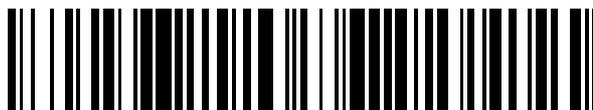


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 415**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 29/00** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08763311 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2171083**

54 Título: **Biodetección de conformación molecular**

30 Prioridad:

**21.06.2007 GB 0711994**

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

**22.05.2014**

73 Titular/es:

**FOUNDATION FOR RESEARCH AND  
TECHNOLOGY HELLAS (100.0%)  
Imbb-forth Vassilika Vouton P.O. Box 1385  
711 10 Heraklion, Crete, GR**

72 Inventor/es:

**TSORTOS, ACHILLEAS;  
PAPADAKIS, GEORGIOS y  
GIZELI, ELECTRA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 462 415 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

Biodetección de conformación molecular

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a métodos para determinar información relativa a la conformación de una muestra de biomoléculas usando un sensor de ondas acústicas en fase líquida. La invención también puede usarse para determinar información relativa a un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas tras una interacción.

**Antecedentes de la invención**

10 La presente invención aborda el problema de la determinación de información relativa a la conformación de biomoléculas y a cambios en la conformación de biomoléculas como resultado de una interacción con una especie química, tal como una macromolécula o ligando biológicos.

15 La conformación de biomoléculas afecta a sus interacciones químicas, y se ve afectada por ellas. Por ejemplo, la unión de proteínas afecta a la forma y a la actividad del ADN; se ha demostrado que el flexionamiento proteína-ADN facilita la formación de complejos de proteínas nucleares y desempeña un papel fundamental en el control de la transcripción y la replicación. Inversamente, el flexionamiento intrínseco de ADN y la deformabilidad inherente asociada a secuencias de bases específicas puede afectar al reconocimiento y unión de proteínas. El nivel hasta el cual el ADN se flexiona de forma intrínseca y la interacción con proteínas son el objeto del presente estudio. Unos métodos rápidos para la detección del flexionamiento de ADN facilitarían este proceso. Unos métodos rápidos para la detección del flexionamiento de ADN facilitarían el escrutinio de fármacos potenciales que tengan un modo de acción que implique un cambio en la conformación de ADN, por ejemplo, fármacos que afecten a la transcripción y a la regulación afectando al flexionamiento producido por proteínas.

20 Aunque la invención se discutirá más detalladamente en referencia a la determinación de información relativa a la conformación de ADN de doble cadena, y a los cambios en la conformación del ADN de doble cadena originados por interacciones del ADN de doble cadena, la invención es relevante para la determinación de información relativa a la conformación de otras macromoléculas biológicas, tal como proteínas, ARN, ADNss, etc. y a los cambios en su conformación originados por interacciones.

25 Los métodos empleados comúnmente para medir la curvatura de ADN incluyen ensayos de movilidad electroforética y ensayos de ciclación basados en mediciones de la velocidad con la que el ADN puede formar círculos cerrados sellados enzimáticamente. Sin embargo, puede ser difícil interpretar los resultados de estos ensayos. Las estructuras cristalinas tri-dimensionales de los complejos ADN-proteína proporcionan una visión detallada del mecanismo del flexionamiento de ADN producido por proteínas, pero esta información solo puede obtenerse tras un proceso largo y laborioso. El análisis estructural basado en disolución por RMN proporcionará asimismo información detallada, pero dichos métodos no son aplicables en todos los casos y no son adecuados para ensayos rápidos. La información estructural puede obtenerse a partir de imágenes de microscopio de fuerza atómica, pero la resolución es baja.

30 Mediante fluorescencia se ha estudiado ADN funcionalizado en los extremos para caracterizar la conformación de moléculas de ADN tanto pequeñas como grandes. Se ha usado microscopía confocal de moléculas de ADN grandes con colorante intercalado para proporcionar evidencias de que el radio de giro de moléculas funcionalizadas en el extremo es el mismo que el de moléculas en disolución. Las mediciones de interferencia de fluorescencia con ADN corto marcado en el extremo con un fluoróforo proporcionan una medida de la altura del marcador fluorescente dentro la estructura de ADN, lo que puede proporcionar una evidencia indirecta sobre la inclinación del ADN marcado en el extremo, sobre la forma del ADN de cadena sencilla y sobre el grado de hibridación. Sin embargo, una desventaja de estas técnicas es que requieren un marcador y solo proporcionan información limitada relativa a la conformación.

35 Por consiguiente, la invención está dirigida a proporcionar un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas y a los cambios en la conformación de biomoléculas producidos por una interacción con un agente (tal como otra biomolécula o una entidad química), que sea adecuado para sensores sin marcadores. La invención se puede usar para un escrutinio rápido y/o paralelo, aunque también puede usarse para estudiar la conformación de una molécula específica o el cambio de conformación de una molécula específica tras una interacción específica. Algunas realizaciones de la invención proporcionan información en tiempo real relativa a la conformación.

40 Aunque la invención se discutirá más detalladamente en referencia a la determinación de información relativa a la conformación de biomoléculas y a los cambios en la conformación de biomoléculas originados por interacciones de las biomoléculas usando un sensor de ondas acústicas de cizalladura, la invención se puede llevar a cabo usando otros tipos de sensor de ondas acústicas en fase líquida. Por "sensor de ondas acústicas en fase líquida" se pretende indicar un sensor de ondas acústicas en el que la superficie sensora del sensor de ondas acústicas está en contacto con un líquido en uso.

Es conocido el uso de un sensor de ondas acústicas de cizalladura para investigar las propiedades de capas de material que están adheridas a una superficie sensora del sensor, y se ha usado para detectar la presencia de moléculas diana que se unen selectivamente a la superficie sensora (por ejemplo, WO03/100412 (Atonomics aps), WO 97/41424 (Pence Inc.), Fortado et al. (ANALYTICAL Chemistry, vol. 71, nº 6, páginas 1167-1175, 515 marzo de 1999) y WO 2005/0501064 (Georgia Tech Res Inst)). Los sensores de ondas acústicas de cizalladura sondan la respuesta de una capa fina unida a la superficie del dispositivo frente a un desplazamiento mecánico y, por tanto, son sensibles a las propiedades mecánicas de la capa y del medio líquido que se encuentra dentro de la profundidad de penetración de la onda acústica de la superficie sensora (véase, por ejemplo, Cooper et al. (Journal of Molecular Recognition, vol. 20, nº 3, páginas 154-184, mayo de 2007), que discute los usos, y la teoría subyacente, de sensores acústicos piezoeléctricos)). La interacción entre ondas acústicas en modo de cizalladura y capas elásticas continuas fijadas firmemente, tal como láminas metálicas y/o disoluciones viscosas homogéneas ha sido descrita ampliamente tanto teórica como experimentalmente. La viscosidad de una capa superficial de biomoléculas dependerá, entre otras cosas, de la conformación de las biomoléculas, y se sabe que determina la viscosidad de una capa superficial que está unida a la superficie sensora de un dispositivo de ondas acústicas de cizalladura. Por ejemplo, Xiaomeng Wang et al (Molecular Biosystems, vol. 2, nº 3-4, páginas 184-192, marzo de 2006) describen la medida de un desplazamiento de conformación en una capa de calmodulina, Zhou et al. (Langmuir vol. 20, nº 14, páginas 5870-5818, 8 de junio 2004) describe el estudio de adsorción de inmunoglobulina humana.

Sin embargo, hasta la fecha, las biomoléculas unidas a la superficie sensora de un dispositivo de onda acústica de cizalladura se han analizado como si formaran una capa viscoelástica homogénea en la que la señal medida incluye contribuciones tanto de las biomoléculas inmovilizadas como de las moléculas de disolvente que estén atrapadas entre las biomoléculas inmovilizadas. Se han modelizado capas viscoelásticas usando los modelos mecánicos simples de Maxwell o Voigt para una capa viscoelástica, en los que se trata la capa como si estuviera compuesta por muelles elásticos y amortiguadores viscosos. Estos modelos se han usado para derivar información relativa a la viscosidad y al módulo de cizalla de la lámina sin hacer referencia alguna a la conformación específica de las biomoléculas de la lámina sensora.

La invención está dirigida a proporcionar una nueva estrategia para usar sensores de onda acústica en fase líquida para investigar la conformación de biomoléculas, y los cambios en la conformación de biomoléculas originados por interacciones, y una nueva estrategia para analizar las señales producidas por sensores de ondas acústicas en fase líquida, lo que facilita la investigación de la conformación de biomoléculas, y de los cambios en la conformación de biomoléculas originados por interacciones.

En la presente especificación y en las reivindicaciones anexas, las referencias a proteínas, ARN, ADN u otras macromoléculas biológicas pretenden incluir tanto macromoléculas naturales como variantes sintéticas, tal como proteínas que incluyen residuos no proteínogénicos, ácidos polinucleicos que incluyen bases no naturales, etc. El término "proteína" no pretende implicar ningún número específico de residuos peptídicos.

### 35 **Compendio de la invención**

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra líquida de biomoléculas que comprende las etapas de:

(i) proporcionar un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica, sensor de ondas acústicas que tiene una superficie sensora;

(ii) realizar una primera medida de la primera y segunda señales, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o fase de las oscilaciones de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas de fase líquida;

(iii) adherir biomoléculas de la muestra líquida de forma discreta sobre la superficie sensora;

(iv) realizar una segunda medida de la primera y segunda señales;

(v) calcular un parámetro de conformación a partir del cambio de la primera y segunda señales entre la primera y segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con la conformación de dichas biomoléculas que son adheridas de forma discreta a la superficie sensora entre la primera y la segunda medida, pero sustancialmente independiente del cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medida.

Con "de forma discreta" se entiende biomoléculas que son adheridas a la superficie sensora de tal modo que pueden modelarse de forma válida usando una relación matemática que suponga una interacción mínima o nula entre biomoléculas adheridas adyacentes. Por consiguiente, adhiriendo una muestra de biomoléculas de forma discreta a la superficie sensora y calculando el parámetro de conformación a través de una relación matemática que suponga una interacción mínima o nula entre biomoléculas adheridas adyacentes, se puede calcular un parámetro de conformación que es independiente de la carga másica. Esto contrasta con los cálculos conocidos que tratan las

biomoléculas sobre la superficie sensora como parte de una capa viscoelástica, donde la señal incluye una contribución entre biomoléculas y moléculas de disolvente atrapadas entre las biomoléculas.

5 Como el parámetro de conformación es sustancialmente independiente de la carga másica de la superficie sensora, el parámetro de conformación será sustancialmente independiente de la cantidad de biomoléculas que se han adherido a la superficie sensora. Esto facilita el cálculo preciso del parámetro de conformación en circunstancias en las que puede haber incertidumbre sobre el cambio de carga másica sobre la superficie sensora, por ejemplo, incertidumbre sobre qué masa de moléculas discretas se une a la superficie sensora entre la primera y la segunda medida.

10 Preferiblemente, el parámetro de conformación calculado es independiente del valor absoluto de carga másica de la superficie sensora, en un rango de operación de carga másica de la superficie sensora. Esto puede aumentar la precisión de la medida del parámetro de conformación en circunstancias en las que existe incertidumbre sobre el valor absoluto de la carga másica de la superficie sensora. Además, esto facilita la medida de la conformación de nuevas biomoléculas procedentes de segundas muestras (y potencialmente subsiguientes) que son adheridas subsiguientemente de forma discreta a la superficie. Por ejemplo, la cantidad de biomoléculas que son adheridas a la muestra puede comprender menos del 10%, menos del 5% o preferiblemente menos del 2% de la carga superficial máxima de biomoléculas. Esto significa que se pueden adherir consecutivamente de forma discreta a la superficie sensora múltiples muestras (p.ej., 5, 10, 50 ó 100) de biomoléculas discretas, y se puede calcular un parámetro de conformación con respecto a cada muestra a partir de la medida de la primera y segunda señales antes y después de la adherencia de cada muestra a la superficie sensora.

20 Por consiguiente, el método puede comprender adherir biomoléculas procedentes de una segunda muestra de forma discreta a la superficie sensora, hacer una tercera medida de la primera y segunda señales y calcular un segundo parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y segunda señales entre la medida llevada a cabo antes de la adhesión discreta de biomoléculas adicionales y la tercera medida, donde el segundo parámetro de conformación está relacionado con la conformación de las biomoléculas procedentes de la segunda muestra que son adheridas de forma discreta a la superficie sensora pero sustancialmente independiente de la carga másica de la superficie sensora entre la medida llevada a cabo antes de la adhesión discreta de las biomoléculas adicionales y la tercera medida. La medida llevada a cabo antes de la adhesión de las biomoléculas adicionales puede ser la segunda medida o puede ser una medida adicional de la primera y segunda señales. Estas etapas se pueden repetir con la tercera y subsiguientes muestras de biomoléculas.

30 El método se puede usar para determinar información sobre la conformación de las biomoléculas que están unidas de forma discreta a la superficie. El método se puede usar para determinar información sobre un cambio en la conformación de biomoléculas como resultado de una interacción con un agente (tal como otra biomolécula o una especie química), comparando el parámetro de conformación calculado tras la adherencia de una muestra medida de biomoléculas que han sido sometidas a interacción con un parámetro de conformación de control calculado tras la adherencia de una muestra de control de biomoléculas que no han sido sometidas a dicha interacción, o que han sido sometidas a una interacción diferente. La adherencia de una muestra de biomoléculas que han sido sometidas a una interacción a una superficie sensora y la adherencia de una muestra de biomoléculas que no han sido sometidas a una interacción a una superficie sensora pueden tener lugar simultáneamente, consecutivamente (en cualquier orden) o a tiempos diferentes, sobre la misma superficie sensora o sobre superficies sensoras diferentes.

40 El método puede implicar la realización de una medida cuantitativa de cambios en la conformación originados por una interacción particular. El método puede implicar la realización de una medida cuantitativa de cambios en la conformación originados por una interacción particular, por ejemplo, el método se puede usar para determinar si un cambio en la conformación ha sido originado por una interacción particular.

45 El método puede usarse para establecer información sobre la conformación de las biomoléculas que han sido puestas en contacto con la superficie sensora relacionando el parámetro de conformación calculado con la conformación o rango de conformaciones que podrían conducir al parámetro de conformación calculado. El parámetro de conformación calculado puede relacionarse con la conformación o con el rango de conformaciones que podrían conducir al parámetro de conformación calculado usando una correlación obtenida teóricamente y/o empíricamente. El parámetro de conformación calculado puede relacionarse con un parámetro de forma que describa la forma de las biomoléculas adheridas. El parámetro de conformación calculado y/o el parámetro de forma cuando sea relevante, pueden usarse para predecir la conformación de las biomoléculas o el cambio de conformación de las biomoléculas originado por una interacción.

55 Típicamente, la primera señal está relacionada con las pérdidas viscosas en el medio próximo a la superficie sensora, pero no con la carga másica de la superficie sensora, y la segunda señal está relacionada principalmente con la carga másica de la superficie sensora. Típicamente, las pérdidas viscosas en el medio próximo a la superficie sensora están relacionadas, entre otras cosas, con la conformación de las biomoléculas que están adheridas discretamente a la superficie sensora.

La primera señal que está relacionada con pérdidas energéticas de la onda acústica puede estar relacionada (p.ej., ser proporcional) a la amplitud de la onda acústica. La primera señal puede estar relacionada (p.ej., ser proporcional)

a la disipación de la onda acústica. La primera señal puede estar relacionada con parámetros análogos a circuitos eléctricos tales como los parámetros de impedancia, admitancia o ancho de banda del sensor acústico.

5 El sensor de onda acústica de fase líquida puede ser un dispositivo de tipo Onda Acústica en Masa, tal como una Microbalanza de Cristal de Cuarzo o un resonador de Modo Cizallamiento de Espesor. En este caso, la segunda señal se relacionará típicamente con la frecuencia de oscilación del sensor de onda acústica de fase líquida y la primera señal se relacionará típicamente con la disipación de energía de la onda generada mediante el sensor de onda acústica.

10 El sensor de onda acústica de fase líquida puede ser un sensor de onda acústica que genere una onda de cizallamiento; dispositivos tales como los de Onda Acústica Superficial pueden emplear transductores interdigitalizados para generar una onda de cizallamiento, tal como onda Love, onda en Masa de Barrido Superficial, Modo de Placa Acústica, onda Bleustein-Gulyaev u Onda Transversal Superficial. En este caso, la primera señal estará relacionada típicamente con la amplitud de la onda acústica superficial que se genera y la segunda señal estará relacionada típicamente con la fase (a veces expresada como una frecuencia) de la onda acústica superficial que se genera.

15 El sensor de ondas acústicas de cizalladura puede ser un dispositivo no basado en IDT tal como un dispositivo que emplee una onda acústica de cizalladura excitada electromagnéticamente.

El sensor de ondas acústicas de fase líquida puede ser un sensor de ondas acústicas que use una membrana delgada para excitar una onda acústica en una configuración conocida como Onda de Placa Flexural o dispositivo de onda Lamb.

20 Preferiblemente, la etapa de calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y segunda señales entre la primera y segunda medidas usa una correlación entre el parámetro de conformación y la primera y segunda señales que supone una interacción mínima o nula entre biomoléculas adheridas adyacentes. Por ejemplo, puede suponer que la constante de Huggins aplicable es cero, o alternativamente que está próxima a cero.

25 Preferiblemente, el parámetro de conformación es la relación acústica, o un parámetro que está directamente relacionado con la relación acústica. La relación acústica es la relación del cambio en la amplitud o la disipación de energía de la onda acústica, o un parámetro equivalente relacionado con las pérdidas energéticas por la onda acústica generado a través del sensor de ondas acústicas, respecto al cambio en la frecuencia o la fase de la onda acústica. Por consiguiente, si la primera señal es igual a la amplitud o la disipación de energía de la onda acústica y la segunda señal es igual a la fase o la frecuencia de la onda acústica, la relación acústica es igual al cambio en la primera señal dividido por el cambio en la segunda señal. En la práctica, la primera señal puede no ser igual a la amplitud o la disipación de energía de la onda acústica, sino que en su lugar puede ser una función de la amplitud o de la disipación de energía de la onda acústica (p.ej., ser proporcional a ellas), y la segunda señal puede ser una función de la fase o la frecuencia de la onda acústica (p.ej., ser proporcional a ellas). El especialista en la técnica puede tener en cuenta fácilmente dichas relaciones matemáticas a la hora de preparar un algoritmo para calcular la relación acústica o un parámetro que esté directamente relacionado con la relación acústica. La relación acústica puede estar relacionada con la conformación de las biomoléculas usando una relación teórica y/o una relación empírica. Se puede medir la relación acústica de biomoléculas modelo de conformación conocida o predicha y usarse con fines comparativos.

40 En algunas aplicaciones, el parámetro de conformación puede compararse con un valor o rango de valores predeterminados. Por ejemplo, cuando se realiza un escrutinio de muchas especies químicas frente a muestras de biomoléculas, puede ser necesario simplemente determinar si el parámetro de conformación, en uno o más casos, es diferente del parámetro de conformación que cabría esperar si no se hubiera producido ninguna interacción que hubiera originado un cambio en la conformación de la muestra de biomoléculas.

45 Las biomoléculas pueden comprender polinucleótidos, por ejemplo ADN de cadena sencilla o de cadena doble. La superficie sensora puede comprender un agente de unión que se una de forma no específica a una clase de biomoléculas, una molécula de reconocimiento que se una específicamente a las biomoléculas, un agente de unión que se una de forma no específica a un marcador que esté unido a las biomoléculas o una molécula de reconocimiento que se una específicamente a un marcador que esté unido a las biomoléculas.

50 La invención se extiende en un segundo aspecto a un método para escrutar una pluralidad de agentes de ensayo (p.ej., proteínas o entidades químicas) para investigar su efecto sobre la conformación de una biomolécula diana como resultado de la interacción entre el agente de ensayo y la biomolécula diana, que comprende las etapas de presentar una pluralidad de agentes de ensayo a biomoléculas diana, calcular un parámetro de conformación que relacione cada muestra de las biomoléculas diana mediante el método del primer aspecto, y analizar el parámetro de conformación calculado que relaciona cada muestra para establecer el efecto del agente de ensayo sobre la conformación de la biomolécula diana. Por ejemplo, el método puede usarse para investigar si un agente de ensayo ha causado un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana, si un agente de ensayo ha causado un cambio específico en la conformación de una muestra de biomoléculas diana, o si un agente de ensayo

ha causado un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana que es diferente a un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana tras una interacción con un agente de ensayo de control.

5 Las biomoléculas procedentes de las muestras de biomoléculas diana pueden adherirse de forma discreta a la misma superficie sensora por turnos, teniendo lugar las medidas de la primera y segunda señales entre la adherencia de cada muestra a la superficie sensora. Se puede usar un conjunto de sensores de ondas acústicas que tengan superficies sensoras separadas, o un sensor de ondas acústicas que tenga canales múltiples en la misma área sensora, para analizar los efectos de una pluralidad de agentes de ensayo diferentes sobre las muestras de biomoléculas diana de una sola vez. Ambas técnicas se pueden combinar para realizar un escrutinio de muchos agentes de ensayo.

10 La invención se extiende en un tercer aspecto a un método para realizar el escrutinio de una pluralidad de muestras de diferentes biomoléculas (p.ej., diferentes moléculas de ADN de doble cadena o proteínas) para investigar el efecto de un agente de ensayo (p.ej., una proteína o una entidad química) sobre la conformación de las biomoléculas en la pluralidad de muestras de diferentes biomoléculas, que comprende las etapas de introducir un agente de ensayo en la pluralidad de muestras de diferentes biomoléculas, calcular un parámetro de conformación que relacione cada muestra de biomoléculas diana mediante el método del primer aspecto, y analizar el parámetro de conformación calculado que relacione cada muestra para establecer el efecto del agente de ensayo sobre la conformación de las biomoléculas de la muestra.

20 El método puede usarse, por ejemplo, para investigar si un agente de ensayo ha originado un cambio en la conformación de las biomoléculas de una muestra, o si un agente de ensayo ha originado un cambio específico en la conformación de biomoléculas diana en una muestra. El método puede comprender la etapa de comparar el parámetro de conformación calculado con respecto a una muestra de biomoléculas que no ha sido puesta en contacto con el agente de ensayo y el parámetro de conformación calculado con respecto a una muestra de biomoléculas que sí ha sido puesta en contacto con el agente de ensayo.

25 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un aparato biosensor para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas, en una muestra líquida de biomoléculas, aparato que comprende un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica:

30 presentando el sensor de ondas acústicas una superficie sensora que se puede operar para generar una primera señal y una segunda señal, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o la fase de las oscilaciones de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas, comprendiendo adicionalmente el aparato un sistema de procesamiento de datos que esté adaptado para calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y la segunda señales entre la primera medida y una segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con la conformación de dichas biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora entre el tiempo en el que se realiza la primera medida y el tiempo en el que se realiza la segunda medida, pero es sustancialmente independiente del cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medidas; o

40 el sensor de ondas acústicas que tiene una superficie sensora que está en contacto con un líquido y a la cual se puede adherir una muestra de biomoléculas de forma discreta, pudiendo operarse el aparato biosensor para generar la primera y segunda señales, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas, comprendiendo adicionalmente el aparato un sistema de procesamiento de datos que esté adaptado para calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y segunda señales entre una primera medida y una segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con el cambio en la conformación de una proporción de biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora entre el tiempo en el que se toma la primera medida y el tiempo en el que se toma la segunda medida, pero que es sustancialmente independiente de cualquier cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera medida y la segunda medida (con lo cual, el aparato puede usarse para medir parámetros relativos a cambios en la conformación de biomoléculas originados por una interacción con un agente por adherencia de una muestra de las biomoléculas de forma discreta sobre la superficie sensora y presentando el agente de ensayo a la superficie sensora entre la primera medida y la segunda medida).

50 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar información relativa a cambios en la conformación de biomoléculas originados por su interacción con un agente que comprende las etapas de:

55 (i) proporcionar un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica, sensor de ondas acústicas que tiene una superficie sensora en contacto con un líquido, con biomoléculas adheridas de forma discreta a la superficie sensora;

(ii) realizar una primera medida de la primera y segunda señales, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o fase de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas;

(iii) presentar el agente a las biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora;

(iv) realizar una segunda medida de la primera y segunda señales; y

5 (v) calcular un parámetro de conformación a partir del cambio de la primera y segunda señales entre la primera y segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con el cambio de conformación de biomoléculas adheridas que cambian de conformación entre la primera y la segunda medida, como resultado de su interacción con el agente, pero sustancialmente independiente de cualquier cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medida.

10 Por lo tanto, el método se puede usar para establecer un parámetro de conformación que sea indicativo del cambio en la conformación de las biomoléculas que cambian de conformación entre la primera y la segunda medida, como resultado de su interacción con el agente, pero que es sustancialmente independiente de cualquier cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medidas y también es independiente de la proporción de biomoléculas que cambian de conformación.

15 Otras características adicionales corresponden a las características opcionales discutidas anteriormente en relación a los primeros cuatro aspectos de la invención. En particular, el cálculo del parámetro de conformación y los detalles de la primera y segunda señales son los mismos descritos antes en relación a los primeros cuatro aspectos de la presente invención. Típicamente, el parámetro de conformación será la relación acústica.

20 La proporción de biomoléculas adheridas a la superficie sensora que cambian de conformación puede ser inferior al 10%, inferior al 5%, inferior al 2% o inferior al 1% de las biomoléculas adheridas a la superficie sensora. Por lo tanto, el procedimiento se puede repetir presentando agentes adicionales a las biomoléculas para favorecer un escrutinio rápido de una pluralidad de agentes, y determinar si afectan a la conformación de las biomoléculas que están adheridas a la superficie sensora.

25 La invención se puede extender en un sexto aspecto a un método para escrutar una pluralidad de agentes de ensayo (p.ej., proteínas o entidades químicas) para investigar su efecto sobre la conformación de una biomolécula diana como resultado de la interacción entre el agente de ensayo y las biomoléculas diana, que comprende las etapas de presentar una pluralidad de agentes de ensayo a biomoléculas diana, calcular un parámetro de conformación que relacione cada muestra de las biomoléculas diana mediante el método del quinto aspecto, y analizar el parámetro de conformación calculado que relaciona cada muestra para establecer el efecto del agente de ensayo sobre la conformación de las biomoléculas diana.

30 Por ejemplo, el método puede usarse para investigar si un agente de ensayo ha originado un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora, si un agente de ensayo ha causado un cambio específico en la conformación de una muestra de biomoléculas diana que están adheridas de forma discreta a una superficie sensora, o si un agente de ensayo ha causado un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana que están adheridas de forma discreta a una superficie sensora es diferente a un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas diana que están adheridas de forma discreta a una superficie sensora tras una interacción con un agente de ensayo de control.

35 Para analizar el efecto de múltiples agentes sobre muestras de las mismas biomoléculas, al mismo tiempo, se puede usar un conjunto de sensores de ondas acústicas que tengan superficies sensoras separadas, o un sensor de ondas acústicas que tenga canales múltiples.

40 Según un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un método para realizar el escrutinio de una pluralidad de muestras de diferentes biomoléculas (p.ej., diferentes moléculas de ADN de doble cadena o proteínas) para investigar el efecto de un agente de ensayo (p.ej., una proteína o una entidad química) sobre la conformación de las biomoléculas en la pluralidad de muestras de diferentes biomoléculas, que comprende las etapas de presentar un agente de ensayo a una pluralidad de superficies sensoras con diferentes muestras de biomoléculas adheridas a ellas de forma discreta, calcular un parámetro de conformación que relacione cada muestra de biomoléculas mediante el método del quinto aspecto, y analizar el parámetro de conformación calculado que relacione cada muestra para establecer el efecto del agente de ensayo sobre la conformación de las biomoléculas de cada muestra.

45 Por ejemplo, el método puede usarse para investigar si un agente de ensayo ha provocado un cambio en la conformación de una muestra de biomoléculas que están adheridas de forma discreta a una superficie sensora, o si un agente de ensayo ha provocado un cambio específico en la conformación de una muestra de biomoléculas que están adheridas de forma discreta a una superficie sensora.

### Descripción de las Figuras

Ahora se ilustrará un ejemplo de realización de la presente invención en referencia a las siguientes Figuras, en las que:

5 La Figura 1 es una representación esquemática de la capa sensora de un dispositivo de ondas acústicas superficiales de onda Love;

La Figura 2 es una representación, que no está a escala, de una superficie/interfase líquida biosensora a la cual se han unido generalmente moléculas de ADN de cadena doble de varias longitudes mediante de un ligando de biotina y una superficie de oro modificada con neutravidina;

10 La Figura 3 es un gráfico que muestra, en tiempo real, el cambio en amplitud y el cambio de fase durante la aplicación de: (a) 100 µg/mL de neutravidina, seguida de muestras de ADN de 167 pb de, (b) 1,2; (c) 2,4; (d) 3,6 y (e) 4,8 µg/mL. Las etapas de lavado con tampón después de cada deposición se muestran en la gráfica;

La Figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la relación acústica ( $\Delta A/\Delta Ph$ ) medida para cada adición de ADN mostrada en la Figura 3;

15 La Figura 5 es un gráfico de la relación acústica ( $\Delta A/\Delta Ph$ ) frente al % de cobertura superficial de ADN para moléculas de ADN de cadena doble de 198 (•), 167 (■), 132 (♦), 75 (▲) y 20 (x) pares base que corresponden a una

longitud de contorno de 67,3, 56,8, 44,9, 25,5 y 6,8 nm, respectivamente. Los ejes x e y son equivalentes a:  $\frac{\eta_{sp}}{C_i^{surf}}$  o  $[\eta]$  y  $C_i^{surf}$ ;

La Figura 6 es una comparación de las relaciones acústicas ( $\Delta A/\Delta Ph$ ) de los ADNs de 90 pares base usados con tres conformaciones diferentes, es decir, una forma "recta", "doblada" y "triangular"; y

20 La Figura 7 es una representación de la relación acústica,  $\Delta A/\Delta Ph$ , frente a la longitud de contorno de moléculas de ADN rectas (interior); con los valores  $\alpha_i$  calculados para cada longitud  $L_i$  mediante la Ecuación [6]; la línea continua

es un ajuste lineal ( $R^2=0,995$ ) de los datos; el eje y es equivalente a  $\frac{\eta_{sp}}{C_i^{surf}}$  o  $[\eta]$ .

### Descripción Detallada de un Ejemplo de Realización

25 En referencia a la Figura 1, un ejemplo de aparato para investigar la conformación de ADN de cadena doble, o los cambios en la conformación de ADN de cadena doble después de una interacción, comprenden un sensor de onda Love 1, cuya construcción se describe en la sección de Materiales y Métodos incluida más adelante. El sensor comprende una capa de cuarzo 2, superpuesta a una capa de polimetilmetacrilato (PMMA) 4 que guía la onda acústica superficial de cizallamiento horizontal (SH-SAW) a la región superficial, aumentando la sensibilidad del dispositivo frente a perturbaciones superficiales. Se forma una superficie sensora mediante una capa de oro superficial 6 a la cual se ha adsorbido Neutravidina 8 (Neutravidina es una marca comercial de Pierce Biotechnology, Inc.). Un analizador de red conduce los electrodos interdigitales del sensor de onda Love y mide la amplitud (que constituye la primera señal) y la fase (que constituye la segunda señal) de la onda acústica superficial resultante de forma continua. La viscosidad de un líquido que es aplicado sobre la superficie del dispositivo da como resultado la disipación de la energía de la onda acústica, medida como el cambio de la amplitud en el caso de un dispositivo de onda Love. La profundidad de penetración  $\delta$  de la onda dentro de la muestra líquida es igual al punto en el que la amplitud de la onda ha decaído a 1/e de su valor inicial y viene dada por:

$$\delta = (2\eta/\rho\omega)^{1/2} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

40 donde  $\eta$  es la viscosidad de la disolución,  $\rho$  es la densidad y  $\omega$  es la frecuencia de oscilación. A la frecuencia de operación de 155 MHz del sensor de onda Love descrita en este ejemplo de realización, el espesor de la capa de agua atrapada es de 45 nm.

Para su uso, se introduce una muestra de ADN de cadena doble biotilada en el medio líquido que está en contacto con la superficie sensora. El ADN de cadena doble se adhiere a la superficie sensora en virtud de la interacción específica entre biotina 12 y Neutravidina 8. Las moléculas de ADN de cadena doble están unidas de forma discreta a la superficie sensora. No están unidas unas a otras y sus puntos de unión están separados.

45 Se determina el cambio en la amplitud ( $\Delta A$ ) y la fase ( $\Delta Ph$ ) de la onda acústica superficial entre una primera medida llevada a cabo antes de la adherencia de la muestra de ADN a la superficie sensora y una segunda medida llevada a cabo tras la adherencia de la muestra de ADN a la superficie sensora. Se calcula la relación acústica,  $\Delta A/\Delta Ph$ , manualmente o usando un aparato de procesamiento de datos automatizado, tal como un ordenador. Sorprendentemente, la relación acústica (que sirve como parámetro de conformación) está relacionada con la

- conformación de las biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora pero es sustancialmente independiente del cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medida. Además, la relación acústica es sustancialmente independiente del valor absoluto de la carga másica de la superficie sensora en un rango de operación, que típicamente se extiende desde una carga de casi ninguna biomolécula hasta el 50%, el 75%, el 90% o cerca del 100% de cobertura superficial de biomoléculas adheridas. Esto facilita la investigación de la conformación del ADN de cadena doble de la muestra a pesar de incertidumbres tales como la cantidad de ADN de cadena doble que se ha adherido a la superficie sensora y si otras muestras de ADN de cadena doble se han adherido ya o no a la superficie sensora. Esta propiedad no ha sido predicha o utilizada por modelos existentes que describen la capa sensora como elástica y/o viscosa.
- Ahora se discutirán dos experimentos que demuestran la eficacia de este método para investigar la conformación de biomoléculas. En estos experimentos se unieron moléculas de ADN de cadena doble, preparadas mediante la técnica de PCR y con una conformación que puede predecirse a partir de las secuencias de bases de las moléculas de ADN, a una superficie de dispositivo modificada con Neutravidina usando una biotina unida al extremo de cada molécula de ADN, mediante una bisagra de once átomos de carbono. Se llevaron a cabo experimentos en un sistema de flujo a través que permitió la adición continua de muestras de ADN consecutivas y tampón Tris de forma alternativa. La unión de ADN a la superficie del dispositivo se consideró específica ya que los experimentos de control llevados a cabo con ADN no biotinilado no produjeron ninguna señal detectable.

#### **Experimento Uno - Detección acústica de moléculas de ADN de doble cadena rectas de forma similar pero con tamaño variable**

- Muestras de ADN de cadena doble aplicadas a la superficie de los dispositivos de ondas acústicas presentaban longitudes de pares base de 20, 75, 90, 132, 167 y 198, lo que les confería unas longitudes de contorno de 6,8, 25,5, 30,6, 44,9, 56,8 y 67,3 nm (Figura 2). Se midieron los cambios de amplitud y de fase a partir de las curvas de unión en tiempo real obtenidas durante las adiciones secuenciales de alícuotas de 100  $\mu$ L con concentraciones finales de ADN en el rango de 1 a 8  $\mu$ g/mL. También se usaron adiciones secuenciales de alícuotas de 100  $\mu$ L a la misma concentración con fines de monitorización. La Figura 3 muestra el cambio en ambas señales acústicas durante la adición de Neutravidina (100  $\mu$ g/mL) seguida de la adición de cuatro concentraciones diferentes de muestras de ADN de 167 pb en tampón Tris (1,2, 2,4, 3,6 y 4,8  $\mu$ g/mL). Las relaciones acústicas,  $\Delta A/\Delta Ph$ , que se calcularon a partir de las mediciones realizadas antes y después de cada adición de ADN, se representan frente a la concentración de ADN en la Figura 4. Con la excepción de los primeros 90 s durante la primera adición, se observó que la relación acústica era constante e independiente del tiempo de unión y de la concentración de muestra. En todos los casos, se midió la relación acústica para el mismo tiempo, 300 s tras la adición de cada muestra de ADN. Se obtuvo la misma relación durante la saturación de la superficie con la adición de 14  $\mu$ g/mL del ADN de 167 pb. También se obtuvo una relación constante característica para todas las moléculas de ADN de cadena doble rectas usadas en los experimentos descritos en la presente memoria.
- La cobertura superficial de ADN se calculó como la fracción del número disponible máximo de sitios de unión de neutravidina. Este último es igual al número de moléculas de Neutravidina requeridas para completar la cobertura superficial, que con mediciones de SPR se ha determinado que es de 295 ng/cm<sup>2</sup> ó de 4,9 moles/cm<sup>2</sup>, suponiendo que en cada molécula de proteína hay disponible aproximadamente un sitio para la unión de ADN. Se supuso una relación 1:1 de ADN:Neutravidina ya que consideraciones de repulsiones electrostáticas y de impedimentos estéricos no permiten relaciones mayores. La distancia entre sitios adyacentes está muy próxima al diámetro de las varillas de ADN hidratado cargado negativamente (que es aproximadamente de 2,0 nm), como han indicado otros estudios.

- La Figura 5 proporciona la relación acústica para todas las moléculas de ADN de cadena doble evaluadas en los experimentos en función de la cobertura superficial. Una característica sorprendente del sistema es que la relación acústica medida para cada molécula de ADN era independiente de la historia del dispositivo; la adición de las muestras de ADN en orden aleatorio no tuvo ningún efecto sobre los valores medidos (datos no mostrados). Esto demuestra que la medición de la relación acústica refleja únicamente propiedades intrínsecas de cada molécula y es independiente del valor absoluto de carga másica sobre la superficie sensora.

#### **Experimento Dos - Detección acústica de moléculas de ADN de tamaño similar pero con formas diversas**

- Se preparó una serie de tres moléculas de ADN de cadena doble diferentes con una longitud de 90 pares base, y por lo tanto sustancialmente del mismo peso molecular y longitud de contorno, pero con diferente forma. Las secuencias de moléculas de ADN se eligieron de tal modo que la conformación de la molécula fuera "recta" (fuera de fase) o "doblada", con una curvatura que aparece a mitad de la molécula (fase 1). Adicionalmente, se preparó ADN "doblado" con ambos extremos biotinilados (fase 2) y también se unió a la superficie del dispositivo acústico para formar una estructura triangular de forma general.

Se midió la relación acústica para deposiciones consecutivas de las tres muestras sobre la misma superficie sensora durante el transcurso de un único experimento y también para deposiciones sobre superficies recién preparadas en experimentos separados. En la Figura 6 se resumen los valores promedio de las relaciones acústicas calculadas tras los experimentos usando cuatro dispositivos diferentes. Para las mediciones llevadas a cabo durante un

experimento, los ADNs "doblados" y "triangulares" presentaron relaciones acústicas que fueron un 78% y un 67%, respectivamente, de la del ADN recto. Esto supone una diferencia significativa y demuestra que la relación acústica proporciona información sobre la conformación de biomoléculas.

### Modelo Teórico

5 El siguiente modelo teórico explica la relación entre la relación acústica y la configuración de biomoléculas que están unidas a la superficie sensora de un sensor de ondas acústicas. Este modelo considera cómo la viscosidad del volumen sometido al sensor se ve afectada por la presencia de moléculas de ADN en los diferentes niveles de cobertura superficial.

10 La viscosidad de un líquido, por definición, refleja su resistencia al flujo. La adición de moléculas grandes al líquido incrementa la viscosidad de un modo dependiente de tres parámetros: concentración, tamaño y estructura, que a su vez dependen del peso molecular y de la conformación de dichas moléculas. Dicha resistencia al flujo está asociada a la disipación de una determinada cantidad de energía. Si se toman los cambios en la disipación de energía (que se miden como un cambio en la amplitud para el caso de un dispositivo de onda Love) para reflejar cambios en la viscosidad en la interfase sustrato/líquido dentro del volumen evaluado por el sensor, entonces los cambios de este valor debería reflejar estrechamente los cambios de concentración, tamaño y estructura de las moléculas grandes, y por tanto de la conformación de las biomoléculas.

La teoría de la viscosidad de disolución de macromoléculas indica que:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad \text{[Ecuación 2]}$$

20 donde  $\eta_{sp}$  es la viscosidad específica de la disolución a una concentración particular C,  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca para un soluto particular (es decir, ADN en este caso) y  $K_H$  es la denominada constante de Huggins. (Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry, Parte II; Freeman: San Francisco, 1980; Tanford, C. Physical Chemistry of Macromolecules; Wiley: NY, 1961).

25 Por lo tanto, el siguiente análisis de datos se basa en dos suposiciones. En primer lugar, que el cambio en la amplitud ( $\Delta A$ ) se corresponde a un  $\eta_{sp}$  de viscosidad (puesto que  $\eta_0$  es simplemente una constante para la disolución tamponante), y, en segundo lugar, que el cambio en la fase ( $\Delta Ph$ ) se corresponde y/o es equivalente a la concentración (superficial) de macromoléculas. Como se ha demostrado mediante los experimentos ilustrados en la Figura 5, la relación acústica,  $\Delta A/\Delta Ph$ , es independiente de la cobertura superficial, es decir, de la concentración superficial, para todas las moléculas de ADN "rectas"; lo mismo es válido para las moléculas de ADN "dobladas" y "triangulares" (datos no mostrados). Para caudales bajos y moléculas discretas que no interaccionan,  $K_H$  puede ser de hecho cero, o muy próximo a cero, para que una representación de  $\eta_{sp}/C_i^{surf}$  frente a  $C_i^{surf}$  sea casi horizontal. Puesto que la capacidad/posibilidad de interacciones laterales, al menos para ADN "triangular" unido por dos puntos, disminuye enormemente, se puede suponer que  $K_H$  es de hecho cero para todas las moléculas de ADN usadas en este estudio.

35 Puesto que  $\Delta Ph$  es proporcional a la masa total unida por área superficial, usando la ecuación [1] con  $K_H = 0$  se obtiene:

$$\frac{\Delta A}{\Delta Ph} \propto \frac{[\eta]C^{surface}}{C^{surface}} \propto [\eta] \quad \text{[Ecuación 3]}$$

40 donde  $C^{surface}$  representa la concentración de una molécula de ADN particular anclada sobre la superficie del cristal (área S) dentro del volumen sometido a sensor acústico  $V=S\delta$  mientras que la masa viene dada por definición como:  $(n^\circ \text{ varillas ancladas})MW/NA = dV$ , siendo d la densidad (constante) de ADN, V el volumen de cada varilla de ADN y NA el número de Avogadro.

En el caso de ADN recto, o de otras moléculas que puedan ser tratadas como varillas rectas, se puede usar la bien conocida relación de Mark-Houwink, que correlaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular de una macromolécula en un disolvente particular.

$$[\eta] = K(MW)^\alpha \quad \text{[Ecuación 4]}$$

45 Aquí,  $\alpha$  es un factor indicativo de la forma, que oscila entre aproximadamente 0,5 para bobinas aleatorias hasta aproximadamente 1,8 para moléculas de varilla rígida recta. La longitud de persistencia de ADN-ds se supone entre 50 y 80 nm, por lo que las cadenas usadas en el presente estudio puede considerarse con seguridad como varillas rígidas cortas.

Derivando la Ecuación 4, usando la Ecuación 3 y observando que  $MW \propto L \propto \frac{a}{b}$ , se calcula el valor de  $\alpha$  para cada ADN de varilla recta como:

$$\alpha = \frac{d \ln v}{d \ln \left(\frac{a}{b}\right)} \quad \text{[Ecuación 5]}$$

5 Aquí, los factores de forma  $v$  se toman de la ecuación Simha, aproximando la forma de moléculas de ADN rígido a la de un elipsoide prolado, siendo  $a$  y  $b$  los semiejes mayor y menor del elipsoide.

$$v = \frac{(a/b)^2}{5[\ln(2a/b) - 1/2]} + \frac{(a/b)^2}{15[\ln(2a/b) - 3/2]} + \frac{14}{15} \quad \text{[Ecuación 6]}$$

10 La Figura 7 muestra una representación de la relación acústica,  $\Delta A/\Delta Ph$ , frente a la longitud de cada molécula de ADN recta usada. La línea curvada obtenida (ver interior) debería volverse recta si el coeficiente " $\alpha$ ", calculado con la Ecuación 5, es diferente para cada longitud suponiendo que la teoría predice con precisión el comportamiento del sistema. La Figura 7 muestra que se ha obtenido un ajuste lineal excelente, lo que valida la anterior aproximación.

15 Para el caso de ADN doblado, o de otras biomoléculas que puedan ser tratadas como varillas dobladas, la correlación de la Ecuación 3 predice que la energía disipada por unidad de masa es proporcional a la viscosidad intrínseca de las moléculas relevantes y no depende del grado de cobertura superficial. La comparación directa de esta relación, para moléculas con la misma masa pero diferente forma, con la relación de sus respectivas viscosidades intrínsecas debería ser una validación para la teoría empleada. Hemos demostrado en el experimento ilustrado en la Figura 5 que esto se aplica en el caso de cadenas de ADN dobladas con diferentes modos de unión sobre la superficie.

20 Adicionalmente, se observó que las viscosidades intrínsecas del ADN "doblado" y "triangular" (Figura 6) calculadas en base a modelos matemáticos están en excelente acuerdo con la relación experimental, lo que valida adicionalmente esta estrategia (García de la Torre, J.; Bloomfield, V. *Biopolymers* 1978, 17, 1605-1627; García de la Torre, J.; Bloomfield, V. *Q. Rev. Biophys.* 1981, 14, 81-139).

Por lo tanto, la relación acústica puede relacionarse con un factor de forma, u otro parámetro relacionado con la conformación de biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora de un sensor de ondas acústicas.

## 25 Aplicaciones

Aunque los ejemplos experimentales descritos en la presente memoria se relacionan con un análisis de la conformación de ADN de cadena doble, se pueden usar los mismos principios para determinar información relativa a la conformación de otros tipos de biomolécula, tales como las proteínas. La relación acústica se puede determinar a partir del cambio en las señales producidas por un sensor de ondas acústicas cuando las biomoléculas están adheridas de forma discreta a la superficie sensora. La relación acústica se calcula típicamente como  $\Delta A/\Delta Ph$  cuando el dispositivo sensor es un dispositivo de Onda Acústica Superficial. Cuando el dispositivo sensor es un dispositivo de Onda Acústica en Masa, la relación acústica puede calcularse típicamente dividiendo el cambio en la disipación de energía de la onda acústica por el cambio en la frecuencia de la onda acústica cuando las moléculas están adheridas de forma discreta a la superficie sensora. El especialista en la técnica podría calcular potencialmente otros parámetros de conformación que estén relacionados con la conformación de biomoléculas adheridas de forma discreta a la superficie sensora de un sensor de ondas acústicas para sistemas diferentes.

40 Debido a que se ha observado que la relación acústica es independiente de la cobertura superficial, se pueden analizar muestras en disolución sin controlar la concentración o cantidad, mejorando la precisión de los parámetros de conformación calculados. Adicionalmente, debido a que se ha observado que la relación acústica es independiente de la cobertura superficial, se pueden aplicar muestras múltiples secuencialmente a un dispositivo.

45 Estas propiedades tienen beneficios importantes. Los experimentos descritos en la presente memoria aprovechan diferencias de señal que habrían sido demasiado pequeñas para ser detectadas con fiabilidad mediante mediciones en dispositivos separados, por ejemplo, mediciones realizadas usando un dispositivo separado para un control. El uso de un único dispositivo para múltiples mediciones consecutivas en las que se adhieren consecutivamente una pluralidad de muestras de biomoléculas a la superficie sensora facilita procesos de escrutinio rápidos y/o de alto rendimiento.

La sensibilidad inherente al sensor acústico de onda Love discutido en la presente memoria es relativamente alta, con una señal fácilmente detectable a partir de 500 pg de ADN adsorbido, aunque el sistema de flujo empleado para suministrar la muestra en el ejemplo de realización fue menos eficiente, de tal modo que típicamente se requerían

200 ng de ADN en disolución para la detección. El número potencial máximo de muestras que pueden aplicarse antes de la saturación del dispositivo es por tanto 100.

Además de ser usados para determinar información relativa a la conformación de las biomoléculas en una muestra, los métodos pueden usarse también para determinar información relativa a los cambios en la conformación de las biomoléculas en una muestra tras una interacción, típicamente con un agente tal como una proteína o entidad química.

Con el objetivo de determinar información relativa a cambios en la conformación, es necesario adherir discretamente una muestra de medida de biomoléculas que ha sufrido una interacción con una gente a la superficie sensora y medir un parámetro de conformación, y a continuación compararlo con un parámetro de conformación que haya sido medido o calculado con respecto a una muestra de control correspondiente de biomoléculas que no han sufrido la interacción con un agente. La muestra de control y la muestra de medida se pueden adherir consecutivamente a la superficie sensora, en cualquier orden, o se pueden adherir a superficies sensoras diferentes.

Por tanto, se podrían escrutar muchos agentes de ensayo contra muestras equivalentes de biomoléculas para determinar, por ejemplo, qué agentes de ensayo causan un cambio en la conformación de las biomoléculas, qué agentes de ensayo causan un cambio específico en la conformación de las biomoléculas, qué agentes de ensayo no causan un cambio en la conformación de las biomoléculas o qué agentes de ensayo no causan un cambio específico en la conformación de las biomoléculas.

De forma similar, se puede escrutar el mismo agente de ensayo contra muestras de muchas biomoléculas diferentes para identificar biomoléculas con las que interactúa el agente de ensayo, provocando (o no provocando) un cambio conformacional particular. Excepto en las circunstancias en las que podría esperarse que las diversas muestras diferentes presentaran los mismos parámetros de conformación, el método también incluiría típicamente la etapa de llevar a cabo una medida de control, por ejemplo usando una muestra de biomoléculas correspondiente que no hay interactuado con el agente de ensayo, y comparando el parámetro de conformación que se calcula en cada caso.

La invención facilita la investigación de interacciones que afectan al doblamiento, curvatura o rectitud de ADN o ARN de cadena sencilla o de cadena doble. Los cambios en la conformación de ADN y ARN son importantes en la naturaleza y regulan procesos tales como la transcripción, la replicación y el empaquetamiento de ADN en los nucleosomas. La invención puede usarse para investigar las implicaciones de los defectos en las proteínas que doblan ADN/ARN que son responsables de determinadas enfermedades humanas y para el diseño racional, el escrutinio combinatorio y la determinación de proteínas artificiales dobladoras de ADN/ARN diseñadas para doblar secuencias de polinucleótidos específicas para afectar a la regulación génica con fines terapéuticos. De forma importante, la invención puede permitir la realización de estudios de cambios estructurales de moléculas de ADN/ARN inmovilizadas superficialmente sin marcadores antes y después de interacciones con otros agentes, de un modo cuantitativo. La invención también puede aplicarse al desarrollo de terapias génicas, nuevas entidades químicas y estudios biológicos y bioquímicos y fisicoquímicos de interacciones ADN/ARN-ligando y también a estudios biofísicos de ADN/ARN.

Otra aplicación de la invención es a la investigación de cambios de conformación que surgen durante la hibridación desde ADN de cadena sencilla a ADN de cadena doble, o cambios de conformación que surgen durante la desnaturalización de ADN a partir de ADN de cadena doble o de ADN de cadena sencilla. De forma similar, la invención puede usarse para investigar cambios de conformación relativos a la formación de ADN de triple hélice, que pueden ser relevantes para la regulación génica y algunos tipos de terapia génica antisentido.

La invención también es aplicable a investigaciones de conformación de proteínas e interacciones que afectan a la conformación de proteínas. Los defectos que alteran el plegamiento de proteínas son relevantes para una serie de enfermedades, tales como la fibrosis quística, algunas formas de enfisema y amiloidosis, que incluyen enfermedades de priones que están asociadas a la agregación de proteínas normalmente solubles (p.ej., beta proteína amiloide humana o PrPC, PrPSc) en fibrilos insolubles. Por consiguiente, las aplicaciones de la invención incluyen la investigación de la conformación de proteínas que están implicadas en trastornos de plegamiento de proteínas, la investigación de cambios en la conformación de dichas proteínas como respuesta a interacciones con agentes terapéuticos potenciales, y el escrutinio de agentes terapéuticos potenciales para determinar su efecto sobre la conformación de dichas proteínas.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño y preparación de ADN**

Se diseñaron diferentes conjuntos de cebadores biotinilados y no biotinilados mediante el software FastPCR y se obtuvieron de Metabion (Alemania) con el objetivo de producir productos de ADN de cadena doble de varias longitudes (75 pb, 132 pb, 167 pb, 198 pb) mediante amplificación de PCR. El plásmido pBR322 obtenido de Minotech (Heraklio) se usó como plantilla en reacciones PCR estándar que contenían cada una un conjunto diferente de cebadores, se mezcló con dNTPs 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 2 Unidades de Taq polimerasa. El protocolo de amplificación consistió en 30 ciclos de una fusión inicial de 45 s a 95°C, seguida de una maduración de 45 s a 62°C y una extensión de 45 s a 72°C. Los productos de PCR fueron purificados con un kit nucleospin (Nucleospin es

una marca comercial de Bioké) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y se analizaron sobre gel de agarosa al 1,5% eluyendo en tampón TBE. Se cuantificaron las imágenes UV de los productos a los pesos moleculares esperados mediante densitometría de gel usando un software ImageJ del "National Institute of Health" (EE.UU.).

- 5 Se produjo un ADN de cadena doble de 20 pares base mediante la maduración de un oligonucleótido biotilado con un exceso 10× de su cadena complementaria no biotilada en un tampón de maduración con  $MgCl_2$  1 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 8. La mezcla se sometió a vórtice, se calentó hasta 95°C y después se enfrió lentamente a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos (protocolo SYNTHEGEN).

- 10 Se diseñaron tres oligonucleótidos de 90 unidades en base a las secuencias de estudios previos sobre la creación de diferentes grados de curvatura intrínseca. Cada secuencia estaba flanqueada por 20 bases con el objetivo de ser amplificada mediante una reacción PCR según las condiciones descritas previamente. Las secuencias de los nucleótidos usados en los experimentos son las siguientes:

En fase (doblado)

5' - tcttgctggc gttcgcgacg cgaaaaaacg cgaaaaaacg cgaaaaaacg  
 3' - cgaaaaaacg cgaaaaaacg cgttcgaggc catgctgtcc - 3'

- 15 Fuera de fase (recto)

5' - tcttgctggc gttcgcgacg aaacgcgagc gcaaaaaacg cgcgcgcaaa  
 aaacgcgagc gcaaaaaacg cgttcgaggc catgctgtcc - 3'

Parte del ADN en fase fue biotilado en un extremo para proporcionar una molécula de ADN doblada que se adhirió por un extremo a la superficie sensora. Otra muestra del ADN en fase fue biotilada en ambos extremos de tal modo que se adhirió a la superficie sensora con una conformación generalmente triangular.

- 20 El análisis de la curvatura de los tres productos de 90 pb se llevó a cabo usando software CURVE (<http://www.lfd.uci.edu/~gohlke/curve/>) y GSVIEW, y se verificó mediante diferencias de movilidad en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones nativas.

### Preparación de los dispositivos acústicos

- 25 Los dispositivos acústicos de onda Love se prepararon mediante fotolitografía usando cuarzo de 0,5 mm de espesor de corte en Y y propagación en Z de cristal único, con una sobrecapa de oro de 100 nm y una capa de adhesión de cromo de 20 nm. Los IDTs de entrada y de salida consistieron en 192 pares de dedos de división con una periodicidad de 32  $\mu m$ . La frecuencia de operación del dispositivo no cubierto fue de 155 MHz. Se depositó una capa de guía de onda de 0,4  $\mu m$  de espesor de poli(metil metacrilato) (PMMA) sobre la superficie del dispositivo acústico mediante recubrimiento por giro del dispositivo a 4000 rpm con una disolución al 8% (peso de soluto/peso de disolvente) de PMMA de peso molecular medio (Aldrich) en 2-etoxietilacetato (Aldrich). Los dispositivos recubiertos con PMMA fueron calentados hasta 195°C para promover la evaporación de disolvente. Se depositó una capa de oro de 20 nm sobre la región entre los IDTs mediante recubrimiento por pulverización a  $4 \times 10^{-2}$  mBar de argón con un Sputter-coater Bal-Tec SCD 050. La capa de oro fue pulida inmediatamente antes de los experimentos acústicos para asegurar una superficie limpia. Los dispositivos fueron reutilizados mediante pulido para limpiar la muestra adsorbida y la capa superior de oro; se calculó la tasa de pulido y se reemplazó el oro mediante recubrimiento por pulverización para mantener el espesor de 20 nm.

### Instrumentación e instalación experimental

- 35 Se usó un analizador de red Agilent E5061A para medir la pérdida de inserción (amplitud) y la fase de la señal de salida con respecto a una señal de referencia. El cambio en la fase de la señal de salida, medido en grados, es proporcional al cambio en la velocidad de la onda acústica que se propaga a lo largo del dispositivo; este cambio de velocidad a su vez es proporcional a la masa adsorbida. La pérdida de inserción, en decibelios (dB), mide el cambio en la amplitud de la onda acústica según se desplaza a través del dispositivo. Los datos fueron recogidos en un PC usando el software LabVIEW. Se usó una celda de flujo perspex y una cesta de goma de silicona para mantener la disolución en su sitio sobre la región entre los IDTs, exponiendo un área de 12  $mm^2$ . Durante los experimentos en los que se recogieron datos en función del tiempo, se escaneó una región de 3 MHz del espectro de frecuencias próximo a la frecuencia de operación máxima cada 20 segundos para monitorizar la señal, tomándose un punto de datos para una frecuencia fijada en cada escaneo.

- 50 Se bombeó un flujo continuo de tampón tris (Tris 50 mM, pH 7,5,  $MgCl_2$  10 mM y KCl 10 mM) sobre la superficie de los dispositivos recubiertos con oro con un caudal de 0,02 mL/min. Se dejó que la señal se equilibrara antes de la primera adición y todas las muestras se añadieron en el mismo tampón. Se añadió Neutravidina (Pierce) a una concentración de 100  $\mu g/mL$  durante 10 minutos. Éste fue un periodo de tiempo suficiente para saturar la superficie

con un exceso grande de proteína. Tras un lavado con tampón, se añadió el ADN en un intervalo de concentraciones especificado anteriormente en la sección experimental.

Dentro del alcance de la invención descrita en la presente memoria, se pueden realizar modificaciones y variaciones adicionales.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra líquida de biomoléculas que comprende las etapas de:
- 5 (i) proporcionar un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica, sensor de ondas acústicas que tiene una superficie sensora;
- (ii) realizar una primera medida de la primera y segunda señales, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o fase de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas;
- (iii) adherir biomoléculas de la muestra líquida de forma discreta sobre la superficie sensora;
- 10 (iv) realizar una segunda medida de la primera y segunda señales;
- (v) calcular un parámetro de conformación a partir del cambio de la primera y segunda señales entre la primera y segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con la conformación de dichas biomoléculas que son adheridas de forma discreta a la superficie sensora entre la primera y la segunda medida, pero sustancialmente independiente del cambio en la carga másica de la superficie sensora entre la primera y la
- 15 segunda medida.
2. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según la reivindicación 1, en el que el parámetro de conformación calculado es independiente del valor absoluto de carga másica de la superficie sensora, en un rango de operación de carga másica de la superficie sensora.
- 20 3. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que además comprende la etapa de adherir biomoléculas procedentes de una segunda muestra de forma discreta a la superficie sensora, hacer una tercera medida de la primera y segunda señales y calcular un segundo parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y segunda señales entre la medida llevada a cabo antes de la adhesión discreta de biomoléculas
- 25 adicionales y la tercera medida, donde el segundo parámetro de conformación está relacionado con la conformación de las biomoléculas procedentes de la segunda muestra que son adheridas de forma discreta a la superficie sensora pero sustancialmente independiente de la carga másica de la superficie sensora entre la medida llevada a cabo antes de la adhesión discreta de las biomoléculas adicionales y la tercera medida.
4. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera señal está relacionada con la amplitud y/o la disipación de energía de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas.
- 30 5. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según la reivindicación 3, en el que la medida llevada a cabo antes de la adhesión de biomoléculas adicionales es la segunda medida.
- 35 6. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el parámetro de conformación calculado está relacionado con la conformación o rango de conformaciones que podrían haber conducido al parámetro de conformación calculado y/o está relacionado con un parámetro de forma que describe la forma de las biomoléculas adheridas.
- 40 7. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sensor de ondas acústicas en fase líquida es un dispositivo de tipo Onda Acústica en Masa, la segunda señal está relacionada con la frecuencia de las oscilaciones del sensor de ondas acústicas y la primera señal está relacionada con la disipación de energía de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústica y/o el sensor de ondas acústicas en fase líquida es un
- 45 dispositivo de tipo Onda Acústica Superficial, la primera señal está relacionada con la amplitud de la onda acústica superficial generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la fase de la onda acústica superficial generada por el sensor de ondas acústicas.
8. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y segunda señales entre la primera y segunda medidas usa una correlación entre el parámetro de conformación y la primera y segunda señales que asume una interacción mínima o nula entre biomoléculas adheridas adyacentes.
- 50 9. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el parámetro de conformación es la relación acústica, o un parámetro que esté relacionado directamente con la relación acústica.
- 55

10. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el parámetro de conformación se compara con un valor o rango de valores predeterminados.

5 11. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la superficie sensora comprende un agente de unión que se une no específicamente a una clase de biomoléculas, una molécula de reconocimiento que se une específicamente a las biomoléculas, un agente de unión que se une no específicamente a un marcador que está unido a las biomoléculas o una molécula de reconocimiento que se une específicamente a un marcador que está unido a las biomoléculas.

10 12. Un método para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra de biomoléculas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende calcular un parámetro de conformación de medida relacionado con una muestra medida de biomoléculas que ha sido sometida a una interacción con un agente, y calcular un parámetro de conformación de control relativo a una muestra de control de biomoléculas correspondientes que no han sido sometidas a una interacción con un agente y determinar la  
15 diferencia entre el parámetro de conformación medido y el parámetro de conformación de control.

13. Un aparato biosensor para determinar información relativa a la conformación de biomoléculas en una muestra líquida de biomoléculas, comprendiendo el aparato un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica:

20 presentando el sensor de ondas acústicas una superficie sensora que se puede operar para generar una primera señal y una segunda señal, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o la fase de las oscilaciones de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas, comprendiendo  
25 adicionalmente el aparato un sistema de procesamiento de datos que esté adaptado para calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y la segunda señales entre la primera medida y una segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con la conformación de dichas biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora entre el tiempo en el que se realiza la primera medida y el tiempo en el que se realiza la segunda medida, pero es sustancialmente independiente del cambio en la carga  
máscica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medidas; o

30 presentando el sensor de ondas acústicas una superficie sensora que está en contacto con un líquido y a la cual se puede adherir de forma discreta una muestra de biomoléculas, pudiéndose operar el aparato biosensor para generar una primera señal y una segunda señal, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada  
35 con la frecuencia o la fase de las oscilaciones de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas, comprendiendo adicionalmente el aparato un sistema de procesamiento de datos que esté adaptado para calcular un parámetro de conformación a partir del cambio en la primera y la segunda señales entre la primera medida y una segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con el cambio en la conformación de una proporción de las biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie  
40 sensora entre el tiempo en el que se realiza la primera medida y el tiempo en el que se realiza la segunda medida, pero es sustancialmente independiente de cualquier cambio en la carga máscica de la superficie sensora entre la primera y la segunda medidas.

14. Un método para determinar información relativa a cambios en la conformación de biomoléculas originados por su interacción con un agente que comprende las etapas de:

45 (i) proporcionar un sensor de ondas acústicas en fase líquida para generar una onda acústica, sensor de ondas acústicas que tiene una superficie sensora en contacto con un líquido, con biomoléculas adheridas de forma discreta a la superficie sensora;

(ii) realizar una primera medida de la primera y segunda señales, donde la primera señal está relacionada con las pérdidas de energía de una onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas y la segunda señal está relacionada con la frecuencia o fase de la onda acústica generada por el sensor de ondas acústicas;

(iii) presentar el agente a las biomoléculas que están adheridas de forma discreta a la superficie sensora;

50 (iv) realizar una segunda medida de la primera y segunda señales; y

(v) calcular un parámetro de conformación a partir del cambio de la primera y segunda señales entre la primera y segunda medida, donde el parámetro de conformación está relacionado con el cambio de conformación de biomoléculas adheridas que cambian de conformación entre la primera y la segunda medidas, como resultado de su interacción con el agente, pero sustancialmente independiente de cualquier cambio en la carga máscica de la  
55 superficie sensora entre la primera y la segunda medida.

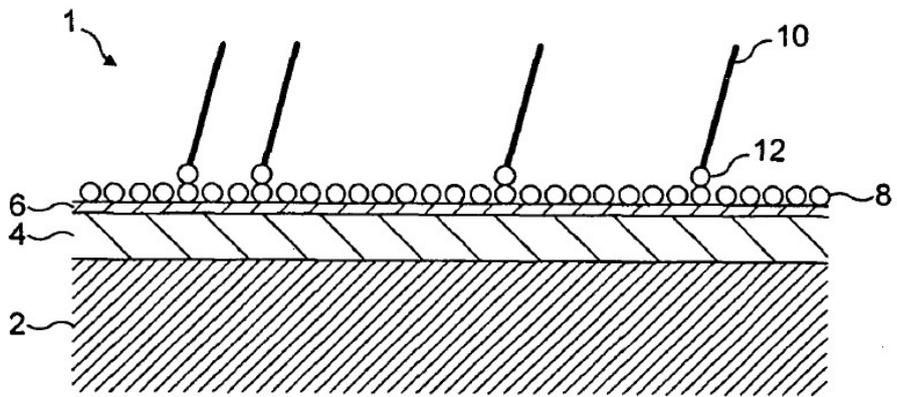


FIG. 1

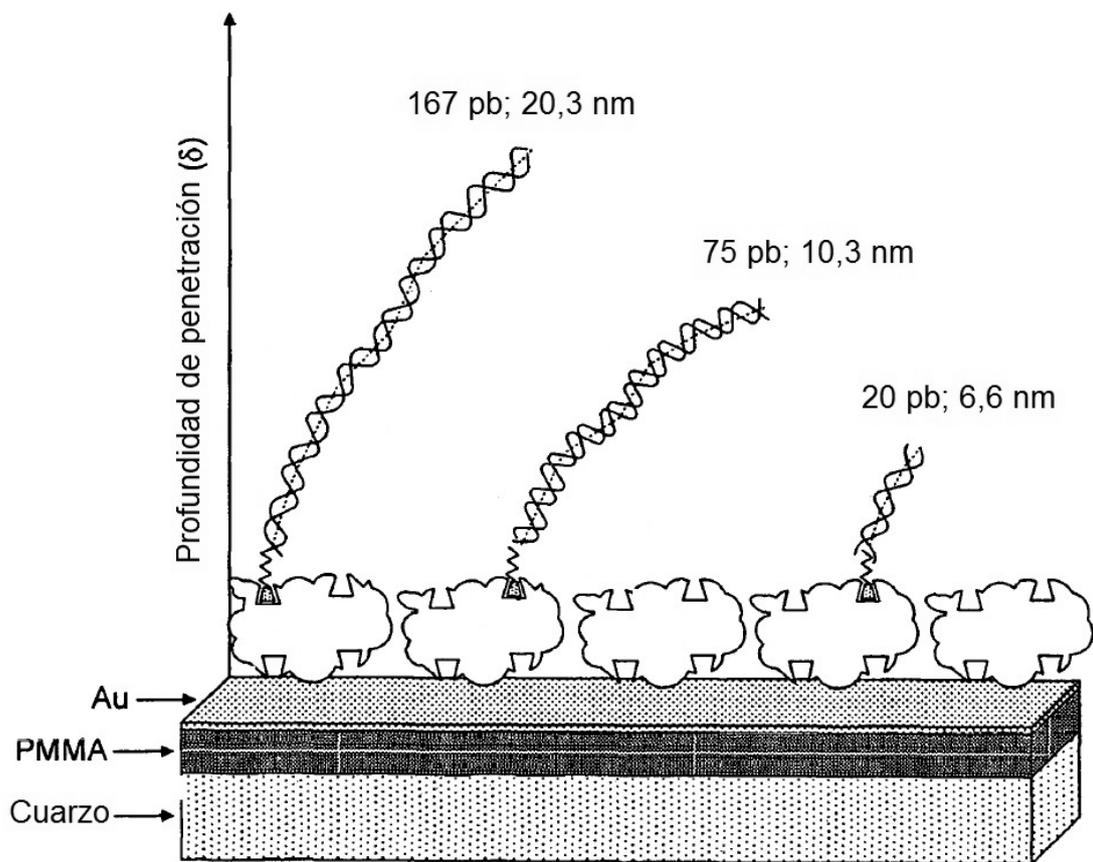


FIG. 2

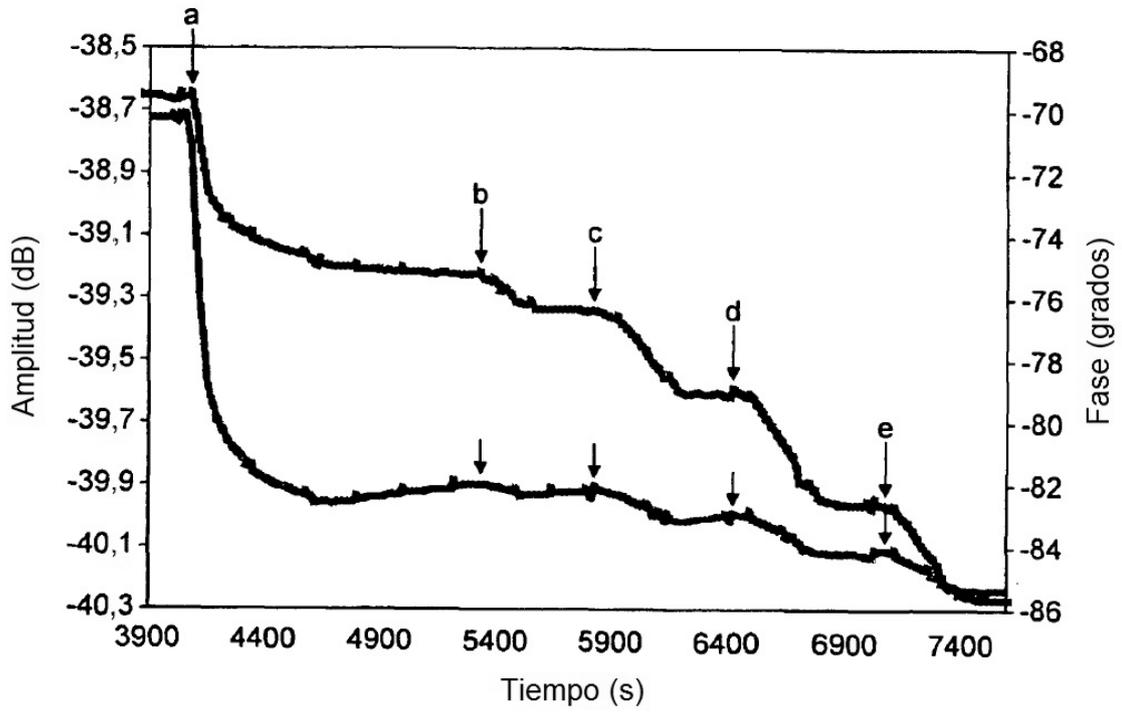


FIG. 3

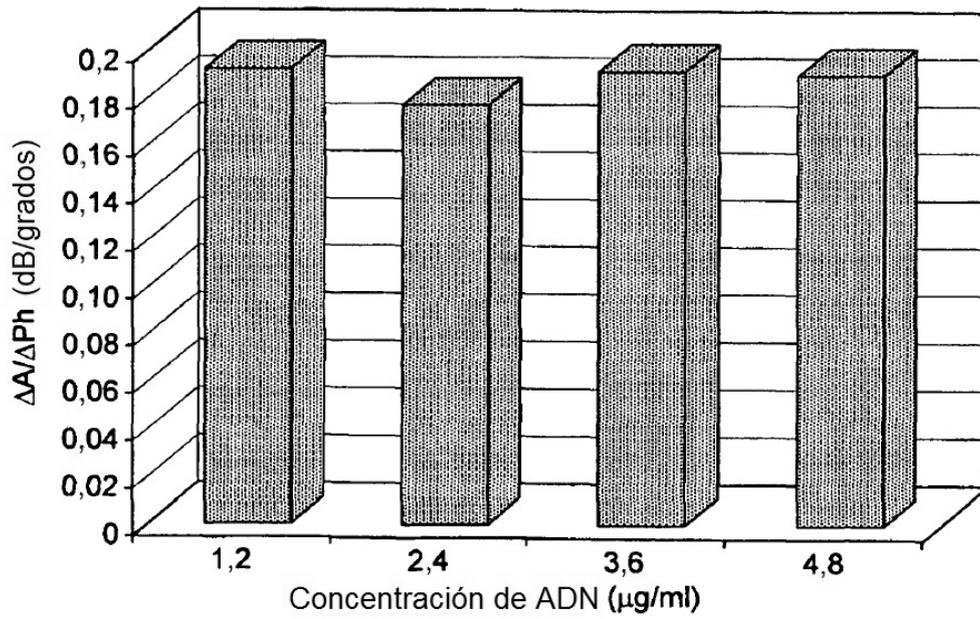


FIG. 4

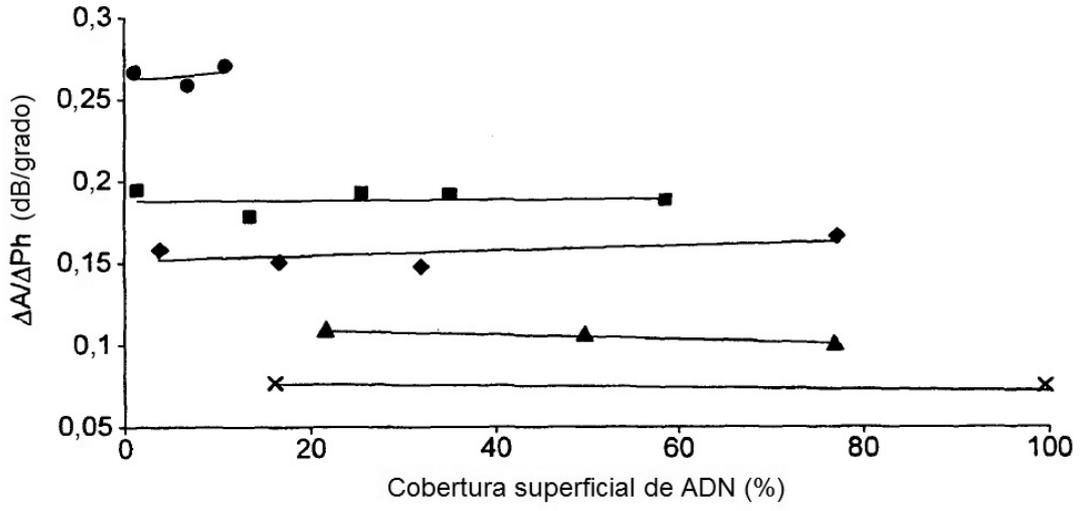
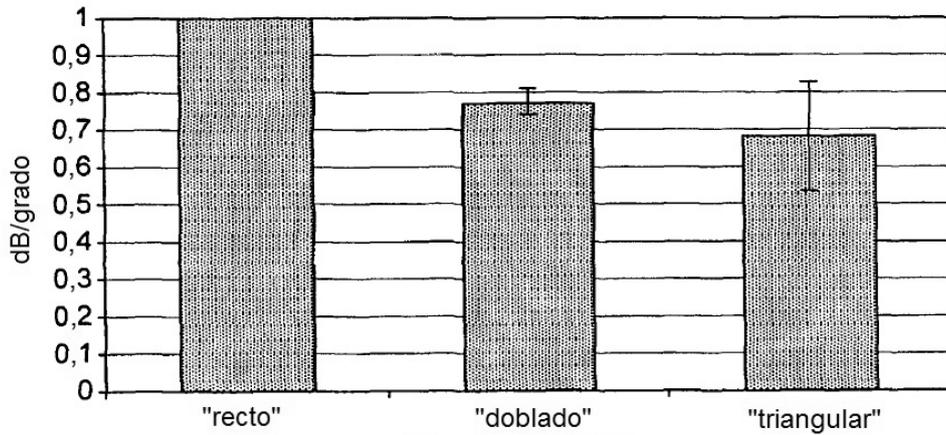


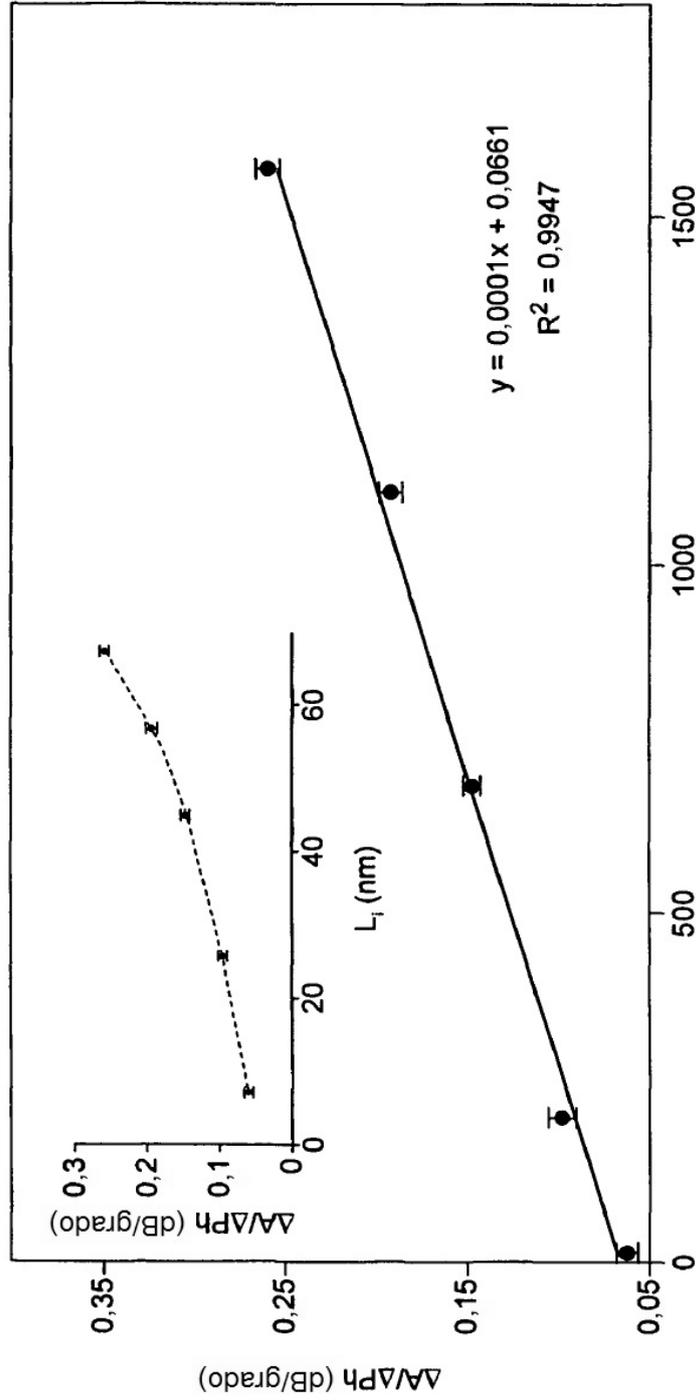
FIG. 5



Formas de ADN



FIG. 6



$L_i^{a_i}$   
FIG. 7