv) Medición de la desviación a medida que el sistema se somete a un segundo ciclo de temperatura a una humedad superior.

20 Las secuencias inmovilizadas son: 5'-HS-CTA CCT TTT TTT TCT G-3', (SEC ID N° 1), 5'-HS- ACT GCA ACC AGT TTC CTC TTG GGT G-3' (SEC ID N° 2), 5'-HS- ACT GCA ACC AGT CTC CTC TTG GGT G-3' (SEC ID N° 3).

25 El ADNmc totalmente complementario para SEC ID N° 1 mostró la secuencia 5'-CAGAAAAAAAAGGTAG-3' (SEC ID N° 4), mientras que la secuencia con apareamiento erróneo era un apareamiento erróneo único T/T cerca de la posición central del dúplex de SEC ID N° 5 (secuencia 5'-CAGAAAATAAAGGTAG-3'). El ADNmc no complementario (control negativo) tenía la secuencia SEC ID N° 6 (5'-AGCTTCCGTAAGTTCGAT-3'). El ADNmc totalmente complementario para SEC ID N° 2 mostró la secuencia 5'-CACCCAAGAGGAAACTGGTTGCAGT-3' (SEC ID N° 7) y la molécula totalmente complementaria para SEC ID N° 3 mostró la secuencia 5'-CACCCAAGAGGAGACTGGTTGCAGT-3' (SEC ID N° 8).

30 Durante los experimentos no se observó ningún cambio no reversible en la biocapa, por tanto, se descartó la fusión de la capa de ADN. La fusión de ADN daría lugar necesariamente a una flexión no reversible de la palanca (referencia: Using a Microcantilever Array for Detecting Phase Transitions and Stability of DNA, *Journal of the Association for Laboratory Automation*, volumen 11, número 4, páginas 222-226, S. Biswal, D. Raorane, A. Chaiken, A. Majumdar).

II- Efecto de la secuencia de ADN y la longitud de secuencia

Se estudió la respuesta térmica de las siguientes secuencias:

- 35 - 16 meros 5'-HS-CTACCTTTTTTTTCTG-3', (SEC ID N° 1)
- 25 meros 5'-HS-ACTGCAACCAGTTTCTCTTGGGT G-3' (SEC ID N° 2)
- 25 meros 5'-HS-ACTGCAACCAGTCTCTCTTGGGTG-3' (SEC ID N° 3)

con el fin de determinar el efecto de la longitud de secuencia y la composición de bases en el efecto de contracción térmica.

40 Los resultados mostraron que el comportamiento de expansión/contracción térmica sólo depende cuantitativamente de la secuencia de bases y la longitud de secuencia mientras que el comportamiento cualitativo sigue siendo el mismo. Cualitativamente, la hibridación se caracteriza por una disminución de la magnitud de contracción térmica en comparación con la respuesta del ADNmc no hibridado en condiciones en seco y un aumento de esta magnitud a alta humedad, para todas las secuencias estudiadas. La pendiente de las curvas representadas en la figura 4 (valores numéricos mostrados a continuación en la tabla 1), que representa el grado de flexión con la temperatura, es indicativa de la magnitud de esta contracción. Para las capas de ADNmc, los valores permanecen en el mismo intervalo sólo con ligeras variaciones entre secuencias más cortas y más largas. Estos resultados implican que la huella seguida en estos experimentos para capas de ADNmc se puede aplicar a cualquier composición de secuencia de bases y longitud de secuencia. No obstante, la contracción de la capa de ADN hibridado a baja humedad relativa para las secuencias más largas (SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3) está por debajo del ruido en el sistema. En este caso,

aunque se podía detectar hibridación como una disminución en la contracción de la biocapa modificada, el seguimiento de la doble característica distintiva (a baja y alta humedad) puede ser especialmente útil. La contribución a la respuesta de desviación de la expansión térmica de la capa metálica (efecto bimetalico) se ha restado en todos los casos.

5 **Tabla 1.** Pendientes de ajustes lineales de datos obtenidos para un aumento de temperatura desde 27°C hasta 32°C.

	HR del 1%		HR del 90%	
	ADNmc	ADNbc	ADNmc	ADNbc
SEC ID N° 1	0,019 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,037 ± 0,001
SEC ID N° 2	0,025 ± 0,001	-0,003 ± 0,001	0,012 ± 0,003	0,030 ± 0,002
SEC ID N° 3	0,028 ± 0,002	-0,005 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,026 ± 0,001

III- Sensibilidad y especificidad del sistema

10 Entre los diferentes parámetros mecánicos que se pueden medir, se eligió la desviación en un ciclo de temperatura. Se encontró que era muy sensible a la forma del ADN, es decir, ADNmc no hibridado, ADNbc hibridado o con apareamiento erróneo. Por tanto, se eligió para ser el parámetro de medición del biosensor. La combinación de este parámetro con el de la humedad relativa proporcionó una fiabilidad mejorada ya que el diferente contenido en agua de la capa de ADNmc y el de la capa de ADNbc proporcionó una doble característica distintiva para la discriminación del acontecimiento de hibridación. Dado que la hibridación se realizó en todos los experimentos a 24°C, no se esperaron variaciones significativas en el rendimiento de hibridación de las secuencias totalmente complementarias y con un apareamiento erróneo único (los cálculos teóricos muestran que se debe esperar que la temperatura discriminatoria para las dianas usadas se encuentre en el intervalo de 34-43°C). La secuencia con apareamiento erróneo se detectó claramente en estos experimentos debido a su huella de temperatura o comportamiento cualitativamente distinto.

20 La figura 3 muestra la respuesta de la biocapa tras la incubación con una secuencia con apareamiento erróneo (SEC ID N° 5), marcada DAE en la figura 3. La capa se contrajo significativamente menos que para la capa hibridada con la secuencia totalmente complementaria (SEC ID N° 4), marcada como HIB, así como significativamente menos que con la capa de ADNmc tras la incubación con la secuencia de control (SEC ID N° 6), marcada como ADN en la figura 3, en la que no se produjo ninguna hibridación.

25 Este comportamiento implica que la hibridación con la secuencia con apareamiento erróneo se produjo pero que las capas con apareamiento erróneo no muestran la misma huella de contracción que las capas totalmente complementarias o capas de ADNmc muy empaquetadas. Además, la contracción de la secuencia con apareamiento erróneo no se ve afectada por el nivel de hidratación, es decir, la humedad relativa de la cámara en los experimentos, tal como se puede observar a partir de una comparación entre las gráficas en la figura 3A con las gráficas en la figura 3B.

35 Sin estar ligados a ninguna teoría, los inventores creen que el mecanismo para la discriminación del apareamiento erróneo se debe a la estabilización de una “discontinuidad” inducida por apareamiento erróneo en el dúplex mediante formación de puentes de hidrógeno. Esta “discontinuidad” en la capa implica un patrón de tensión diferente en la biocapa que permite la discriminación del apareamiento erróneo. El fundamento para este hallazgo es que estas monocapas de ácido nucleico responden cooperativamente, actuando como una membrana muy sensible, a variaciones de temperatura, y la sensibilidad se modula mucho por la conectividad entre las sondas de ADNmc o ADNbc. La conectividad de la membrana de ADNmc se cambia, en el caso de las secuencias con apareamiento erróneo, por la hibridación. Algunos estudios señalan a la percolación y efectos entrópicos con micropalanca en línea con esta suposición (ref DOI: 10.1002/adma.200801344, Physics of Nanomechanical Biosensing on Cantilever Arrays, Maria L. Sushko, John H. Harding, Alexander L. Shluger, Rachel A. McKendry, Moyu Watari, Adv. Mater. 2008, 20, 3848–3853; REF Nanomechanical detection of antibiotic–mucopeptide binding in a model for superbug drug resistance, J. W. Ndieyira *et al.*, Nature Nanotechnology 3, 691 (2008)).

45 Como consecuencia del hallazgo anterior, un rasgo relevante del procedimiento desarrollado es que, al contrario que lo que ocurre con micromatrices de ADN y otros biosensores actuales, el comportamiento diferencial de la diana con apareamiento erróneo no se basa en su tendencia a deshibridarse a una temperatura de trabajo optimizada, ajustada con precisión, sino en la propiedad intrínseca particular, es decir, el comportamiento de expansión/contracción térmica de una biocapa, o huella de temperatura, que contiene las “discontinuidades” inducidas por apareamiento erróneo. Los experimentos en este caso siempre están muy por debajo de la temperatura de fusión.

En conclusión, las fuerzas intermoleculares en monocapas de ácidos nucleicos proporcionan a la capa propiedades de expansión térmica distintas que dependen críticamente de las características moleculares imperceptibles de la biocapa. La alta densidad molecular alcanzada mediante los largos tiempos de inmovilización usados hace que la hibridación de aproximadamente una molécula diana por millón de sondas produzca un efecto drástico sobre la expansión/contracción térmica. Este principio también permite la discriminación de mutaciones únicas. Se espera una sensibilidad sin precedentes alcanzada mediante el control de la expansión/contracción térmica de las capas de ADN. Estos experimentos son el punto de partida para un genotipado rápido y sencillo o mapeo de SNP próximo a la temperatura ambiente, sin necesidad de marcaje y amplificación de la muestra. Además, el uso de variaciones de la temperatura en un intervalo próximo a la temperatura ambiente permite la simplificación del equipo de biodetección, ya que ya no se requiere la necesidad de un control preciso de entornos de gas. Incluso se pueden realizar experimentos que combinan información dependiente de la temperatura y la humedad relativa a dos humedades relativas, "alta" y "baja", pero ya no se necesita un control preciso de la humedad real.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 15 <120> PROCEDIMIENTO PARA EL BIOANÁLISIS DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO EN UNA MUESTRA Y BIOSENSOR PARA SU IMPLEMENTACIÓN

<130> PRE 20090189

20 <160> 8

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

25 <211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> contiene un grupo tiol en el extremo 5'

<400> 1

ctacctttt tttctg

16

35 <210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> contiene un grupo tiol en el extremo 5'

ES 2 442 767 T3

- <400> 2
actgcaacca gttcctctt gggtg 25
- <210> 3
5 <211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
10 <223> contiene un grupo tiol en el extremo 5'
- <400> 3
actgcaacca gtctcctctt gggtg 25
- 15 <210> 4
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> secuencia totalmente complementaria con la SEC ID N° 1
- <400> 4
cagaaaaaaaa aggtag 16
25
- <210> 5
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> secuencia con un apareamiento erróneo único con la SEC ID N° 1
- <400> 5
35 cagaaaataa aggtag 16
- <210> 6

ES 2 442 767 T3

<211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> secuencia no complementaria con la SEC ID N°1, control negativo

<400> 6

agcttccgta ctcgat 16

10

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> secuencia totalmente complementaria con la SEC ID N° 2

<400> 7

20 cacccaagag gaaactggtt gcagt 25

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia totalmente complementaria con la SEC ID N° 3

30 <400> 8

cacccaagag gagactggtt gcagt 25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de bioanálisis de un tipo seleccionado de molécula de ácido nucleico en una muestra, que comprende la etapa de:
 - 5 a) poner una superficie receptora de un elemento transductor mecánico en contacto con la muestra, comprendiendo dicha superficie receptora una capa bioactiva de ácidos nucleicos dispuesta para interactuar con una molécula de ácido nucleico diana, de modo que, tras el contacto con la muestra, dicha capa bioactiva de ácidos nucleicos se convierte en una capa bioactiva modificada debido a la interacción con las moléculas de ácido nucleico de la muestra;

caracterizado porque el procedimiento comprende además las etapas de:
 - 10 b) variar la temperatura de la capa bioactiva modificada de manera que se produce un cambio en al menos un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada, produciendo así un cambio de al menos un rasgo de dicho elemento transductor mecánico;
 - 15 c) medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes de dicha capa bioactiva modificada, seleccionándose dichas temperaturas para no producir ninguna eliminación de la molécula de ácido nucleico diana de la capa bioactiva modificada;
 - d) determinar, basándose en dichos datos, al menos una característica de la muestra.
 - e) modificar la humedad relativa a la que se expone la capa bioactiva modificada; y
 - 20 f) llevar a cabo la etapa c) de modo que comprende medir dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico para obtener dichos datos relativos a dicho rasgo de dicho elemento transductor mecánico correspondientes, al menos, a dos temperaturas diferentes, para al menos dos humedades relativas diferentes.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos presentes en la muestra o que constituyen la capa bioactiva son aptámeros, moléculas de ADN, ARN o ANP.
- 25 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho cambio en un rasgo mecánico de dicha capa bioactiva modificada comprende una contracción de la capa bioactiva modificada cuando se aumenta la temperatura, y/o una expansión de la capa bioactiva modificada cuando se reduce la temperatura.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, al menos durante las etapas b) y c), el elemento mecánico está dispuesto en una atmósfera gaseosa y/o a vacío.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la característica de la muestra determinada en la etapa d) es la presencia o ausencia de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra, y/o la concentración de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra, y/o la presencia y/o las concentraciones de cualquier molécula diana que tiene al menos un apareamiento erróneo con respecto a las moléculas de ácido nucleico dispuestas en la capa bioactiva.
- 35 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de la capa bioactiva modificada es controlada mediante el control de al menos un rasgo de luz dirigida sobre dicho elemento mecánico.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa una matriz de dichos elementos transductores mecánicos, estando dotados al menos algunos de los elementos transductores mecánicos de dicha matriz de capas bioactivas de ácidos nucleicos que se diferencian de las capas bioactivas de ácidos nucleicos de otros elementos transductores mecánicos de dicha matriz.

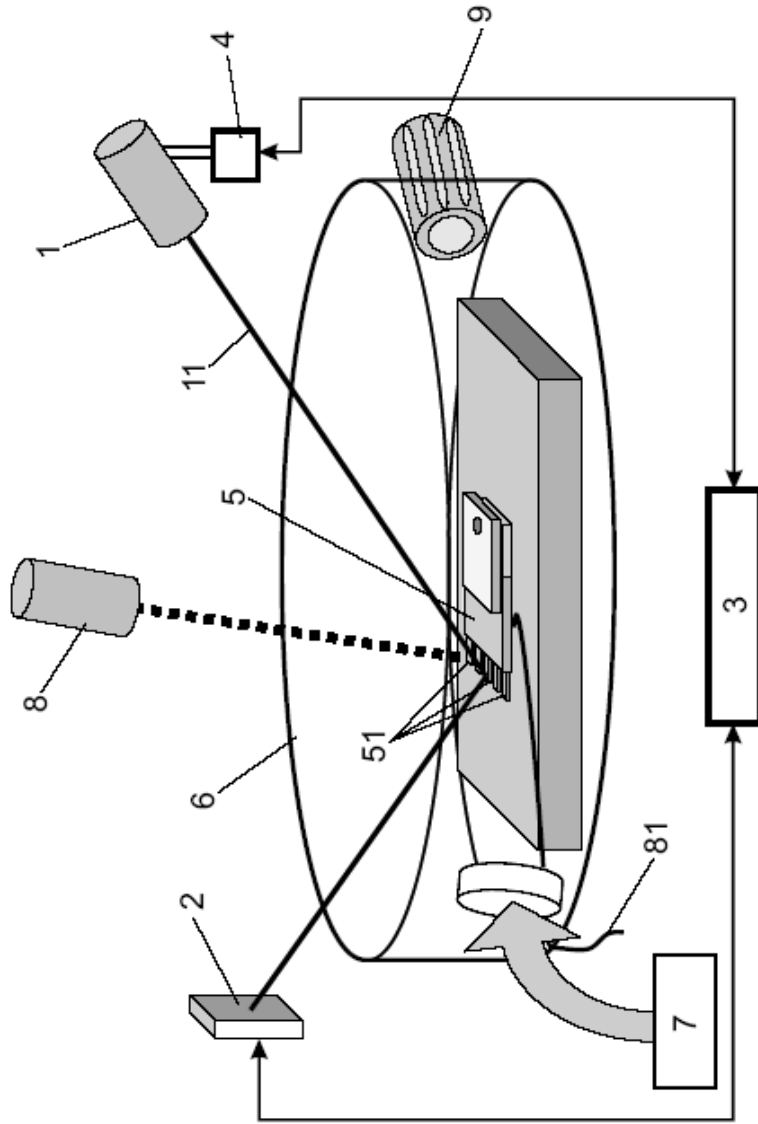


FIG. 1

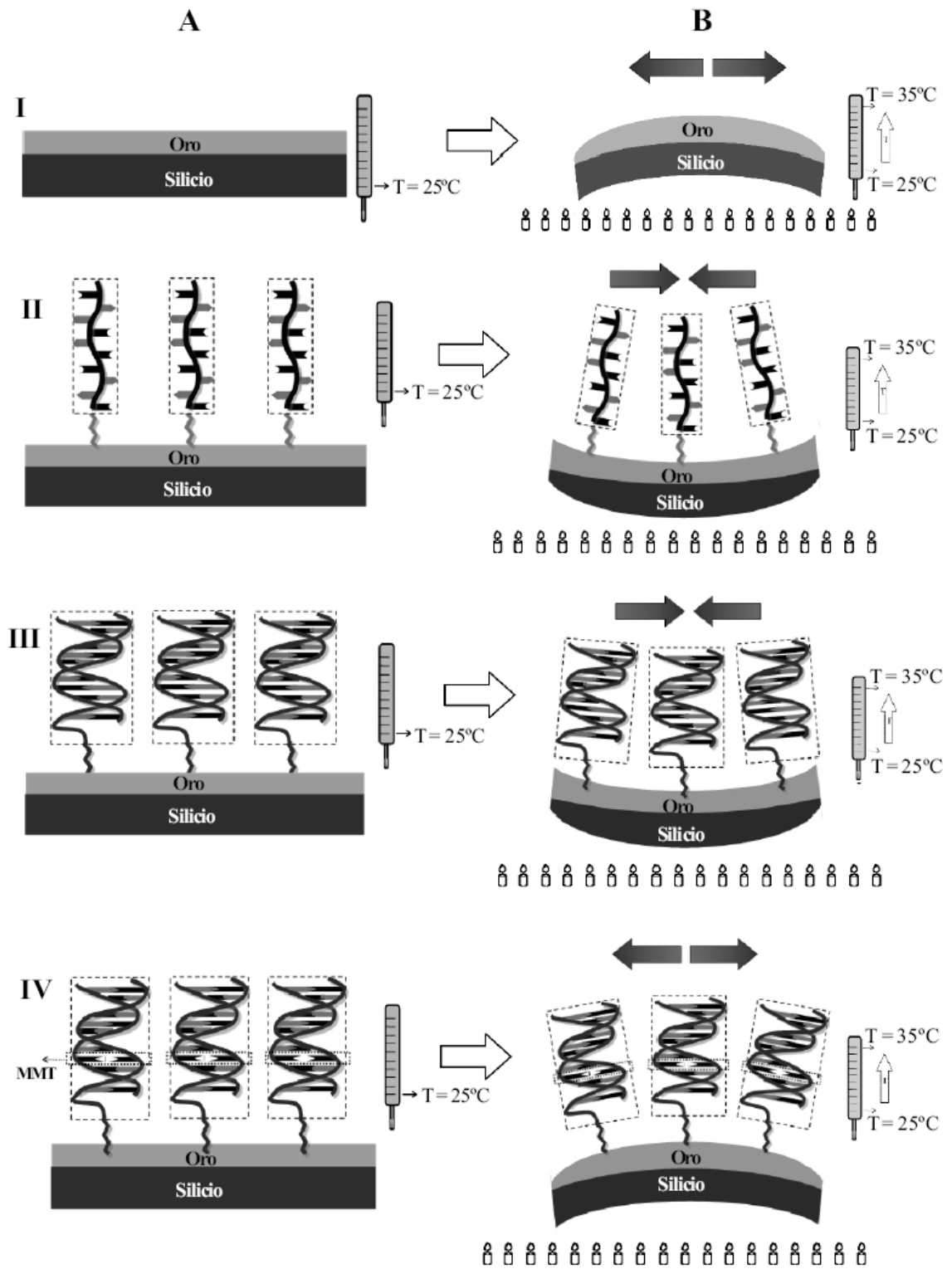


FIG. 2A

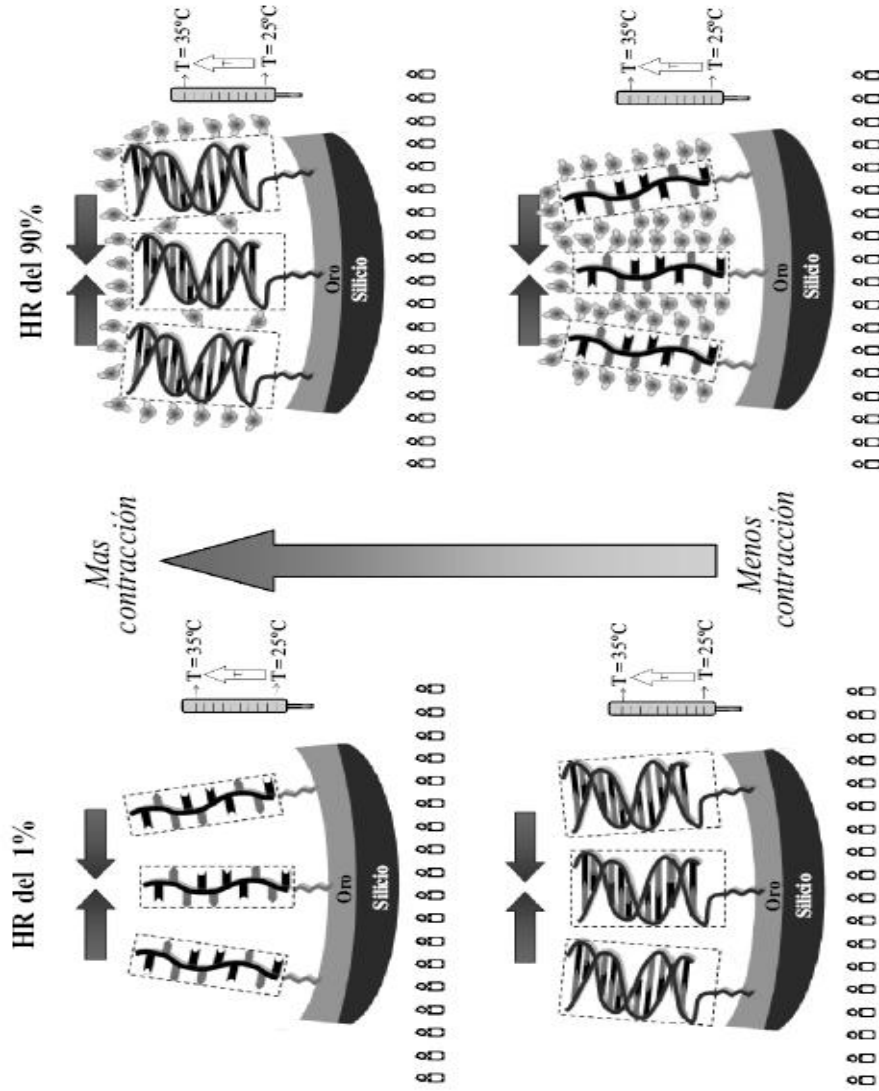


FIG. 2B

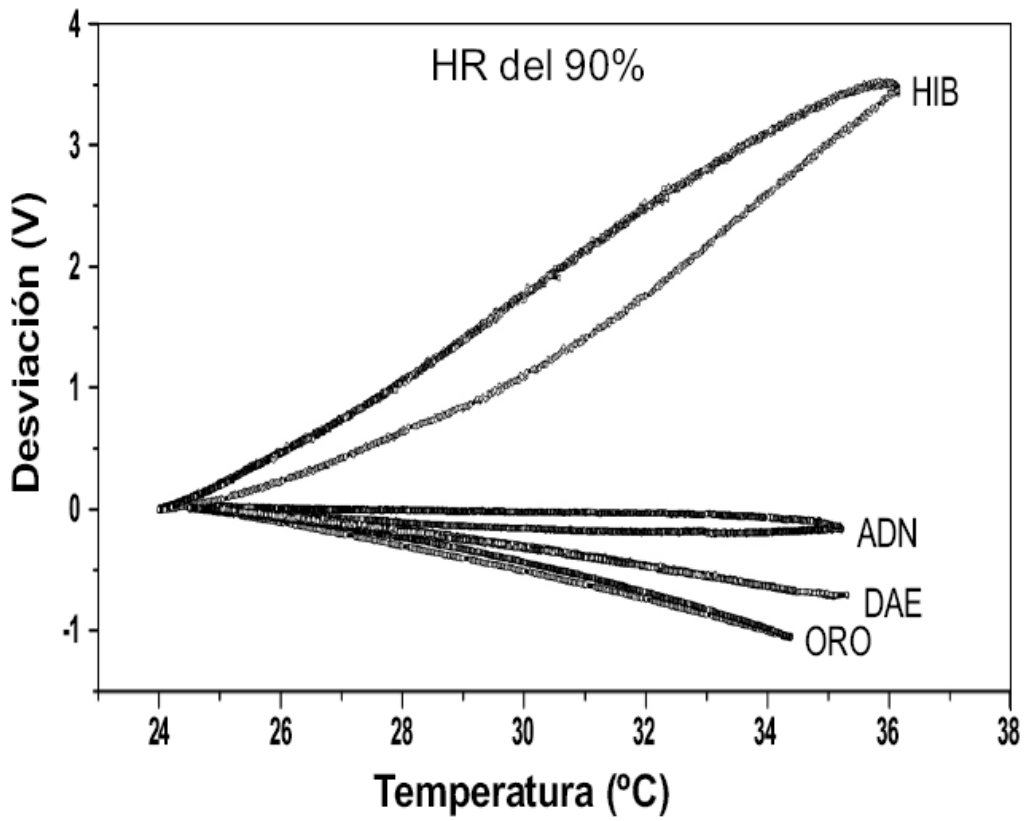
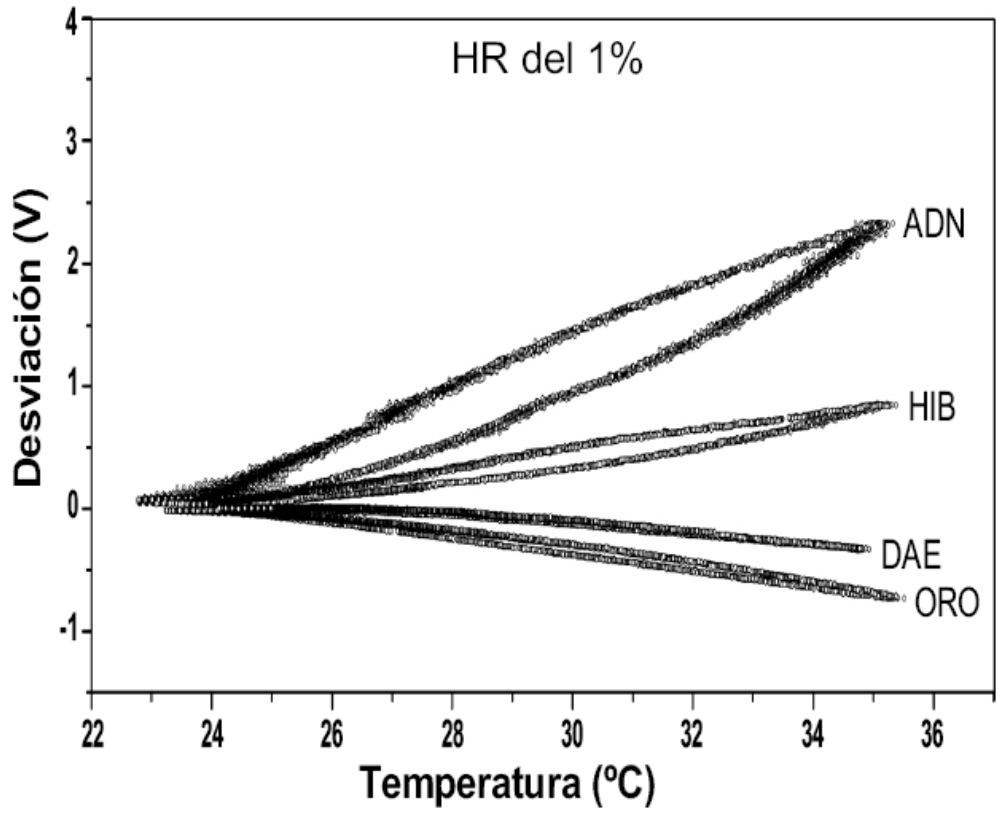


FIG. 3

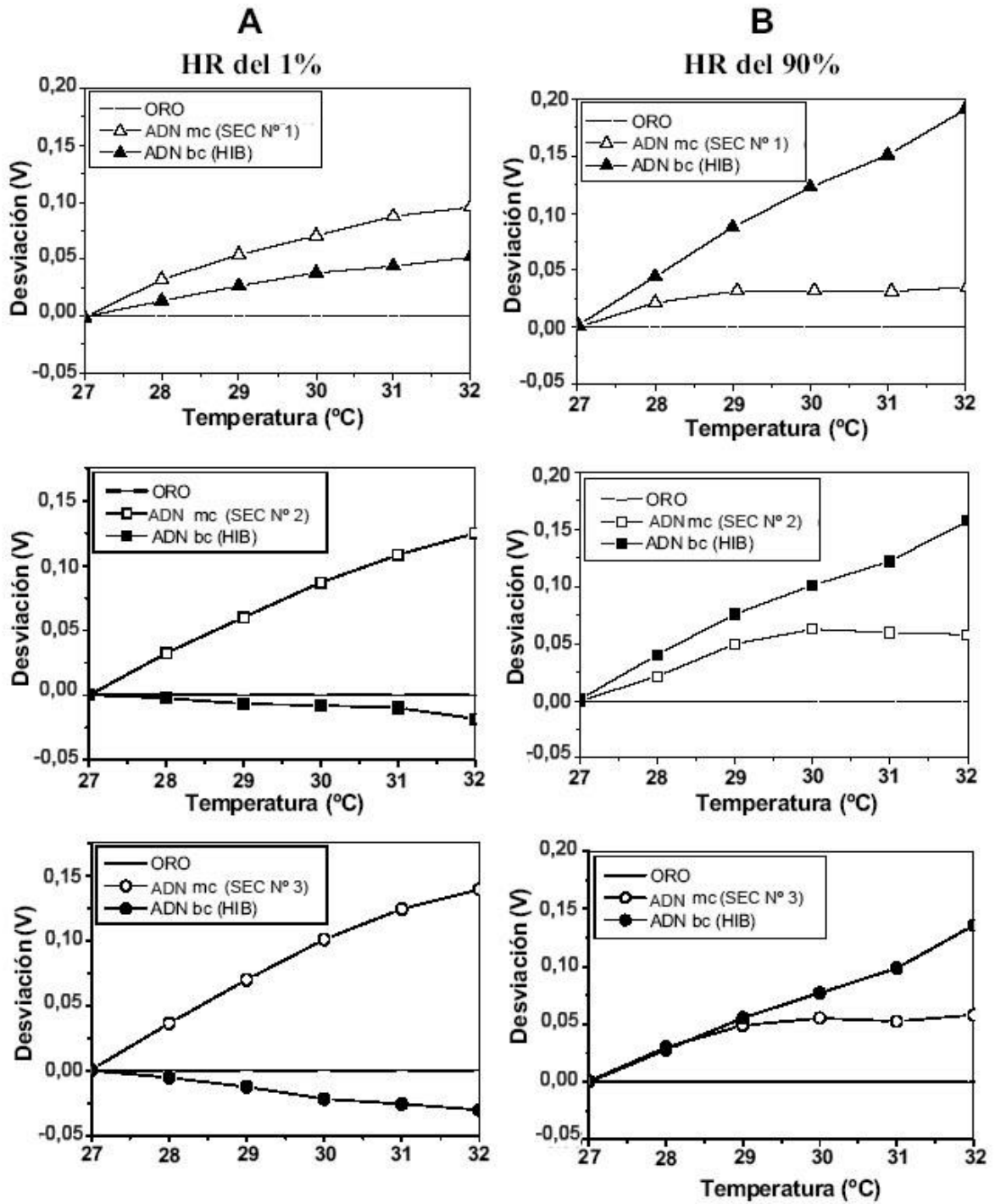


FIG. 4