

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 344**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2006 E 06808501 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 1949104**

54 Título: **Método para medir la afinidad de biomoléculas**

30 Prioridad:

16.11.2005 GB 0523366

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

17.10.2014

73 Titular/es:

**NANOTETHER DISCOVERY SCIENCE LIMITED
(100.0%)
8th Floor Eastgate House, 35-43 Newport Road
Cardiff CF24 0AB, GB**

72 Inventor/es:

**DALE, TREVOR CLIVE;
HARWOOD, ADRIAN JOHN y
BORRI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 509 344 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

Método para medir la afinidad de biomoléculas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en particular, aunque no exclusivamente, al campo del análisis de las rutas bioquímicas y a la interacción entre biomoléculas tales como proteínas y polipéptidos.

10 **Antecedentes de la invención**

Ha habido una explosión de información biológica en los últimos años resultante del uso de técnicas experimentales de alto rendimiento. Estas técnicas varían de secuenciación del genoma, análisis de micromatrices, ensayos de interacciones proteína-proteína de 2 híbridos de levadura, hasta exploraciones de ARNi y el uso de análisis de imágenes automático para estudiar procesos de biología celular.

Después de la implantación exitosa de cada técnica "ómica", se crean oportunidades y cuellos de botella en la interfaz entre un conjunto de técnicas y el siguiente. Un cuello de botella clave es el de la bioquímica.

20 Las máquinas moleculares, formadas a partir de complejos de proteínas, son los componentes básicos que subyacen en la mayoría de los procesos celulares. Se han usado técnicas tales como la técnica de dos híbridos de levadura para identificar interacciones binarias entre pares de proteínas en una escala de todo el genoma, mientras que los análisis complementarios que usan purificación de complejos y espectrometría de masas están comenzando a identificar las combinaciones de componentes que comprenden cada máquina molecular. Sin embargo, el estudio
25 detallado de interacciones bioquímicas requiere la identificación de constantes de velocidad y unión de afinidad, junto con técnicas para estudiar cómo se regulan fisiológicamente estas propiedades.

Las técnicas bioquímicas de "tubo de ensayo" convencionales, incluyendo calorimetría y anisotropía de fluorescencia, requieren la producción y purificación de cantidades de microgramos a miligramos de proteínas solubles que consume tiempo y es por lo tanto poco probable que se aumenten de escala para aplicaciones de alto rendimiento. Una técnica potencialmente más prometedora, la resonancia de plasmón superficial (Biacore®) requiere algo menos de proteína y puede tolerar la presencia de impurezas (en algunos formatos), pero requiere el flujo cuidadosamente temporalizado de proteína de ensayo, seguido de soluciones de lavado sobre un compañero de unión inmovilizado y es por lo tanto poco probable que se adapte fácilmente para análisis de alto rendimiento. Se describen a continuación requisitos proteicos típicos para resonancia de plasmón superficial y calorimetría:

Calorimetría de valoración isotérmica:

Medidas: K_d , estequiometría (n), ΔG , ΔN

Requiere: 1 ml de solución 10 μ M; 20 nmoles; 1 mg de proteína 50 KDa.

40 **Resonancia de plasmón superficial (Biacore®)**

Medidas: K_{on} , K_{off} , K_d

Requiere: 2 ml de solución 100 nM; 200 pmoles; 10 μ g de proteína 50 KDa*.

* Cálculo basado en una serie típica de experimentos requeridos para establecer una afinidad de unión en el intervalo de ~10 nM.

Los altos niveles de proteínas que se requieren en estos ensayos resultan del requisito de "saturar" las concentraciones de ligando de unión 4-10 veces más que la constante de disociación. Esto impone los requisitos típicos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

K_d	4x K_d	μ g/ml para proteína de 50 KDa
1 nM	4 nM	0,2
10 nM	40 nM	2
100 nM	400 nM	20
1 μ M	4 μ M	200

Estos niveles de proteína requieren sistemas de síntesis y purificación de proteínas convencionales relativamente caros y que consumen tiempo.

Se conocen métodos de ensayo en los que una biomolécula está unida a una superficie y una segunda biomolécula está en solución, no unida con la superficie o con la otra biomolécula, a partir del documento WO 2004/038415 y Goldstein *et al.* 1999 (Journal of Molecular Recognition, 12: 293-299).

5 Pueden usarse experimentos de "sedimentación" de traducción *in vitro* para identificar interacciones de unión entre cantidades pequeñas de proteína radiomarcada producida en un extracto de traducción (100-150 ng producidos). Sin embargo, como la técnica de 2 híbridos de levadura, padecen la desventaja de que no son cuantitativos, exploran con respecto a intervalos de afinidades de picomolar a bajo nanomolar y no consiguen explorar interacciones de afinidad menores.

10 Existe un requisito de nuevas técnicas bioquímicas de alto rendimiento que sean cuantitativas, sensibles, pueden usar volúmenes pequeños de analito, pueden requerir un número bajo de moles de analito, pueden conseguir concentraciones altas (hasta micromolares intermedias normalmente de aproximadamente 1-5 pM a aproximadamente 10-20 μM) y pueden ser adaptables para análisis masivamente paralelos.

15 Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para medir la afinidad de la primera y segunda biomoléculas en el que una primera biomolécula está unida con una primera parte de unión que tiene una longitud de primera parte de unión y una segunda biomolécula está unida con una segunda parte de unión que tiene una longitud de segunda parte de unión, determinando la unión de las primera y segunda biomoléculas adyacentes entre sí, variando al menos una de las longitudes de primera y segunda partes de unión y determinando la unión de las primera y segunda biomoléculas en el que las biomoléculas están unidas con un soporte y/o unidas entre sí.

25 El método de la invención es ventajoso porque permite un control muy preciso de la concentración de cantidades de biomoléculas y también porque necesita solamente cantidades muy pequeñas de las biomoléculas, permite que se lleven a cabo estudios de unión en equilibrio en volúmenes de pico a attolitros. Los bajos volúmenes permiten realizar una serie de ensayos bioquímicos dependientes de concentración con cantidades de aporte muy bajas de cada biomolécula. Como ejemplo, en una determinación teórica comparando un método de acuerdo con la invención con técnicas convencionales, la calorimetría convencional requeriría 20 nanomoles de proteína o 1 mg de proteína de una proteína de 50 KDa; la Resonancia de Plasmón Superficial requeriría 200 picomoles de proteína correspondientes a 10 microgramos para una proteína de 50 KDa. Por el contrario, un método comparable de acuerdo con la invención requeriría solamente 10 attomoles y 50 picogramos para una proteína de 50 KDa. Normalmente, se usan nano a zeptolitros, preferentemente pico a attolitros, volúmenes de primera y/o segunda biomoléculas.

En este contexto, el término "biomolécula" incluye tanto moléculas de origen natural como molécula sintéticas.

40 Las primera y segunda biomoléculas pueden unirse con un soporte sólido tal como un portaobjetos de vidrio o microperla. En dicha configuración, las primera y segunda biomoléculas están unidas por separado con el mismo soporte sólido. Como alternativa, las primera y segunda biomoléculas pueden estar unidas entre sí en una disposición "en forma de Y". En otra realización, las primera y segunda biomoléculas pueden estar unidas por una unión pero no estar unidas con un soporte sólido, en una disposición de "molécula lineal". Por ejemplo, las primera y segunda biomoléculas pueden estar unidas entre sí y presentes en una solución.

45 Cuando las biomoléculas están unidas con un soporte sólido, las biomoléculas pueden disponerse de forma aleatoria sobre el soporte sólido. Como alternativa, las moléculas pueden estar unidas con partes discretas de, o áreas definidas en, el soporte sólido de modo que las primera y segunda biomoléculas pueden interaccionar solamente si se "estiran" para abarcar el hueco entre las partes discretas. Controlando la distancia entre las partes discretas y/o la longitud de la unión, la proporción de biomoléculas unidas y libres puede alterarse permitiendo la determinación de la afinidad descrita anteriormente. Las partes discretas de la superficie pueden acoplarse con las primera y segunda biomoléculas usando una serie de técnicas incluyendo litografía de haz de iones, electrones o fotones para desproteger secuencialmente partes para el acoplamiento. Como alternativa, puede usarse el grabado/modificación directa usando puntas microscópicas de fuerza atómica para introducir una modificación de superficie regional selectiva. Una ventaja de este tipo de enfoque es que las distancias intermoleculares pueden controlarse directamente en lugar de basándose en las distancias medias. En principio, esto debería permitir un control más preciso de la concentración de biomoléculas.

50 En una realización preferida en la que se unen las primera y segunda biomoléculas con un soporte sólido, el método puede disponerse para manejarse en una zona de reacción de nanoescala. La formación de la zona de reacción puede conseguirse anclando las uniones cercanas entre sí de modo que al menos algunas de las primera y segunda biomoléculas estén estrechamente adyacentes entre sí, de modo que los volúmenes de barrido sustancialmente hemisféricos definidos por los extremos libres de cada biomolécula se solapan, permitiendo que las primera y segunda biomoléculas se unan entre sí. El volumen de cada volumen hemisférico puede ser de 2×10^3 a 1×10^{12} nm³. Variando la longitud de las partes de unión, pueden controlarse las concentraciones efectivas de las biomoléculas permitiendo análisis cuantitativos.

- La rigidez de las uniones se considera con respecto a la longitud de persistencia (P) que es un parámetro medido de forma experimental que caracteriza la rigidez como un único parámetro de flexión de una varilla flexible (Bustamante, C., J. F. *et al* 1994. *Science*. 265: 1599 -1600; y Marko, J. F., y E. D. Siggia. 1995. *Stretching DNA*. *Macromolecules*. 28: 8759-8770). En el caso de uniones relativamente largas (P > aproximadamente cinco veces menos que la longitud del contorno de la unión) hechos de polímeros tales como ADN en solución, la unión puede representarse por un modelo de cadena de tipo gusano que se caracteriza por la longitud de persistencia (P). Las moléculas mucho más largas que la longitud de persistencia (P igual a aproximadamente 50-90 nm para ADNbc) se comportan como enrollamientos aleatorios de una cadena libremente articulada con una longitud de segmento 2P y una distribución Gausiana de la densidad de segmento.
- Además de variar la longitud de las uniones, la distancia entre anclajes puede alterarse para variar el solapamiento de los volúmenes de barrido. Este método puede usarse para alterar la estequiometría de los volúmenes unidos y para aprovechar completamente el caso especial en el que se usan uniones flexibles largas.
- Se han usado simulaciones por ordenador (Monte Carlo) para calcular las probabilidades de distribución de extremos de ADN libres (por ejemplo véase Jian y Vologodskii (1997). *A combined wormlike-chain and bead model for dynamic simulations of long linear DNA*, *J. Comp. Physics* 136 pp168-179.).
- La distribución de probabilidad del extremo libre de una unión en el contexto de nanouniones se determina por varios factores incluyendo la rigidez de la unión, la temperatura y las condiciones iónicas. Usando uniones largas en proporción a la longitud de persistencia (por ejemplo mayor de 5 veces P), la distancia entre anclajes puede variarse para explorar el gradiente de concentración efectivo dentro del volumen de barrido sustancialmente hemisférico.
- En este gradiente de concentración, la concentración menor sería la más cercana a la superficie barrida por la unión en su longitud de contorno completa (estirado recto). La concentración aumentaría después hasta un máximo cercano al centro medio de la masa debido a consideraciones entrópicas. La probabilidad de que dos moléculas unidas interactúen a una distancia entre anclajes particular dependerá por lo tanto de la distribución de probabilidad calculada y aumentará a media que se reduce la distancia entre anclajes. Pueden usarse enfoques para alterar la distribución de probabilidad de uniones flexibles dentro de sus volúmenes de barrido (por ejemplo induciendo el flujo de líquido a granel o el uso de soportes de vibración) para potenciar la utilidad de las uniones más allá de sus longitudes de persistencia (por ejemplo 20-40 veces P).
- Midiendo las distribuciones de interacción de una serie de interacciones de biomoléculas "de caso de ensayo" (por ejemplo, GSK-3 y péptido de Axina; estreptavidina - biotina; anticuerpo - antígeno), será posible correlacionar la distribución de probabilidad con la distancia entre anclajes y equivaler esto directamente con una constante de unión de afinidad. Como alternativa también pueden producirse modelos matemáticos de este proceso basándose en los estudios de Jian (mencionado anteriormente).
- La variación tanto de la longitud de unión como de la distancia entre anclajes se ha propuesto como un método para variar las concentraciones de biomolécula unida. A altos valores P de longitud, la distribución de probabilidad puede ser el método más eficaz para calcular la afinidad. En una realización de molécula lineal o molécula en forma de Y, la longitud de la primera y segunda parte de unión puede variarse para variar las concentraciones de biomoléculas.
- Pueden usarse técnicas que miden la proporción de las primera y segunda biomoléculas que están molecularmente cerca entre sí para cuantificar la proporción de primera y segunda biomoléculas que interactúan. Por ejemplo, la proporción de primera y segunda biomoléculas que están molecularmente cerca entre sí puede determinarse por transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET).
- En un método preferido, la lectura de ensayo es la intensidad de FRET entre fluoróforos acoplados con los oligonucleótidos de cabeza unidos con las primera y segunda biomoléculas. Se usa un láser, apropiado para la excitación máxima para un fluoróforo unido con la primera biomolécula, para excitar ese fluoróforo. Se registra la emisión a la longitud de onda máxima de un fluoróforo unido con la segunda biomolécula para evaluar el nivel de FRET. En la práctica, para que se produzca FRET, una molécula excitada del primer fluoróforo tiene que estar molecularmente cerca (<10 nm) del segundo fluoróforo para que se transfiera la energía, conduciendo a la emisión a la longitud de onda característica del segundo fluoróforo. Esto se producirá cuando las primera y segunda biomoléculas estén también molecularmente cerca debido a la formación de los complejos de primera biomolécula/segunda biomolécula. En una variante preferida de la técnica de FRET, se usa la medición del tiempo de vida de fluorescencia (FRET/FLIM) para medir la dependencia del tiempo de FRET ya que esta técnica ofrece sensibilidad mejorada ('Fluorescence Lifetime Imaging: An emerging technique in Fluorescence Microscopy', C. G. Morgan, *Chromosome Research*, 4(4), 261-263, 1996.). Se usarán controles apropiados (por ejemplo puntos de las primera y segunda biomoléculas solamente) para normalizar los niveles de señal.
- En una realización preferida, puede medirse FRET usando una lente para centrar los láseres en portaobjetos de vidrio que contienen matrices de biomoléculas unidas. En otras realizaciones, se disponen máquinas construidas para este fin para superar las limitaciones que tienen los microscopios confocal debido a su diseño para otros fines. En particular, el uso de fotomultiplicadores y dispositivos acoplados a carga (CCD) enfriados puede potenciar la

sensibilidad de detección de las señales de FRET de nivel bajo, conduciendo potencialmente a la detección de FRET entre pares unidos de primera y segunda biomoléculas individuales (por ejemplo, véase Walter *et al.*, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), Vol. 61, 224-241 (2002)). Como alternativa, puede usarse microscopía de fluorescencia de reflejo interno total (TIRF) (Surface fluorescence microscopy with evanescent illumination., Axelrod, D., Light Microscopy in Biology, Lacey, A. (ed), Oxford University Press, Nueva York, 399-423 (1999)).

En una solución alternativa, pueden unirse esferas de nanoescala o “puntos cuánticos”, nanocristales que absorben la luz pero vuelven a emitir rápidamente la luz en un color diferente, en lugar de los fluoróforos individuales. Estos conjugados pueden ofrecer eficacias de FRET mayores debido al mayor número de moléculas fluorescentes. Como alternativa, las esferas de nanoescala permitirían realizar espectroscopía de correlación de fluorescencia usando un microscopio óptico confocal de alta resolución. Para uniones mayores de 2 Kb (0,6 μ M), la formación de complejos de primera biomolécula/segunda biomolécula puede registrarse directamente debido a la proporción de pares de puntos fluorescentes en proporción a los que muestran alguna separación.

Las primera y/o segunda uniones, o una única unión en el caso de una molécula lineal, pueden formarse a partir de nucleótidos. Preferentemente, se genera una unión a partir de ADN bicatenario (ADNbc). Como alternativa, puede realizarse una unión a partir de otros polímeros tales como nanotubos de carbono (D. H. Jung *et al* Covalent attachment and hybridization of DNA oligonucleotides on patterned single-walled carbon nanotube films. Langmuir. 28 Sep 2004;20(20): 8886-91.), fibrillas amiloides o complejos de cruce de ADN, por ejemplo híbridos DX, que incluyen un número par (normalmente 4, 6 u 8) de cadenas de ADN y son algo más rígidos que el ADNbc; J. Am. Chem. Soc. (2000), 122, 1848-1860, Construction, Analysis, Ligation, and Self-Assembly of DNA Triple Crossover Complexes). Además, la “rigidez” o longitud de persistencia (P) y carga electrostática de las uniones tales como ADNbc puede modularse por modificación química, interquelación con moléculas tales como bromuro de etidio u otros agentes interquelantes adecuados, que son normalmente compuestos orgánicos para permitir la inserción entre las bases de ADNbc o tienen carga positiva y son poliméricos con el complejo con ADN basado en la afinidad para la cadena principal de fosfato con carga negativa del ADN. La rigidez del ADN también puede alterarse formando complejo con proteínas de unión a ADN a lo largo de la longitud de la unión. La rigidez de otras uniones puede modularse por otros medios. Por ejemplo, la rigidez de las uniones que comprenden híbridos DX puede modularse variando el número de cadenas; para nanotubos que comprenden uniones aumentando el número de tubos concéntricos que forman cada nanotubo.

En una realización preferida, se ligan partes de unión de ADNbc de longitud variable entre sí para formar una unión. Por ejemplo, una parte de cuerpo de unión puede ligarse con partes de unión de cabeza y cola para producir la unión. Los nucleótidos de la parte de cuerpo pueden ligarse con partes de cabeza y cola en solución.

Para uniones no nucleotídicas, pueden usarse métodos de reticulación química para unir enlazadores de oligonucleótidos de cabeza y cola con los extremos respectivos de las partes del cuerpo de las uniones.

Cuando las uniones comprendan nucleótidos, la o cada longitud de parte de unión puede ser normalmente del orden de 50 pares de bases (pb) a 50 Kb, preferentemente, de 200 pares de bases a 20 k pares de bases, o de 30 a 12000 nm, preferentemente de 60 a 6000 nm, para otras uniones.

Las uniones pueden unirse con una superficie por medio de anclajes. Los anclajes pueden ser oligonucleótidos amino modificados monocatenarios. Las uniones (cabeza, cuerpo y cola) pueden después hibridarse con un soporte sólido en el que se han inmovilizado oligonucleótidos de anclaje. El soporte sólido puede ser un sustrato de vidrio modificado. Pueden usarse técnicas convencionales para acoplar covalentemente un oligonucleótido de anclaje (por ejemplo, véase: Chrisey, L. A., Lee, G. U., y O’Ferrall, E. (1996) Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039). Un método preferido implica acoplar oligonucleótidos de anclaje amino modificados en un soporte de vidrio tratado con un agente tal como amino silano y *p*-fenileno 1,4 diisotiocianato (PDC). También se contemplan otros sustratos que pueden modificarse para unir una unión con una superficie, incluyendo agarosa y sepharose.

En una realización, el formato del soporte es un portaobjetos de vidrio en el que se imprimen anclajes oligonucleotídicos o uniones en matrices de puntos usando máquinas de disposición de clavijas partidas disponibles en el mercado tales como las disponibles de Genetix. Pueden usarse más soportes sólidos especialistas, basándose en técnicas de miniaturización derivadas de microelectrónica, en implementaciones más sofisticadas que se diseñan para miniaturizar adicionalmente el análisis y para integrarse mejor con los sistemas de lectura.

En un formato alternativo, el soporte puede proporcionarse por microperlas que están acopladas en formatos que generan una relación única entre una única perla y combinación de uniones. Este forma permite la adaptación de la tecnología a sistemas microfluídicos, y puede potenciar la densidad de sondas particularmente cuando se usan uniones relativamente largas, de aproximadamente 50 μ m, para ensayar con respecto a interacciones de alta afinidad a altas distancias entre anclajes. Las microperlas adecuadas pueden incluir poliestireno, partículas férricas/ferrosas recubiertas, partículas de oro, sepharose, agarosa, vidrio o carbono.

En una implementación de puntos en matrices, los anclajes oligonucleotídicos aminoterminales para las primera y segunda biomoléculas pueden acoplarse covalentemente con el sustrato de vidrio modificado. Puede usarse una serie de otros enfoques para variar la distancia entre uniones. En una implementación, la distancia entre los anclajes oligonucleotídicos se aumenta mediante el uso de un oligonucleótido amino terminal no específico (que se diseña para no unirse con otros componentes de unión) que se valora en la mezcla oligonucleotídica específica. Cuanto mayor sea la proporción del oligonucleótido no específico, mayor será la distancia resultante entre anclajes oligonucleotídicos específicos. Como alternativa, la proporción de moléculas de silano modificadas puede reducirse antes del acoplamiento de oligonucleótidos. Las distancias medias entre anclajes pueden variar de distancias mayores que la longitud de unión a la máxima capacidad de unión oligonucleotídica. La densidad de acoplamiento máxima posible usando protocolos publicados (por ejemplo, Chrisey *et al* 1996 mencionado anteriormente) es de 20 pmoles de ADN unido/cm² que equivale a una separación media entre anclajes de 1,6 nm; Chrisey, L. A., *et al* (1996) mencionado anteriormente. Esta densidad entre anclajes supera ampliamente la requerida para el intervalo más probable de densidades de anclaje que normalmente variarían de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 1 μ m.

En la implementación anterior, el oligonucleótido amino específico no específico actúa para recubrir los grupos reactivos y también hará la superficie del soporte electroestáticamente negativa, minimizando de este modo la asociación de la unión de ADN con carga negativa con la superficie. Como alternativa, pueden acoplarse grupos lipídicos hidrófobos con la superficie de vidrio para rechazar la asociación de superficie-ADN debido a la incompatibilidad de asociaciones hidrófobas - hidrófilas. Por ejemplo, los grupos lípidos adecuados pueden incluir fosfatidil etanolamina.

En una implementación alternativa, las secuencias presentes en oligonucleótidos de anclaje adyacentes se sintetizan en serie (es decir como un único oligonucleótido). Esto genera eficazmente un anclaje común para tanto la primera como la segunda uniones y asegura que los volúmenes de barrido solapen completamente. Puede haber ventajas para este enfoque si se fuera a estudiar la unión de números muy bajos (tan bajo como 1 par) de biomoléculas. En una variante de esta implementación, cuando las primera y segunda biomoléculas no están unidas con una superficie sólida separada, las primera y segunda biomoléculas pueden unirse en los extremos respectivos de una única unión y pueden realizarse mediciones en solución.

En un método preferido para conectar biomoléculas proteicas con uniones de ácido nucleico, se producen conjugados de ácido nucleico y proteína de acuerdo con el método descrito en: Jung, G. Y., y Stephanopoulos, G. (2004) A functional protein chip for pathway optimization and in vitro metabolic engineering *Science* 304, 428-431. Esta descripción se basa a su vez en el método original descrito en: Roberts, R. W., y Szostak, J. W. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* 94, 12297-12302. Brevemente, el método implica el uso de una reacción de traducción *in vitro* para unir covalentemente un péptido naciente por su extremo C terminal cerca del extremo 3' de un conjugado de ARNm-ADN. Una clase adicional de métodos para conectar biomoléculas proteicas con uniones de ácido nucleico pueden usarse con preferencia igual al método descrito anteriormente. Estos métodos implican de forma genérica la síntesis de una proteína de fusión que comprende la biomolécula de interés unida con una enzima modificada (mostrada esquemáticamente en la Figura 23 adjunta; especie A fusionada con especie X). Este tipo de sistema se ha descrito para tres enzimas diferentes, el HaloTag, el marcador de AGT y cutinasa (Hodneland, *et al.*, (2002) Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5048-5052; Keppler *et al.*, (2004a) Labeling of fusion proteins of 06-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* 32, 437-444; Keppler *et al.*, (2004b) Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9955-9959; Temple *et al.*, (2006). From genome to proteome: developing expression clone resources for the human genome. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1, R31-43). Después de la síntesis, la enzima de fusión (X) está acoplada de forma irreversible y covalente con un sustrato sintetizado de forma química. En los sistemas descritos, se ha generado una amplia serie de sustratos modificados. En la implementación propuesta, se sintetiza de forma química un oligonucleótido de conjunto de cabeza que incorpora la especie de sustrato (Figura 23; Y). Esta síntesis del oligonucleótido acoplado de forma covalente podría incorporar también el Fluoróforo Donante o Aceptor permitiendo un protocolo de acoplamiento y marcaje de una etapa.

Hay tres ventajas principales para el uso del enfoque descrito en Jung y Stephanopoulos (2004) mencionado anteriormente en el contexto de la presente invención. En primer lugar, el complejo de ácido nucleico-proteína puede separarse por purificación de proteínas de extracto de traducción *in vitro*, después de hibridación con las uniones inmovilizadas y lavado. En segundo lugar, pueden traducirse simultáneamente múltiples ARNm mensajeros y conjugarse con sus ácidos nucleicos codificantes únicos; esto permite tomar enfoques de alto rendimiento para la producción de proteínas. En tercer lugar, las proteínas producidas en los extractos del traducción *in vitro* (~150 ng/traducción) tienen un gran exceso sobre lo que se requiere para saturar un punto de micromatriz de 100 μ m de diámetro típico de uniones (~8 pg de una proteína de 50 KDa en un punto que contiene distancia entre anclajes de 30 nm con 1×10^7 moléculas). Jung y Stephanopoulos (2004) mostraron que la densidad de los "anclajes oligonucleotídicos" en su enfoque fue el principal determinante de los niveles de complejos de ácido nucleico-proteína inmovilizados. De una manera completamente análoga, la proporción de uniones usadas en un método de acuerdo con la invención determinará las proporciones de primer y segundo complejos de ácido nucleico-proteína unidos.

Pueden usarse métodos alternativos para preparar conjugados de proteína-ácido nucleico, incluyendo la reticulación química directa de biomoléculas proteicas purificadas con oligonucleótidos modificados. Como alternativa, pueden generarse complejos de proteína-ácido nucleico *in situ* hibridando el conjugado de ARNm-ADN con la unión inmovilizada en primer lugar y traduciendo el ARN mensajero, mientras está unido con la unión, añadiendo extractos de traducción *in vitro* al ARN mensajero unido.

Como alternativa, el ARN mensajero puede diseñarse para generar fusiones proteicas entre las biomoléculas proteicas de interés y un segundo dominio de proteína X. El segundo dominio X puede diseñarse para tener una muy alta afinidad por un componente modificado por ingeniería genética del oligonucleótido de cabeza o el extremo de cabeza de la unión. Por ejemplo, si el dominio X es una proteína de unión a ADN específica de alta afinidad (por ejemplo, represor lambda), su sitio de ADN afín puede introducirse en el complejo oligonucleotídico de cabeza para permitir que la proteína naciente se asocie con la unión mediante el resto de unión de ADN. Como alternativa, X podría ser una molécula tal como estreptavidina y un compañero de unión correspondiente, en este caso biotina, se acoplaría químicamente con el oligonucleótido de cabeza.

Las biomoléculas proteicas típicas incluyen enzimas, anticuerpos y receptores. En métodos alternativos adicionales, la primera y/o segunda biomolécula puede ser una molécula bioactiva distinta de una proteína. El único requisito es que la biomolécula alternativa sea capaz de mantener su actividad funcional mientras está acoplada con una unión. Las moléculas alternativas incluyen péptidos, análogos peptídicos, tales como aminoácidos sintéticos, bibliotecas poliméricas combinatorias, moléculas pequeñas (por ejemplo <1000 Dalton, por ejemplo fármacos sintetizados de forma química), polisacáridos y especies de ARN catalíticamente activas.

En un método preferido, se hibridan conjugados de proteínas y ácido nucleico mediante secuencias complementarias, proporcionadas por una de las primera y segunda biomoléculas, cerca del extremo 3' del componente de ácido nucleico con secuencias complementarias en una parte de unión oligonucleotídica de cabeza. Esto concentra los conjugados de ácido nucleico de molaridades típicas de traducciones *in vitro* (por ejemplo 10 nM) a las concentraciones experimentales.

Pueden usarse ecuaciones de unión en equilibrio bien caracterizadas sencillas (Michaelis-Menten) para derivar los parámetros de interacción molecular basándose en las concentraciones de las primera y segunda biomoléculas y la proporción de primera biomolécula/segunda biomolécula unidas.

Por ejemplo, en un experimento típico para determinar con precisión la K_d de una interacción entre las primera y segunda biomoléculas que están unidas con un soporte, las primera y segunda biomoléculas que tienen un intervalo de longitudes de unión y distancias entre anclajes se prepara como una matriz de puntos usando combinaciones apropiadas de anclajes y uniones para las primera y segunda biomoléculas. Esto genera una serie de concentraciones convencional. Estas concentraciones se representan en primer lugar frente a la proporción del complejo de primera/segunda biomolécula unido y se determina la concentración de la primera biomolécula (o la segunda biomolécula) requerida para unión semimáxima (esta concentración es la K_d).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona por lo tanto un método para determinar la K_d de una interacción entre las primera y segunda biomoléculas determinando la proporción de primera y segunda biomoléculas unidas para una serie de concentraciones de las primera y segunda biomoléculas y la determinación de la concentración de la primera o segunda biomolécula requerida para la unión semimáxima de las primera y segunda biomoléculas, la K_d . Puede determinarse la afinidad de una primera biomolécula por una biblioteca de segundas biomoléculas. La biblioteca de biomoléculas puede comprender al menos una parte significativa de un transcriptoma o proteoma.

Los métodos de acuerdo con la invención ofrecen el potencial de explorar interacciones entre una biomolécula individual A y una biblioteca de moléculas B1, B2, B3... B_n. En un formato, cada punto está ocupado solamente por la biomolécula A y B1 o A y B2... A y B_n. En una implementación preferida para molécula proteicas, se generan partes de unión de cabeza que reconocen regiones únicas (por ejemplo codificantes) del extremo 3' de los mensajes B1, B2, B3... B_n y se acoplan con las uniones centrales como se ha descrito anteriormente. B_n puede ser bibliotecas de proteínas que representan potencialmente un transcriptoma/proteoma. Como alternativa, B_n puede ser bibliotecas de péptidos usados para definir sitios de interacción. Como alternativa, B_n puede ser bibliotecas unidas de compuestos químicos que varían de compuestos de moléculas pequeñas a bibliotecas de polímeros sintéticos.

Usando un anclaje/unión para la segunda biomolécula que puede escindirse junto con concentraciones de saturación inicial de las primera y segunda biomoléculas, es posible determinar la K_{off} . En este esquema, la tasa de degradación de los niveles de complejo de primera biomolécula/segunda biomolécula se controla en tiempo real después de la escisión de la unión para la segunda biomolécula. Este tipo de análisis es análogo al usado en la resonancia de plasmón superficial para determinar la K_{off} .

También puede estudiarse el efecto de una tercera biomolécula unida o no unida en la interacción entre las primera y segunda biomoléculas unidas.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán ahora métodos y aparatos de acuerdo con la invención, como ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas adicionales 1 a 22 en las que:

- 5 La Figura 1 es un diagrama que muestra una biomolécula unida para su uso en un método de la invención;
- La Figura 2 es un diagrama que muestra dos biomoléculas unidas para su uso en un método de la invención;
- 10 La Figura 3A es un diagrama que muestra las biomoléculas de la unión de la Figura 2; la Figura 3B ilustra las biomoléculas de la unión de la Figura 3A e ilustra la naturaleza flexible de las uniones;
- La Figura 4A y B son diagramas que muestran una serie de biomoléculas unidas para su uso en un método de la invención a diferentes separaciones entre uniones;
- 15 La Figura 5 muestra partes de uniones de cabeza para su uso en uniones de acuerdo con la invención;
- La Figura 6 muestra un oligonucleótido modificado para su uso en uniones de acuerdo con la invención;
- 20 La Figura 7 muestra la formación de uniones de acuerdo con la invención;
- La Figura 8 muestra una etapa adicional en la formación de uniones de acuerdo con la invención;
- La Figura 9 muestra la producción de conjugados de biomoléculas y uniones;
- 25 La Figura 10 ilustra un método de acuerdo con la invención;
- La Figura 11 ilustra el uso de un método de acuerdo con la invención para medir K_{off} ;
- 30 La Figura 12 es un esquema que muestra el funcionamiento de una disposición molecular lineal de biomoléculas de acuerdo con la invención en la que:
- A. es una ilustración de esferas barridas por los extremos libres de uniones flexibles cortas y largas;
- 35 B. es una ilustración de una posible conformación de variantes libres y unidas de una molécula lineal que representa una interacción intramolecular entre las biomoléculas A y B;
- C. es una ilustración de variantes unidas y libres que experimentan interacciones intermoleculares entre A y B;
- La Figura 13 es un diagrama que muestra oligonucleótidos “de conjunto de cabeza” usados para formar uniones en las que:
- 40 A. muestra moléculas separadas de la forma mostrada en la Figura 12C;
- B. muestra una molécula lineal con conjuntos de cabeza aceptores y donantes unidos;
- 45 Esta molécula toma la forma mostrada en la Figura 12B;
- La Figura 14 muestra la degradación dependiente del tiempo de la fluorescencia del donante debido a FRET;
- La Figura 15 es una gráfica que ilustra una valoración de Conjunto de Cabeza Aceptor;
- 50 La Figura 16 ilustra las medidas experimentales de la afinidad de molécula lineal para:
- a. una serie de longitudes; y
- b. una serie de concentraciones;
- 55 La Figura 17 ilustra una molécula en forma de Y de acuerdo con la invención;
- La Figura 18 ilustra una determinación del Factor “C” usando un método de acuerdo con la invención como se describe posteriormente;
- 60 La Figura 19 ilustra el diseño de biomoléculas formadas por oligonucleótidos;
- La Figura 20 es una fotografía de un análisis en gel de biomoléculas que tienen partes de unión de diversa longitud;
- 65 La Figura 21 muestra los resultados de experimentos de FRET usando los oligonucleótidos de la Figura 19; y

La Figura 22 es una gráfica que ilustra la variación de la proporción de molécula de enlace con la longitud de las uniones de ADN.

1 Visión de conjunto de un método de acuerdo con la invención

La Figura 1 muestra una única primera biomolécula 10 unida con una primera unión 12 mediante el anclaje 14 a la superficie 16. La primera biomolécula 10 está libre para moverse en la unión 12 alrededor del anclaje 14 en un volumen sustancialmente hemisférico 18. El volumen del volumen 18 se determina por la longitud de la primera unión 19.

La Figura 2 muestra las primera y segunda biomoléculas ancladas 10 y 20. La segunda biomolécula 20 está unida a una segunda unión 22 mediante un anclaje 24 y también está libre para moverse en un volumen sustancialmente hemisférico 26. El volumen del volumen 26 se determina por la longitud de la segunda unión 27. Los volúmenes hemisféricos 18 y 26 solapan para definir una zona de reacción 28.

La Figura 3A muestra las primera y segunda biomoléculas 10 y 20 que se unen en la zona de reacción 28. Como se muestra en la Figura 3B las uniones son flexibles y por lo tanto las biomoléculas ocupan un volumen en lugar de simplemente una superficie. La Figura 4 muestra variación de la separación entre uniones entre biomoléculas unidas. En la Figura 4A, las biomoléculas, por ejemplo 30 y 32, están relativamente separadas. En la Figura 4B, las biomoléculas, por ejemplo 34 y 36, están relativamente cerca entre sí. Una alternativa a la distribución aleatoria de las uniones de primera y segunda biomoléculas como se ilustra en la Figura 4A y B es la dirección de primera y segunda biomoléculas solamente puedan interactuar si se estiran para abarcar el hueco entre los parches superficiales. Controlando la distancia entre las partes discretas y/o la longitud de la unión, la proporción de biomoléculas unidas y libres puede alterarse permitiendo la determinación de la afinidad como se describe en el presente documento.

2 Preparación de matriz unida de biomoléculas

La preparación de una forma de biomoléculas unidas para su uso en un método de acuerdo con la invención se muestra en las Figuras 5 a 9. Esto implica unir una unión de cuerpo de longitud variable con tres oligonucleótidos "adaptadores". Los oligonucleótidos de cabeza, cuerpo, cola y anclaje se combinan como se describe posteriormente para generar una unión inmovilizada. Se producen matrices de puntos que contienen uniones inmovilizadas con diferentes proporciones de uniones de longitud de primera y segunda unión. Como se describe posteriormente, se hibridan después complejos covalentes de ácido nucleico-proteína con las uniones inmovilizadas.

a) Producción de partes de cabeza de unión

Se generan partes de cabeza de unión a partir de ADN bicatenario (ADNbc) como se muestra particularmente en la Figura 6. Una parte de cabeza de unión 50 tiene una parte superior monocatenaria que comprende un semisitio de enzima de restricción X, que es complementario del semisitio X' de la parte de cabeza de unión 38 o 40. La región inferior de la parte de unión del cuerpo incluye una sección monocatenaria, generalmente designada Y en la Figura 6.

b) Producción de partes de cuerpo de unión

Se generan partes de cuerpo de unión a partir de ADN bicatenario (ADNbc) como se muestra particularmente en la Figura 6. Una parte de cuerpo de unión 50 tiene una parte superior monocatenaria que comprende un semisitio de enzima de restricción X, que es complementario del semisitio X' de la parte de cabeza de unión 38 o 40. La región inferior de la parte de unión de cuerpo incluye una sección monocatenaria, generalmente designada Y en la Figura 6.

c) Producción de partes de cola de unión

Las partes de cola de unión se diseñan para hibridar y ligar con la parte de cuerpo de unión de ADNbc y también para hibridar con oligonucleótidos de anclaje específicos que se describen posteriormente. Las partes de cola de unión 52 y 54 mostradas en la Figura 6 comprenden cada una secciones superiores respectivas e inferiores. La sección superior, generalmente designada Y' es complementaria de la parte monocatenaria Y de la parte del cuerpo de unión 50. Las secciones inferiores, generalmente designadas 1 y 2, también son monocatenarias y se diseñan para hibridar con los anclajes descritos posteriormente.

d) Ensamblaje de las uniones

Se preparan reacciones de producción de unión separadas para generar grupos de primer o segundo fluoróforo o para uniones marcadas con puntos cuánticos con diferentes longitudes de unión. Las partes de cabeza de unión 38, 40, partes de cuerpo de unión 50 y partes de cola de unión 52, 54 se ensamblan por condiciones convencionales en condiciones adecuadas en solución como se muestra en la Figura 6 para formar las uniones 55 y 57. Las

condiciones típicas pueden ser NaCl 50 mM, tampón HEPES pH 7,5 (10 mM) y temperatura ambiente.

e) Oligonucleótidos de anclaje

5 Las uniones ensambladas 55, 57 pueden anclarse a una superficie por medio de anclajes. Los anclajes son normalmente oligonucleótidos amino modificados monocatenarios. En una realización preferida, el soporte sólido es un sustrato de vidrio modificado preparado usando técnicas convencionales para acoplar covalentemente el oligonucleótido de anclaje. Por ejemplo, véase: Chrisey, L. A., Lee, G. U., y O'Ferrall, E. (1996) Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039. Los oligonucleótidos de anclaje amino modificados están acoplados a vidrio tratado con amino silano y *p*-fenileno 1,4 diisotiocianato (PDC) (Figura 7).

15 En la implementación específica descrita posteriormente (Figuras 13-15), se usó Transferencia de Energía por Resonancia de Forster (FRET) acoplada con Medición del Tiempo de Vida de Fluorescencia (FLIM) para determinar la proporción de A y B que estaba molecularmente cerca en un complejo AB. FLIM aprovecha la dependencia del tiempo de FRET para permitir mediciones más sensibles de las proporciones de A y B que se encuentran en complejos AB. Se usaron tanto FRET como FLIM en los ensayos mostrados.

20 Como se muestra en la Figura 8, las uniones 55 y 57 se hibridan después con un soporte sólido 60 en el que se han inmovilizado previamente oligonucleótidos de anclaje 56, 58, que tienen cada uno secciones monocatenarias, generalmente designadas 1 y 2, respectivamente, que son complementarias de las secciones correspondientes 1 y 2 de las partes de cola de unión 52, 54.

3 Producción de conjugados de uniones/biomoléculas

25 **a) Uso de traducción *in vitro***
Se producen conjugados de biomolécula de proteína/ácido nucleico que pueden hibridar con las uniones de acuerdo con el método descrito en: Jung, G. Y., y Stephanopoulos, G. (2004) mencionado anteriormente, mediante una reacción de traducción *in vitro* para unir covalentemente un péptido nascente por su extremo C terminal cerca del extremo 3' de un conjugado de ARNm-ADN. Los complejos de proteínas de unión se hibridan después con las matrices hibridadas de uniones fijadas a sus oligonucleótidos de anclaje inmovilizados.

35 Esto se ilustra esquemáticamente la Figura 9 en la que se hibrida una primera biomolécula, indicada en general como proteína A, con la parte de cabeza de la unión 55 y una segunda biomolécula, indicada en general como proteína B, se hibrida con la parte de cabeza de la unión 57. Pueden usarse métodos alternativos para realizar conjugados de biomolécula de proteína-ácido nucleico, incluyendo la reticulación química directa de primera o segunda biomoléculas purificadas con oligonucleótidos modificados.

40 **b) Generación de complejos de ácido nucleico-proteína *in situ***

Como alternativa, pueden generarse complejos de ácido nucleico y proteínas *in situ* hibridando el conjugado de ARNm-ADN con la unión inmovilizada en primer lugar y traduciendo el ARN mensajero mientras está ligado a la unión añadiendo extractos de traducción *in vitro* al ARN mensajero unido.

45 **c) Uso de fusiones proteína-proteína**

50 En otro enfoque, el ARN mensajero se modifica por ingeniería genética para generar fusiones proteicas entre la biomolécula proteica de interés y un segundo dominio de proteína X. El dominio X se diseña para que tenga una afinidad muy alta por un componente modificado por ingeniería genética de un oligonucleótido de parte de cabeza de unión o el extremo de cabeza de la unión. Por ejemplo, cuando el dominio X es una proteína de unión a ADN específica de alta afinidad (por ejemplo represor lambda), su sitio de ADN afín se introduce en el complejo oligonucleotídico de cabeza para permitir que la proteína nascente se asocie con la unión mediante el resto de unión a ADN. Como alternativa, X es una molécula tal como estreptavidina y su compañero de unión, en este caso biotina, se acopla químicamente durante la síntesis con un oligonucleótido de parte de cabeza de unión.

4 Hibridación de conjugados de ácido nucleico - proteína con uniones

60 En el método preferido, se hibridan conjugados de proteínas de biomoléculas de ácido nucleico mediante secuencias complementarias (A o B) cerca del extremo 3' del componente de ácido nucleico con secuencias complementarias en su parte de unión de cabeza como se muestra en la Figura 9. Esto concentra los conjugados de ácido nucleico de molaridades típicas de traducciones *in vitro* (por ejemplo, 10 nM) a las concentraciones experimentales (por ejemplo 3,7 μM basándose en una unión de 200 pb sin ningún solapamiento de unión; véase Tabla 2) que muestra la relación entre la longitud de ADN y otros parámetros para moléculas unidas individualmente espaciadas.

65

Tabla 2

Bases	Longitud	Volumen	Molaridad
200	60 nm	0,4 al	3,7 μ M
2 Kb	600 nm	0,4 fl	3,7 nM
20 Kb	6 μ m	0,4 pl	3,7 pM

Como se ha observado anteriormente no es necesario que las uniones se realicen de ADNbc, pero pueden realizarse a partir de otras moléculas tales como híbridos de ADN DX.

5

5 Medición de la afinidad en solución

La medición de la afinidad entre las primera y segunda biomoléculas A y B también puede llevarse a cabo en solución, permitiendo que se investigue el principio básico que subyace al principio de unión usando el esquema simplificado mostrado en la Figura 12A. En este método, se unen A y B en extremos opuestos de una única unión flexible que permite que ambas moléculas barran un volumen esférico compartido que varía como una función cúbica de la longitud de la unión. A medida que se reduce la longitud de la unión individual, el volumen barrido por A y B se reduce y la concentración efectiva de A y B dentro del volumen aumenta como una función cúbica de la longitud de la unión. Este esquema es formalmente análogo al anclaje de superficie de biomoléculas de unión descritas anteriormente porque A y B pueden considerarse ancladas a una superficie que es exactamente la mitad de longitud de la unión conjunta de modo que los volúmenes barridos por A y B solapan exactamente.

15

En los ejemplos específicos descritos posteriormente, se usó Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET) acoplada con Medición del Tiempo de Vida de Fluorescencia (FLIM) para determinar la proporción de A y B que estaban molecularmente cerca en un complejo AB. FLIM aprovecha la dependencia del tiempo de FRET para permitir mediciones más sensibles de la proporciones de A y B que se encuentran en complejos AB. Se usaron tanto FRET como FLIM en los ensayos mostrados. (Bacsai *et al* (2003) J Biomed Opt. 2003 Jul; 8(3): 368-75; Förster T (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. In Modern Quantum Chemistry, parte III. O. Sinanoglu, editor. Academic Press, Nueva York. 93-137. Stryer L y Haugland RP, (1967) Proceedings of the National Academy of Science USA. 58: 719-730.)

25

Ejemplo 1

a) Marcaje de oligonucleótidos y preparación de “conjuntos de cabeza”

30

Los detalles del sistema de ensayo se ilustran en la Figura 13. Las biomoléculas cuya afinidad se midió eran cadenas complementarias de un híbrido de ADN en el que dos solapamientos de 11 pares de bases se reconocen entre sí en una reacción reversible. Las regiones de interacción de 11 pares de bases son extensiones de ADN monocatenarias de moléculas de ADN bicatenarias más largas que contienen fluoróforos A (Aceptor) y D (Donante) incorporados en las bases indicadas en negrita (Figura 13A). En los datos mostrados, el fluoróforo usado como donante fue Alexa Fluor 488 y el fluoróforo usado como aceptor fue Alexa Fluor 555, ambos fabricados por Molecular Probes. Ambos fluoróforos se incorporaron durante la síntesis de oligonucleótidos y los oligonucleótidos marcados se hibridaron posteriormente para formar las estructuras mostradas en la Figura 6A. Los oligonucleótidos bicatenarios marcados con fluoróforo se denominan “conjunto de cabeza” donante o aceptor para indicar la presencia tanto de la región de afinidad de 11 pb hibridante como la presencia de los colorantes fluorescentes.

35

40

b) Preparación de unión de ADN lineal

Para hacer las moléculas unidas más largas ilustradas en la Figura 13B y esquemáticamente en la Figura 12A y 12B, los oligonucleótidos de conjunto de cabeza donantes y aceptores se ligaron a regiones de ADN bicatenarias de longitud variable por procedimientos convencionales. Brevemente, los oligonucleótidos de “conjunto de cabeza” se escindieron con enzima de restricción Bst X1 y se ligaron con ADN “de cuerpo de unión” de longitud variable cada uno de los cuales contenía un sitio BstX1 y XbaI libre. Se usaron ligamientos BstX1-BstX1 y XbaI-XbaI para generar las moléculas mostradas en la Figura 5B. Estas se purificaron en gel antes de su análisis. Las longitudes totales de las moléculas lineales que incorporaban grupos de cabeza tanto Donantes como Aceptores fueron: 515 pb y 710 pb.

45

50

c) Preparación de muestras, detección por FRET y FLIM

Se diluyeron conjuntos de cabeza o moléculas de ADN lineal de doble marcaje a las concentraciones descritas en una concentración final de NaCl 70 mM, Tris 10 mM pH 8,0. Se introdujeron 6 μ l de cada solución en uno de los pocillos de un portaobjetos de 50 pocillos producido usando un cubreobjetos de múltiples cámaras (Strattech Scientific, Reino Unido) junto con un cubreobjetos de 22 x 50 mm (Menzel-Glaser, Alemania).

55

Las muestras se analizaron usando un láser de Ti:Sa de doble frecuencia que proporciona pulsos ópticos cortos (100 fs de duración) a una velocidad de repetición de 76 Mhz, con longitud de onda en la banda de absorción del fluoróforo donante (~470 nm). La luz de excitación se centró débilmente en la muestra permitiendo una iluminación uniforme y recogida sobre una profundidad de pocillo de 1 mm, para maximizar la contribución de la señal sobre el fondo de fluorescencia del cubreobjetos. Se mantuvieron intensidades de excitación bajas (0,05-10 mW sobre un diámetro de punto de 0,4 mm) para evitar la no linealidad y el daño lumínico. La luz fluorescente recogida de un objetivo de microscopio se analizó espectralmente usando un espectrómetro y se detectó por una cámara CCD enfriada para espectros de FRET integrados en el tiempo. Para FLIM resuelto en el tiempo, se filtró la luz fluorescente por el espectrómetro alrededor del máximo de emisión del fluoróforo donante (520 ± 5 nm) y se detectó por un fotomultiplicador rápido de un único canal (200 ps de tiempo de resolución) conectado con un módulo contador de fotones individual correlacionado con el tiempo. Se midieron las contribuciones del fondo de la solución de tampón sin fluoróforos en las mismas condiciones de excitación y detección y se restó de forma apropiada de los datos.

d) Preparación de una molécula en forma de Y

Las primera y segunda partes de unión para cada biomolécula en una molécula en forma de Y están ancladas a una única cadena de ADN de modo que las uniones son libres para difundirse como para la molécula lineal mostrada en la Figura 12B. La principal ventaja de esta forma de unión en comparación con la de la molécula individual es que las primera y segunda partes de unión están libres para interactuar independientemente de la longitud de la unión intermedia. Por el contrario, la molécula lineal es incapaz de plegarse sobre sí misma en longitudes más cortas que la longitud de persistencia (P) que es aproximadamente entre 90 y 120 pb.

e) Análisis de datos

Para determinar el % de unión máxima, los inventores determinaron en primer lugar la proporción de donante unido y no unido (R) a concentraciones de donante y aceptor diferentes usando el siguiente procedimiento. La relación entre los espectros de degradación unidos y no unidos para diferentes concentraciones de aceptores se determinó a lo largo del tiempo y se representó como se muestra en la Figura 14 usando oligonucleótidos de conjunto de cabeza marcados libres (las tres curvas mostradas representan 1. aceptor 50 nM:donante 50 nM, 2. aceptor 200 nM:donante 50 nM, 3. 600 nM:donante 50 nM).

Para cada curva se realizó un ajuste numérico (líneas de puntos) a la curva de degradación ($R(t)=U(1+R \exp(-t/\tau))$), en el que R=relación entre donante unido y no unido, t=tiempo, U=N(no unido)/N (en el que N=concentración de donante en ausencia de aceptor), τ =constante de degradación. R, U y τ se determinaron directamente a partir del ajuste numérico de los datos experimentales.

La proporción de donante unido = $R/(1+R)$ se representó frente a la concentración de aceptor como se muestra en la Figura 15 (porcentaje normalizado al efecto máximo observado por encima de 4000 nM de concentración de aceptor). En la Figura 15, se determinó la curva experimental de conjuntos de cabeza donantes y aceptores libres para una serie de conjuntos de cabeza aceptores y una única concentración de conjunto de cabeza donante (50 nM). Esto permitió la determinación de la afinidad de unión de los conjuntos de cabeza solapantes de 11 pb como 136 nM. Esto coincide estrechamente con la determinación teórica de 176 nM para la misma secuencia. En la Figura 16, los datos preliminares de dos moléculas lineales solapantes de 11 pb (donante en un extremo, aceptor en el otro; círculos abiertos) se presentan en la misma escala.

f) Determinación teórica de la afinidad de unión de ADN

Asumiendo una reacción química entre las moléculas A y D para formar la molécula unida AD:



así como una reacción inversa y que el sistema esté en equilibrio, se puede definir la constante de disociación:

$$k_d = [A] [D]/[AD] \quad (2)$$

Obsérvese que de acuerdo con los libros de texto básicos (véase por ejemplo John SantaLucia, Jr. y Donald Hicks. (2004) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 415-40), las personas también usan la constante de equilibrio $K_{eq} = 1/k_d$.

$$k_d = 1/k_{eq} = \exp(\Delta G/RT)$$

(3)

5 en la que k_d [mol/l] es la constante de disociación, ΔG [cal/mol] es el cambio de la energía libre debido a la reacción, $R = 1,987$ [cal/(Kmol)], T [K] temperatura absoluta. Para calcular k_d hay que calcular ΔG . En el caso de los inventores, tienen conjuntos de cabeza de ADN con diferentes solapamientos de pares de bases.

Esto puede realizarse por métodos y software desarrollado por el Profesor SantaLucia y colaboradores, John SantaLucia, Jr. y Donald Hicks. (2004) mencionado anteriormente, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 415-40.

10 Para estimar de forma apropiada ΔG para moléculas de ADN hay que tener en cuenta la predicción de plegamiento e hibridación (M. Zuker. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-15, (2003)).

15 Los resultados finales se presentan en las siguientes tablas: las afinidades teóricas se calcularon usando métodos descritos en las siguientes referencias: John SantaLucia, Jr. y Donald Hicks. (2004) mencionado anteriormente; M. Zuker, (2003) mencionado anteriormente; y A V Fotin *et al*, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) p.1515.

CONCENTRACIÓN SALINA 70 mM, TEMPERATURA=21 °C (274,15 K)

Tabla 3. Predicción de ΔG para conjuntos de cabeza de ADN para concentración salina de 70 mM.

PARES DE BASES	dG[kcal/mol]/K [M] (predicción termodinámica)	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de SantaLucia debido al plegamiento (predicción termodinámica)	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de SantaLucia debido al plegamiento (termodinámica de hibridación neta)	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de Fotin debido al plegamiento (predicción termodinámica)	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de Fotin debido al plegamiento (termodinámica de hibridación neta)
11	-13,5 / 1,06304E-10	-9,14 / 1,7685E-7	-6,01 / 3,63052E-5	-10,3 / 2,45826E-8	-7-17 / 5,0465E-6
9	-9,79 / 5,85332E-8	-5,99 / 3,75616E-5	-5,84 / 4,84797E-5	-6,59 / 1,35357E-5	-6,44 / 1,74701E-5
7	-6,93 / 7,59095E-6				
5	-4,34 / 6,219E-4				

20

CONCENTRACIÓN SALINA 35 mM, TEMPERATURA=21 °C (274,15 K)

Tabla 4. Predicción de ΔG para conjuntos de cabeza de ADN para concentración salina de 35 mM.

PARES DE BASES	dG[kcal/mol]/K [M]	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de SantaLucia debido al plegamiento	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de SantaLucia debido al plegamiento (termodinámica de hibridación neta)	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de Fotin debido al plegamiento	dG[kcal/mol]/K [M] Corrección de Fotin debido al plegamiento
11	-12,75 / 3,80743E-10	-8,5 / 5,25316E-7	-5,72 / 5,94583E-5	-9,54 / 8,95563E-8	-6,77 / 9,966E-6
9	-9,19 / 1,6243E-7	-5,48 / 8,94373E-5	-5,36 / 1,09691E-4	-5,99 / 3,75616E-5!!!	5,87 / 4,607E-5!!!
7	-6,48 / 1,63209E-5				
5	-4,04 / 0,00104				

25 Los resultados presentados en la Tabla 3 y Tabla 4 para 11 pares de bases con una corrección debida al plegamiento dependen de los métodos para el cálculo que usan, bien SantaLucia o bien Fotin. La diferencia es de un orden de magnitud. Para 9 pares de bases es mejor el acuerdo entre dos métodos.

Resultados

a) Determinación de la afinidad de unión del solapamiento de 11 pb usando oligonucleótidos libres

5 Un objetivo inicial esencial de estos estudios era determinar un valor preciso para la afinidad de 11 pb para permitir una comparación posterior con resultados usando la metodología de nanounión de la invención. Se llevaron a cabo reacciones de valoración convencionales para identificar la constante de disociación (K_d) para los oligonucleótidos mostrados en la Figura 13A. Esencialmente, esto implicó crear múltiples muestras con una concentración fija de oligonucleótidos de conjunto de cabeza donantes marcados con fluorescencia (D; 50 nM) con una concentración variable de oligonucleótidos de conjunto de cabeza aceptores marcados con fluorescencia (A; 0 nM-5000 nM).

15 Para determinar la cantidad de híbridos de D:A, las muestras se analizaron con respecto a la dependencia del tiempo de FRET-FLIM como se ha descrito anteriormente. Una representación representativa de este análisis se muestra en la Figura 14. La tasa de degradación de la señal de fluorescencia aumenta en presencia de niveles crecientes de conjuntos de cabeza aceptores marcados con fluorescencia que muestran una tasa de degradación aumentada del fluoróforo donante en presencia del fluoróforo aceptor que es una característica dependiente del tiempo de FRET. Resulta importante que los conjuntos de cabeza marcados que no contenían un saliente monocatenario no mostraron FRET/FLIM (datos no mostrados), lo que plantea que la degradación observada se debía a la hibridación intermolecular de los dos conjuntos de cabeza.

20 Las curvas de degradación características de análisis de FRET-FLIM del tipo mostrado en la Figura 14 se transformaron en valores de FLIM relativos de acuerdo con el método descrito anteriormente y se representaron en relación con la concentración de oligonucleótido de conjunto de cabeza aceptor (Figura 15). Específicamente en esta figura el porcentaje de FLIM máximo (eje y) para el conjunto de cabeza de donante de solapamiento de 11 pb se representó frente a la concentración del conjunto de cabeza aceptor. La curva mostró una respuesta de saturación clásica con una concentración de unión semimáxima (K_d) de conjunto de cabeza Aceptor que se calcula (FIT) que es de 136 nM. Se usó análisis de regresión lineal para estimar un valor de 136 nM para la constante de disociación del solapamiento de 11 pb en NaCl 70 mM. Este valor fue muy cercano al valor teórico de 170 nM que se calculó para la secuencia de predicciones termodinámicas de vecino más cercano (véase anteriormente). Esto indica que el método de FRET-FLIM era capaz de determinar con precisión la proporción de fluoróforos unidos.

b) Dependencia de la longitud de la unión de FLIM en moléculas lineales

35 La proporción de moléculas de unión lineales halladas en la forma unida aumentó a media que se reducía la longitud de la unión de acuerdo con predicciones (Figura 12A, B). Para ensayar esto, se generaron moléculas lineales con un conjunto de cabeza donante de solapamiento de 11 pb en un extremo y un conjunto de cabeza aceptor en el otro como se ha descrito anteriormente. Los datos obtenidos se representan en la tabla posterior. Se indican datos preliminares sobre FRET/FLIM para las moléculas lineales en círculos abiertos en la Figura 16 y Tabla 5 (se muestra un conjunto de datos más completo en un mayor número de longitudes de ADN en la Figura 22). Los puntos de datos preliminares son para un ADN lineal de 515 pb y uno de 710 pb; cada uno con un solapamiento de 11 pb. Los extremos de cada molécula se marcaron en un extremo con Alexa Fluor 488 y en el otro con Alexa Fluor 555. La concentración real de cada molécula fue de 5 nM y la concentración unida nominal de cada molécula fue de 778 nM y 2000 nM como se determina asumiendo que cada molécula tiene un volumen cuyo radio esférico es la longitud de la unión. Como puede verse a partir del gráfico, los valores de FRET medidos fueron mucho mayores de lo esperado basándose en la concentración molecular absoluta (5 nM) y fueron mayores para la molécula más corta (515 pb) que para la molécula más larga (710 pb). Estos datos son coherentes con la unión que potencia la concentración de los extremos libres en proporción a la inversa de la longitud de la unión. Además, los datos son coherentes con las reivindicaciones de que la concentración puede alterarse variando la longitud de las uniones.

50

Tabla 5

Longitud de p [pb]	$f=[AD]/D$	U	R	τ [ns]	$[A]_{TOT}$ [nM]	$[D]_{TOT}$ [nM]	$[A]$ [nM]
710	0,1181	0,8905	0,134	0,5569	778,15	778,15	686,25
515	0,2922	0,7299	0,413	0,6724	2039,0	2039,0	1443,2

55 El porcentaje de FLIM máximo se representó frente a la concentración unida nominal en la Figura 16 que muestra que FRET/FLIM y por lo tanto la unión aumentaba a longitudes de unión más cortas. En la Figura 16, el porcentaje máximo de FLIM para el conjunto de cabeza donante de solapamiento de 11 pb (como en la Figura 15) se muestra de nuevo para referencia, representado frente a la concentración del conjunto de cabeza aceptor. Los datos muestran que el porcentaje de FLIM medido para cada longitud de unión era comparable al generado usando concentraciones libres del mismo ligando como se muestra en la Figura 15, lo que sugiere que las uniones mantienen sus extremos dentro de un volumen similar al generado por una molécula lineal flexible.

60

Ejemplo 2**Detalles experimentales:**

5 La generación de los datos mostrados implicó la preparación de moléculas de ADN lineales marcadas con fluoróforos y la medición de FRET resuelto en el tiempo.

1. Preparación de reactivos10 *a) Diseño de los conjuntos de cabeza*

Las biomoléculas cuya afinidad se midió se muestran en la Figura 19. Los puntos clave son un solapamiento de 11 pb entre dos pares de oligonucleótidos que constituye la afinidad biológica para medir, junto con fluoróforos acoplados covalentemente que se requieren para la medición de moléculas libres y unidas usando FRET resuelto en el tiempo. Estas moléculas son esencialmente iguales que las descritas en el Ejemplo 1 anterior (Figura 13A) que contienen los mismos solapamientos de ADN monocatenarios de solapamiento de 11 pb. La diferencia principal entre estas secuencias y las secuencias de este ejemplo es la presencia de un semisitio BstX1 para permitir el ligamiento en los ADN de Cuerpo de Unión (Figura 19C, D).

20 Los pares de oligonucleótidos solapantes se denominan "Conjuntos de Cabeza" y se distinguen por el fluoróforo fijado. El fluoróforo donante (Alexafluor 488) y los fluoróforos Aceptores (ATTO550) se unieron con los oligonucleótidos durante la síntesis por proveedores comerciales (Eurogentec) y se unen con las bases indicadas.

25 Como control, se sintetizaron oligonucleótidos de extremos romos de Conjunto de Cabeza marcados con fluoróforo análogos que no tienen solapamiento monocatenario (solapamiento de 0 pb; Figura 19B).

30 *b) Hibridación y ligamiento con el cuerpo de unión*

Los oligonucleótidos de 2 constituyentes para los Conjuntos de Cabeza donantes o aceptores (concentración final de 25 μ M) se hibridaron enfriando desde 90 $^{\circ}$ C hasta temperatura ambiente durante 1 hora en una máquina termocicladora en tampón de hibridación (NaCl 70 mM, Tris 10 mM pH 7,4).

Después de la hibridación, se hibridaron 1,5 μ l de una solución 25 μ M de cada uno de los Conjuntos de Cabeza donantes y aceptores (exceso molar de \sim 5 veces) con ADN de "Cuerpo de Unión" de diversas longitudes para generar moléculas lineales con un conjunto de cabeza donante y aceptor terminal de acuerdo con procedimientos convencionales ((Sambrook *et al.*, 1989); Figura 19C, D). Un ejemplo de análisis en gel de los reactivos y productos de ligamiento se muestra en la Figura 20 (Gel de Agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio de acuerdo con procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989)). Esto muestra que los cuerpos de unión lineales aumentaron de tamaño después del ligamiento de los Conjuntos de Cabeza donantes y aceptores.

40 Los ADN que se analizaron por FRET (Figura 20) fueron de 498 pb, 692 pb, 1052 pb y 1752 pb de longitud después de la adición de los Conjuntos de Cabeza. Para asegurar que cada cuerpo de unión se unía con un Conjunto de Cabeza donante y uno aceptor, las secuencias solapantes de ligamiento se diseñaron para ser diferentes en secuencia y no palindrómicas (Conjunto de Cabeza Aceptor 5'TCAC; Conjunto de Cabeza Donante 5'CAACA). Esto se consiguió mediante digestión con BstX1 de los ADN del Cuerpo de Unión de plásmidos que contenían dos sitios BstX1 flanqueando la región de Cuerpo de Unión de ADN.

Después del ligamiento, las moléculas lineales se purificaron en gel y se cuantificaron por comparación con patrones de ADN. Para análisis de FRET, las muestras se diluyeron a las concentraciones indicadas y se añadieron 5 μ l a los pocillos de un cubreobjetos de cámara multipocillos (Grace Biolabs; CWCS 50R-1.0). Los pocillos se sellaron con un cubreobjetos de vidrio convencional.

2. Análisis de FRET resuelto en el tiempo.55 *a) Adquisición de datos*

Las muestras se analizaron usando un láser Ti:Sa de doble frecuencia que proporciona pulsos ópticos cortos (duración de 100 fs) a una velocidad de repetición de 76 Mhz, con la longitud de onda en la banda de absorción del fluoróforo donante (\sim 470 nm). La luz de excitación se centró débilmente en la muestra permitiendo una iluminación uniforme y recogida sobre una profundidad de pocillo de 1 mm, para maximizar la contribución de señal sobre el fondo de fluorescencia del cubreobjetos. Se mantuvieron bajas intensidades de excitación (0,05-10 mW sobre un diámetro de punto de 0,4 mm) para evitar las no linealidades y el daño lumínico. Se analizó espectralmente la luz fluorescente recogida de un objetivo de microscopio usando un espectrómetro y se detectó mediante una cámara CCD enfriada para espectros de FRET integrados en el tiempo. Para FRET resuelto en el tiempo, la luz fluorescente se filtró por el espectrómetro en torno al máximo de emisión del fluoróforo donante (520 ± 5 nm) y se detectó por un

fotomultiplicador rápido de un único canal (resolución en el tiempo de 200 ps) conectado con un módulo contador de fotones individual correlacionado en el tiempo. Se midieron las contribuciones de fondo de la solución de tampón sin fluoróforos en las mismas condiciones de excitación y detección y se restó apropiadamente a los datos.

5 b) Análisis de datos

La dependencia en el tiempo de FRET puede verse en la dinámica de Donante y Aceptor mostrada en la Figura 21. La intensidad de fluorescencia máxima de cada traza se normalizó a 1. Como se esperaba, la proximidad del Fluoróforo Donante al Fluoróforo Aceptor (debido a la unión de las secuencias solapantes de 11 pb) dio como resultado una degradación rápida de la fluorescencia donante en comparación con los oligonucleótidos de Conjunto de Cabeza Donantes no ligados (Figura 21A curvas sólidas). Se observó una potenciación correspondiente de la dinámica de fluoróforos aceptores con el Conjunto de Cabeza Aceptor no ligado. Resulta importante que no se observó transferencia de energía en experimentos análogos que implicaban las moléculas lineales solapantes de 0 pb (Figura 21B), lo que indica que se requería solapamiento de 11 pb para los cambios en dinámica de fluorescencia.

La proporción del número de moléculas unidas (conformación circular) frente a totales [Dunido/Dtot] es proporcional a la probabilidad de que las moléculas estén en la conformación circular y se calculó como se ha descrito anteriormente.

La variación de la proporción de moléculas unidas con la longitud de ADN se muestra en la Figura 22. La proporción de las moléculas unidas coincidió estrechamente con los valores teóricos predichos a partir de modelos de concentración final de ADN (factor J_M) como se calcula de acuerdo con Rippe *et al.*, (Rippe, 2001) (véase símbolos x). Es importante observar que la curva teórica muestra una concentración final local máxima (factor J_M) cercana a la longitud de persistencia del ADN. Se observa un máximo similar en los datos experimentales. La base práctica para el máximo es que debajo de una cierta longitud (la longitud de persistencia), los extremos de ADN no pueden plegarse hacia atrás para unirse entre sí debido a la rigidez del ADN. Por el contrario, una vez que el ADN ha superado una longitud requerida para plegarse sobre sí mismo se observa un nivel máximo de unión. Aumentos adicionales en la longitud dan como resultado una menor probabilidad de que los extremos libres se encuentren entre sí. Estos cambios de características en la unión son la propiedad que usarán los métodos de la invención para determinar la afinidad de unión de compañeros de unión desconocidos.

El segundo punto importante a observar es que la proporción de moléculas unidas no se vio afectada notablemente por una dilución 10 veces (10 nM a 1 nM; Figura 22). Esto contrasta con la fuerte dependencia de la concentración de las moléculas libres como se muestra en la Figura 15. Este hecho es coherente con la opinión de los inventores de que las mediciones de afinidad de nanounión deberían ser altamente sensibles. Teóricamente, la sensibilidad de las mediciones usando métodos de acuerdo con la invención debería requerir solamente múltiples mediciones de un único par de moléculas. Sin embargo, en algunas implementaciones del método, se explorarán muchos pares de moléculas simultáneamente (>100.000) para maximizar el resultado de la señal.

40 Análisis

Los resultados muestran que las biomoléculas unidas en cada extremo de una unión de ADN lineal ocupan un volumen efectivo que está cerca del predicho basándose en el volumen de barrido de su longitud de contorno, d ($4/3 \cdot \pi \cdot (d/2)^3$). Los datos muestran que la variación de la longitud de la unión altera la concentración efectiva de los extremos.

Estos resultados muestran que la longitud de unión puede usarse como un modo directo de controlar la concentración de biomoléculas en los extremos libres de las uniones y que puede obtenerse una alta "concentración" de biomoléculas unidas mediante una interacción intramolecular entre un par de biomoléculas en el extremo de la unión.

Los resultados muestran que el análisis de FRET/FLIM es una manera práctica de evaluar la proporción de biomoléculas unidas fijadas al extremo de las uniones. Ya que el porcentaje de moléculas que interaccionan depende de la longitud de la unión y no de la concentración de las uniones, es, en principio, posible medir la afinidad de un par de moléculas unidas tomando múltiples lecturas de FRET/FLIM en una única molécula unida. Sin embargo, con la sensibilidad de tecnologías de fluorescencia existentes, los inventores estiman que los análisis de FRET/FLIM requerirán al menos 10.000 pares de moléculas unidas necesarias para estimar una constante de unión en equilibrio ya que es necesario que las lecturas se realicen con tan poco como el 10 % de pares unidos, 1.000 moléculas. No obstante, este número de moléculas está en el intervalo attomolar y plantea que la técnica debería ser tan sensible como se ha analizado anteriormente.

Aunque el método preferido para unir las biomoléculas es unir las con una superficie sólida, la conexión de dos biomoléculas mediante una única unión flexible es esencialmente una modificación práctica menor del sistema de unión lineal descrito ya que el control primario sobre la concentración de biomoléculas unidas se obtendrá alterando la longitud de unión. Sin embargo, el método de unión en superficie también debería permitir un control fino del

solapamiento entre volúmenes de barrido alterando las distancias entre anclajes (véase Figuras 1 a 4).

No obstante, se ha observado que la molécula lineal y otras implementaciones del enfoque de bioquímica de nanounión tales como la molécula en forma de Y (Figura 17) pueden tener ventajas definidas en situaciones en las que las moléculas de detección se introducen en recipientes que contienen factores que pueden alterar la afinidad de las dos biomoléculas. Por ejemplo, podrían usarse preparaciones de vesículas que contienen las moléculas lineales o en forma de Y para controlar la concentración de un metabolito que altera la afinidad de una primera biomolécula por una segunda biomolécula y está libre para difundirse a la vesícula. Recipientes potenciales incluyen tubos de ensayo, placas de micropocillos, recipientes unidos a membrana que permiten la difusión de metabolitos, pero reciclan la molécula lineal, células (por ejemplo microinyección de moléculas) y organismos (por ejemplo embriones de pez cebra).

6 Formato para métodos/aparato de la invención

a) Formato de portaobjetos de vidrio

En una realización, el formato del soporte es un portaobjetos de vidrio en el que se han imprimido oligonucleótidos en matrices de puntos usando una máquina de disposición de clavija partida.

b) Formato de microperlas

En un formato alternativo, el soporte se proporciona por microperlas que se acoplan en formatos que generan una relación única entre una única perla y combinación de uniones. Este formato permite la adaptación de la tecnología a sistemas microfluídicos.

c) Controlar la separación entre anclajes

Usando la implementación de puntos en serie preferida, mencionada en la sección 6a) anterior, los anclajes oligonucleotídicos amino terminales para las primera y segunda biomoléculas están acoplados covalentemente con el sustrato de vidrio modificado. Un oligonucleótido amino terminal no específico (diseñado para no unirse con componentes de unión) se valora en la mezcla de acoplamiento de oligonucleótido de anclaje para variar la distancia de acoplamiento entre anclajes cuando sea apropiado. Las distancias medias entre anclajes varían de longitudes mayores que la longitud de unión a la capacidad de unión de oligonucleótido máxima (la capacidad máxima es 20 pmoles de ADN unido/cm² que equivale a una separación entre anclajes media de 1,6 nm; Chrisey, L. A., *et al* (1996)). Esta densidad entre anclajes supera en gran medida la requerida para el intervalo típico de densidades de anclaje (por ejemplo poner uniones de 200 pb (60 nm) a una distancia media de 30 nm entre sí requiere una separación media de 30 nm).

El oligonucleótido no específico actúa para proteger los grupos reactivos y también hará la superficie electrostáticamente negativa, minimizando de este modo la asociación de la unión de ADN con carga negativa con la superficie. Como alternativa, pueden acoplarse grupos lipídicos hidrófobos con la superficie de vidrio para dificultar la asociación de ADN-superficie debido a la incompatibilidad de las asociaciones hidrófobas - hidrófilas.

En una implementación alternativa, las secuencias presentes en el oligonucleótido de anclaje (secuencias 1 y 2; de los anclajes 56 y 58 en la Figura 8) se sintetizan en serie (es decir 5' secuencia 1 - secuencia 2-3' como un único oligonucleótido). Esto generará en la práctica un anclaje común para ambas uniones A y B y asegurará que los volúmenes de barrido se solapen completamente. Puede haber ventajas para este enfoque si se fueran a estudiar números muy bajos (tan bajos como un par de biomoléculas) como parte de desarrollos posteriores de la técnica.

7 Lectura de ensayo

a) Sistemas montados en portaobjetos

En una realización de la invención, la lectura del ensayo es la intensidad de transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) entre los diferentes fluoróforos 42, 43 acoplados con partes de cabeza de unión 38 y 40 o en otro lugar en la parte de ácido nucleico de la unión como se muestra en la Figura 10. Se usa un láser apropiado para el máximo de excitación (λ_1) para el fluoróforo para excitar ese fluoróforo. Se registra la emisión a la longitud de onda máxima (λ_2) del fluoróforo 43 para evaluar el nivel de FRET (Figura 10). Como alternativa, el fluoróforo 43 puede seleccionarse para inactivar la fluorescencia del fluoróforo 42 mediante FRET. En la práctica, para que se produzca FRET, una molécula excitada de un fluoróforo tiene que estar molecularmente cerca (<10 nm) de otro fluoróforo para que se transfiera energía que conduce a emisión a la longitud de onda característica del otro fluoróforo. Esto sucederá en métodos de la invención cuando las primera y segunda biomoléculas también estén molecularmente cerca debido a la formación de complejos entre las primera y segunda biomoléculas. Por lo tanto, la proporción de primera y segunda biomolécula presente dentro de un punto de biomolécula unida se cuantifica mediante la intensidad de FRET. Se usan controles apropiados (por ejemplo puntos de los fluoróforos 42 y 43 solamente) para normalizar los niveles de señal.

FRET se mide usando un microscopio confocal en portaobjetos de vidrio que contienen matrices de biomoléculas unidas.

b) Uso de esferas o puntos cuánticos de nanoescala

En una solución alternativa, se unen sólidos de nanoescala, tales como esferas o “puntos cuánticos” (Doty, R. C. *et al* Cell Mol. Life Sci. 61 (15) 1843-9), en lugar de los fluoróforos individuales. Estos conjugados pueden ofrecer eficacias de FRET mayores debido al número aumentado de moléculas fluorescentes. Como alternativa, los sólidos de nanoescala permitirían realizar espectroscopia de correlación de fluorescencia usando un microscopio óptico confocal de alta resolución. Para uniones mayores de 2 Kb (0,6 μm), la formación de complejos de primera y segunda biomolécula puede registrarse directamente debido a la proporción de pares de puntos fluorescentes en proporción a los que muestran alguna separación.

8 Análisis de datos

Se usan ecuaciones de unión en equilibrio bien caracterizadas sencillas (Michaelis Menten) para derivar los parámetros de interacción moleculares basándose en las concentraciones de las primera y segunda biomoléculas y la proporción de las biomoléculas que se unen.

9 Aplicaciones

Las aplicaciones adicionales de métodos de la presente invención, la técnica de bioquímica de nanounión, en todos los formatos (lineal, en forma de Y y unido) incluyen:

a) Determinación de K_d

Por ejemplo, en un experimento típico para determinar con precisión la K_d de una interacción, se prepara una serie de longitudes de unión y distancias entre anclajes como una matriz de puntos usando combinaciones apropiadas de anclajes y uniones para las primera y segunda biomoléculas. Esto genera una serie convencional de concentraciones. Estas concentraciones se representan frente a la proporción de complejo de primera y segunda biomolécula unido y se determina la concentración de la primera biomolécula (o la segunda biomolécula) requerida para unión semimáxima (esta concentración es la K_d).

b) Exploración de bibliotecas

El método de la invención permite la exploración de interacciones entre una única molécula A y una biblioteca de moléculas B1, B2, B3... B_n. En este formato, cada punto está ocupado solamente por A y B1 o A y B2... A y B_n. En una implementación preferida para moléculas proteicas, se generan uniones de cabeza que reconocen regiones únicas (por ejemplo codificantes) del extremo 3' de los mensajes B1, B2, B3... B_n y se acoplan con las uniones centrales como se ha descrito antes. B_n puede ser una biblioteca de proteínas que representa potencialmente el proteoma/transcriptoma. Como alternativa, B_n puede ser bibliotecas de péptidos usadas para definir sitios de interacción o bibliotecas unidas de compuestos químicos que varían de compuestos de moléculas pequeñas a bibliotecas de polímeros sintéticos.

c) Medición de K_{off}

Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 11, usando un anclaje/unión para una segunda biomolécula que puede escindirse junto con concentraciones de saturación iniciales de las primera y segunda biomoléculas, es posible determinar K_{off} . En esta disposición, se controla la tasa de degradación de los niveles del complejo de las primera y segunda biomoléculas en tiempo real después de la escisión de la unión para la segunda biomolécula. Este tipo de análisis es análogo al usado en resonancia de plasmón superficial para determinar la K_{off} .

Esto puede conseguirse de dos maneras. Para situaciones que implican tasas de K_{off} lentas, la digestión con enzimas de restricción del anclaje/unión libera la segunda biomolécula y permite que se difunda lejos de la primera biomolécula. Para tasas de K_{off} más rápidas, se incorpora un oligonucleótido modificado que contiene un resto fotoescindible en la región monocatenaria del anclaje. La fotoescisión se inicia usando una longitud de onda diferente de la luz de la usada en el análisis de FRET. Conociendo K_{off} y K_d , puede calcularse K_{on} basándose en la ecuación $K_d=K_{off}/K_{on}$

d) Exploración con respecto a moduladores de sistemas biológicos

Estableciendo las constantes de unión entre las primera y segunda biomoléculas que están cerca de la K_d , es posible preparar reacciones de unión a concentraciones de las primera y segunda biomoléculas que están cerca de la K_d y por lo tanto son particularmente sensibles a exploraciones con respecto a moduladores solubles de su interacción. Estas moléculas moduladoras se denominarán de forma colectiva “C”. Los ejemplos de C incluyen: una proteína de interacción purificada, una proteína que modifica A y B (por ejemplo, una quinasas), una molécula

farmacológica o candidata, mezclas complejas de proteínas que contienen uno o más componentes que alteran la formación de complejos AB (por ejemplo extractos celulares, suero sanguíneo, otros fluidos biológicos). C podría ser una solución de una única molécula o mezclas complejas de compuestos (por ejemplo extractos biológicos o fluidos corporales). C puede en sí misma estar unida con una tercera unión o como alternativa puede no estar unida, por ejemplo, en solución de acuerdo con la aplicación. La presencia de C puede ensayarse en varios formatos como se describe posteriormente con referencia a la Figura 18.

5

Formato 1. Se trata una matriz de diferentes pares de primera y segunda biomolécula unidos con C para determinar el intervalo de reacciones de unión a las que afecta C. Las longitudes de unión de A y B pueden ajustarse de modo que su concentración efectiva sea cercana a la K_d del complejo AB. A esta concentración estaría presente el 50 % de AB en el complejo y la interacción sería más sensible a factores que alteran la fuerza de interacción de AB. El factor "C" puede aumentar o reducir la afinidad de A por B interaccionando con o modificando uno o ambos de A y B.

10

Formato 2. El mismo par unido de primera y segunda biomoléculas se trata con diferentes compuestos C uniendo el primer y segundo en pocillos de reacción separados (por ejemplo placas de micropocillos).

15

Formato 3. Flujo Continuo. El mismo par unido de primera y segunda biomoléculas dispuestas en un formato de columna o una matriz de microperlas o en un sistema microfluídico se tratará en un flujo de C. En este caso, C puede ser una serie secuencial de soluciones de ensayo o fracciones de una separación (por ejemplo eluatos de columna de cromatografía en un sistema químico combinatorio, o fracciones proteicas de un extracto celular.

20

Formato 4. Medición de la concentración de "C" conocidas. Cuando la afinidad de un Factor "C" por A, B o un complejo AB se conoce, puede medirse la concentración de Factor C. Esta podría usarse por ejemplo para determinar la proporción de biomoléculas en muestras clínicas tales como suero.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para medir la afinidad de primera y segunda biomoléculas en el que una primera biomolécula está unida por una primera parte de unión que tiene una longitud de primera parte de unión y una segunda biomolécula está unida por una segunda parte de unión que tiene una longitud de segunda parte de unión, determinar la unión de primera y segunda biomoléculas adyacentes entre sí, variar al menos una de las longitudes de las primera y segunda partes de unión y determinar la unión de las primera y segunda biomoléculas, en el que las biomoléculas están unidas a un soporte y/o unidas entre sí.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la unión es en forma de Y.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la longitud de cada rama se varía de forma independiente.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las primera y segunda biomoléculas están unidas entre sí en una disposición molecular lineal.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que tanto la primera como la segunda biomoléculas están unidas a un soporte.
- 20 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que las primera y segunda biomoléculas están unidas entre sí y al soporte.
7. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que el soporte lo proporciona un soporte sólido.
- 25 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que las primera y segunda partes de unión se proporcionan por medio de una única unión.
- 30 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que las primera y segunda biomoléculas están estrechamente adyacentes entre sí, de modo que los volúmenes de barrido sustancialmente hemisféricos definidos por el movimiento de cada biomolécula se solapan, de modo que las primera y segunda biomoléculas pueden unirse entre sí.
- 35 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que variando las longitudes de primera y segunda partes de unión pueden variarse las concentraciones efectivas de las primera y/o segunda biomoléculas.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 en el que se determina una serie de reacciones de unión a las que afecta una tercera biomolécula determinando la unión de las primera y segunda biomoléculas.
- 40 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que al menos una parte de unión comprende nucleótidos.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la o cada parte de unión comprende ADN bicatenario.
- 45 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que la unión, o cada una de ellas, comprende un nanotubo de carbono, fibrilla amiloide o un polímero.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14 en el que el polímero es un complejo de cruce de ADN tal como un híbrido DX.
- 50 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15 en el que al menos una parte de unión está unida al soporte sólido por medio de un anclaje oligonucleotídico.
- 55 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 en el que se sintetizan en serie oligonucleótidos de anclaje para las primera y segunda uniones.
18. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la proporción de las primera y segunda biomoléculas que están molecularmente cerca entre sí indica la proporción de primera y segunda biomoléculas que interactúan.
- 60 19. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la proporción de primera y segunda biomoléculas de unión se determina por la intensidad de transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) entre los primer y segundo fluoróforos respectivamente unidos a, o integrados con, las primera y segunda biomoléculas.
- 65 20. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16 en el que el soporte sólido es un portaobjetos de vidrio y están impresos anclajes o uniones oligonucleotídicos en matrices en una superficie del

portaobjetos de vidrio.

21. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20 en el que el soporte lo proporciona una microperla acoplada a una combinación específica de primera y segunda biomoléculas unidas.

5 22. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 en el que al menos una de las primera y segunda biomoléculas es una biomolécula proteica o polipeptídica conectada con una primera unión de ácido nucleico por medio de una reacción de traducción *in vitro* para unir covalentemente un péptido naciente por su extremo C terminal cerca de, o en, el extremo 3' de un conjugado de ARNm-ADN.

10 23. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la K_d de una interacción entre las primera y segunda biomoléculas se determina determinando la proporción de primera y segunda biomoléculas unidas para una serie de concentraciones de las primera y segunda biomoléculas y determinando después la concentración (K_d) de la primera o segunda biomolécula requerida para unión semimáxima de las primera y segunda biomoléculas.

15 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el valor de K_{off} para una interacción entre las primera y segunda biomoléculas se determina proporcionando concentraciones de saturación iniciales de las primera y segunda biomoléculas, escindiendo una segunda parte de unión o anclaje y controlando cualquier cambio en los niveles de primera y segunda biomoléculas unidas.

20 25. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 que comprende proporcionar una concentración de primera y segunda biomoléculas en torno a la K_d de una interacción entre las primera y segunda biomoléculas en el que se determina el efecto de un modulador de la interacción entre las primera y segunda biomoléculas.

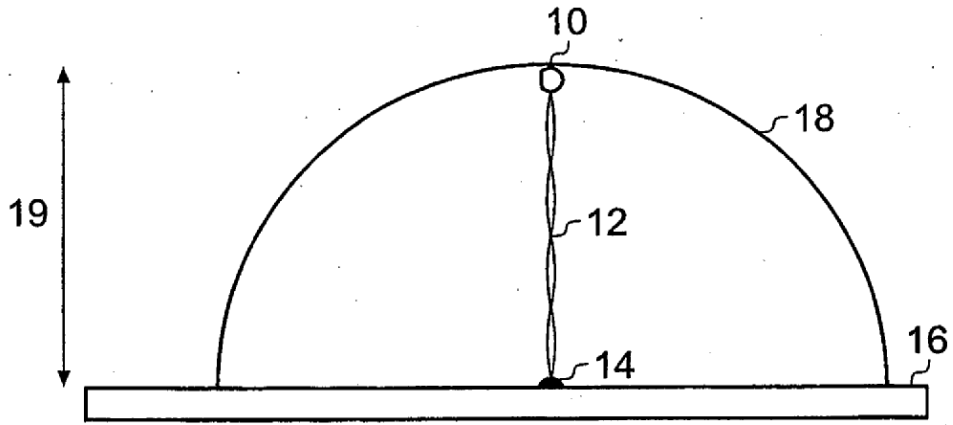


Fig. 1

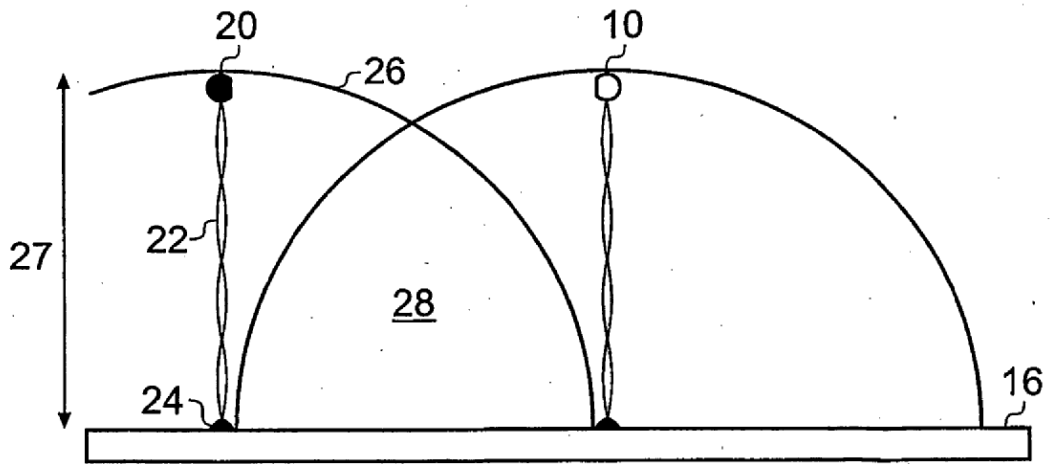


Fig. 2

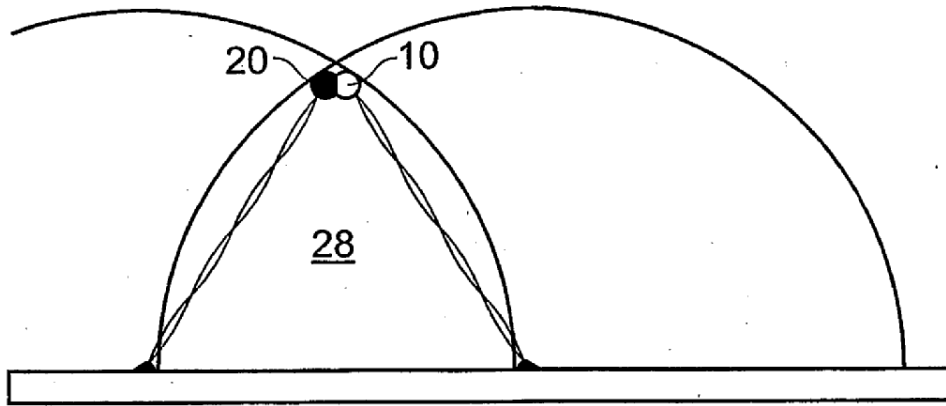


Fig. 3A

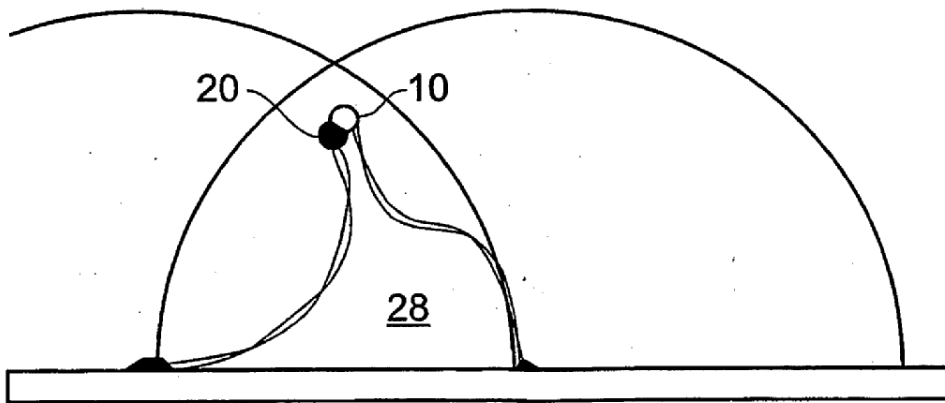


Fig. 3B

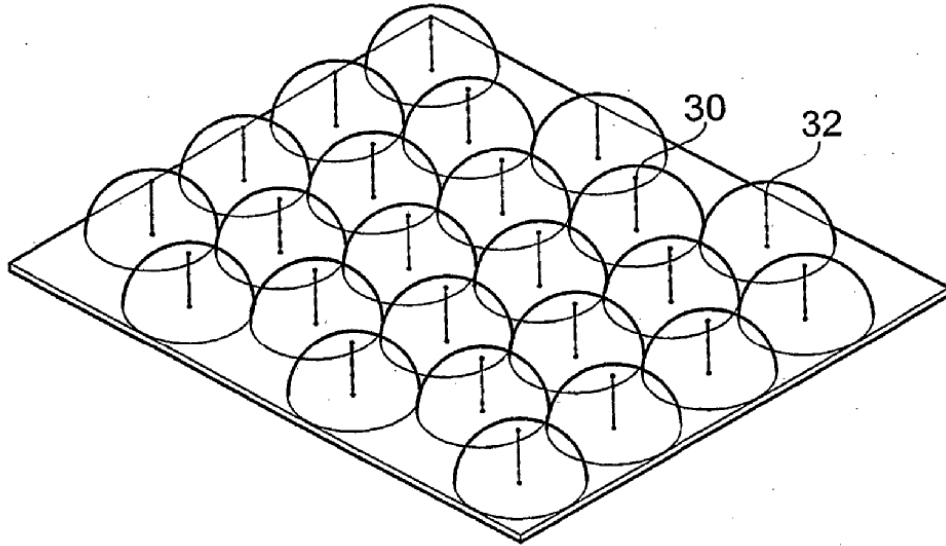


Fig. 4A

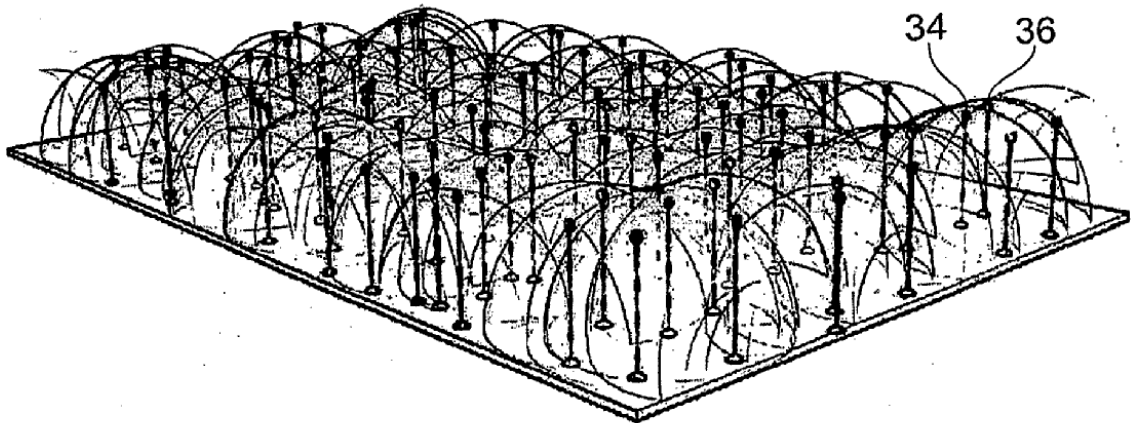


Fig. 4B

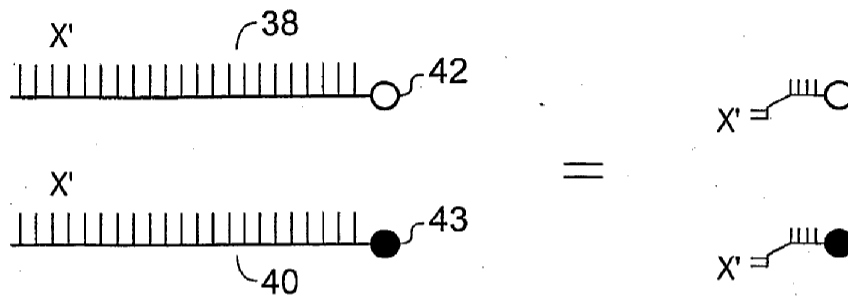


Fig. 5

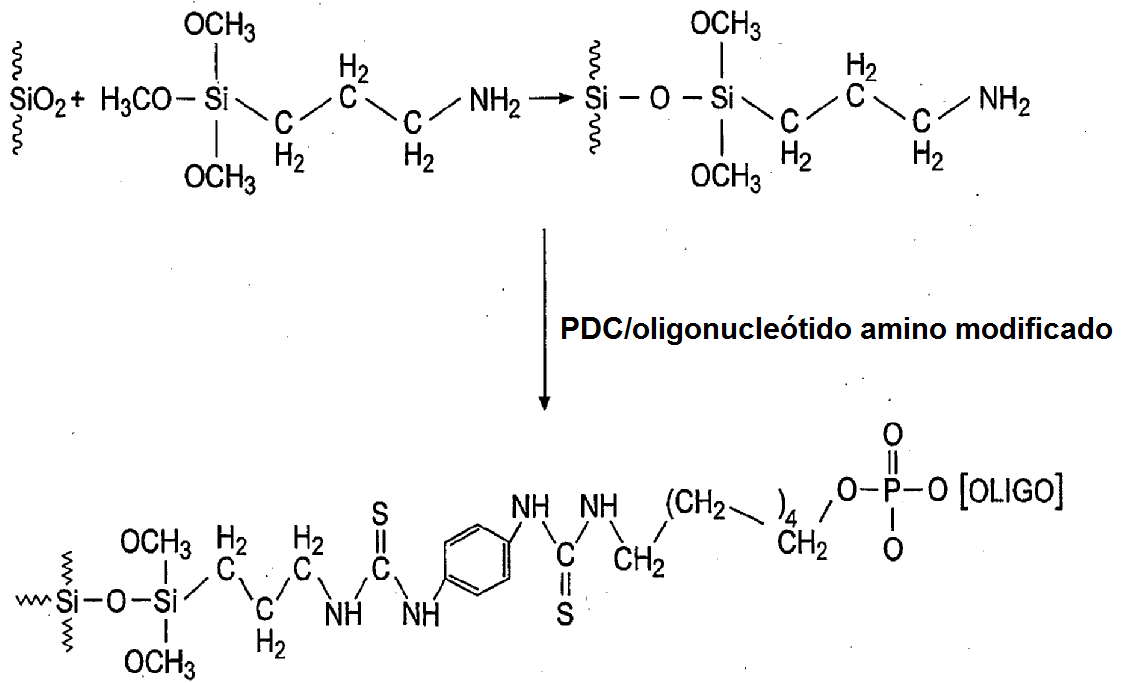


Fig. 7

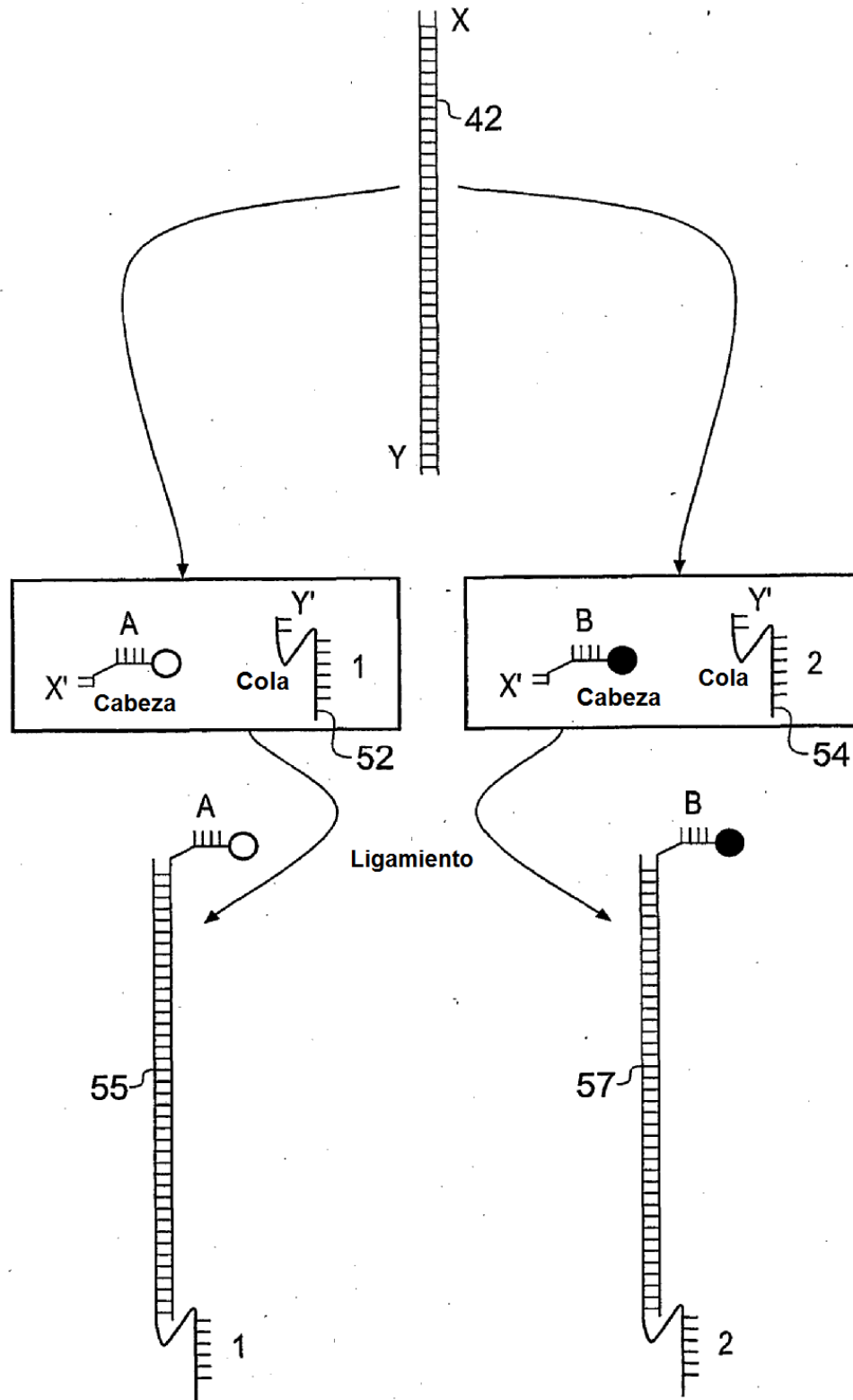


Fig. 6

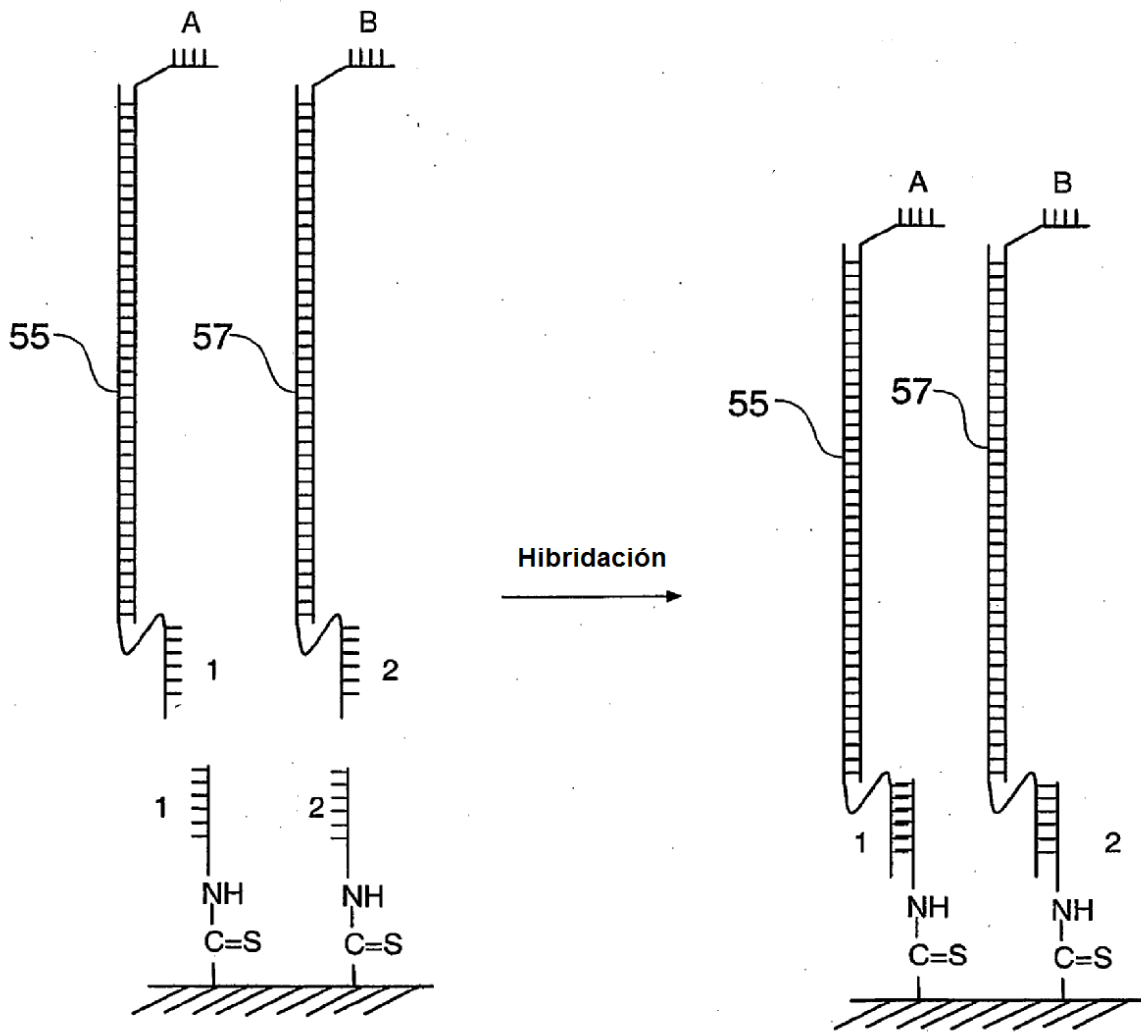


Fig. 8

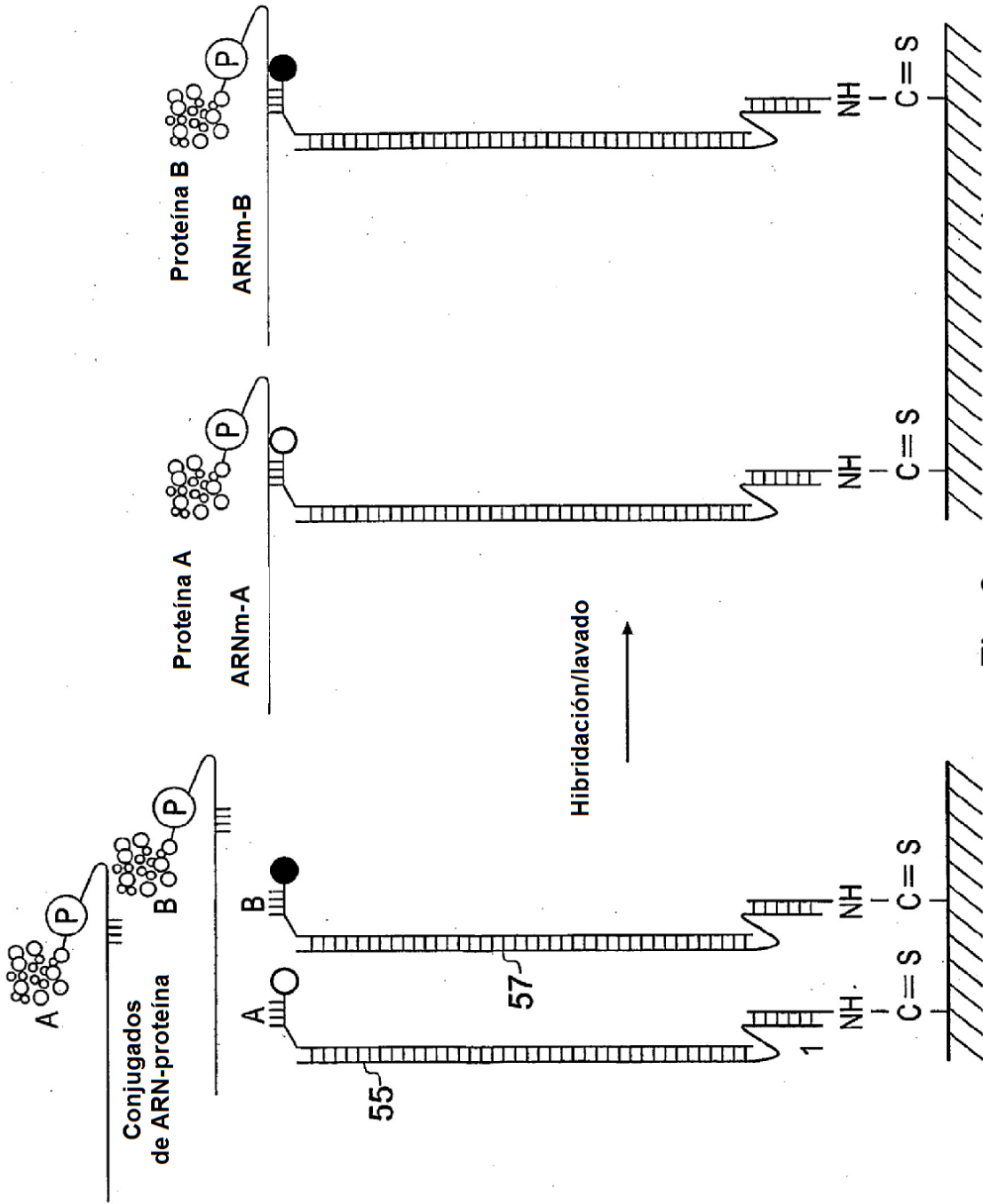


Fig. 9

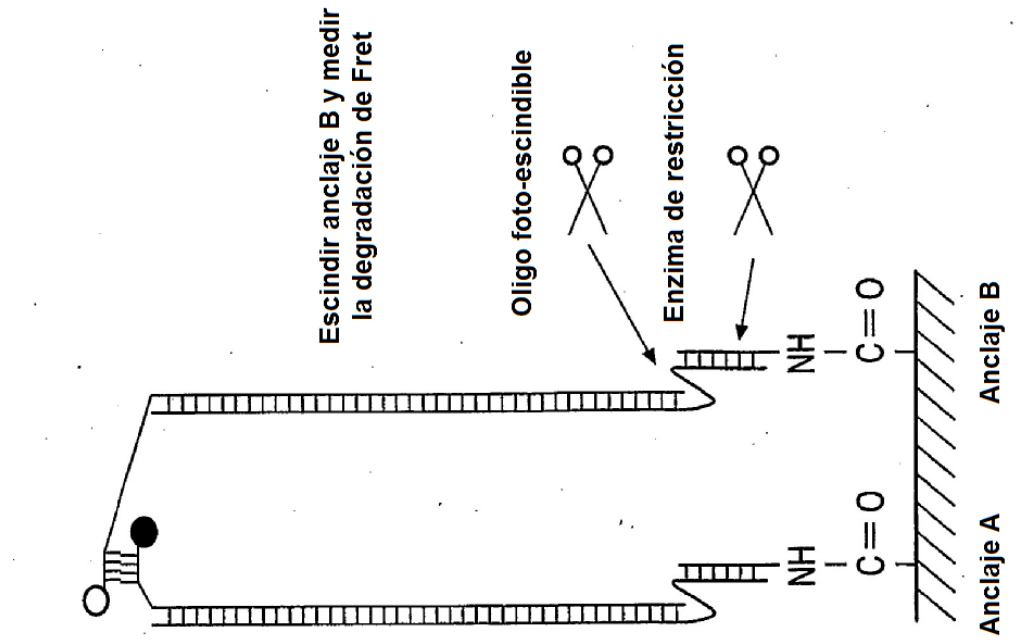


Fig. 11

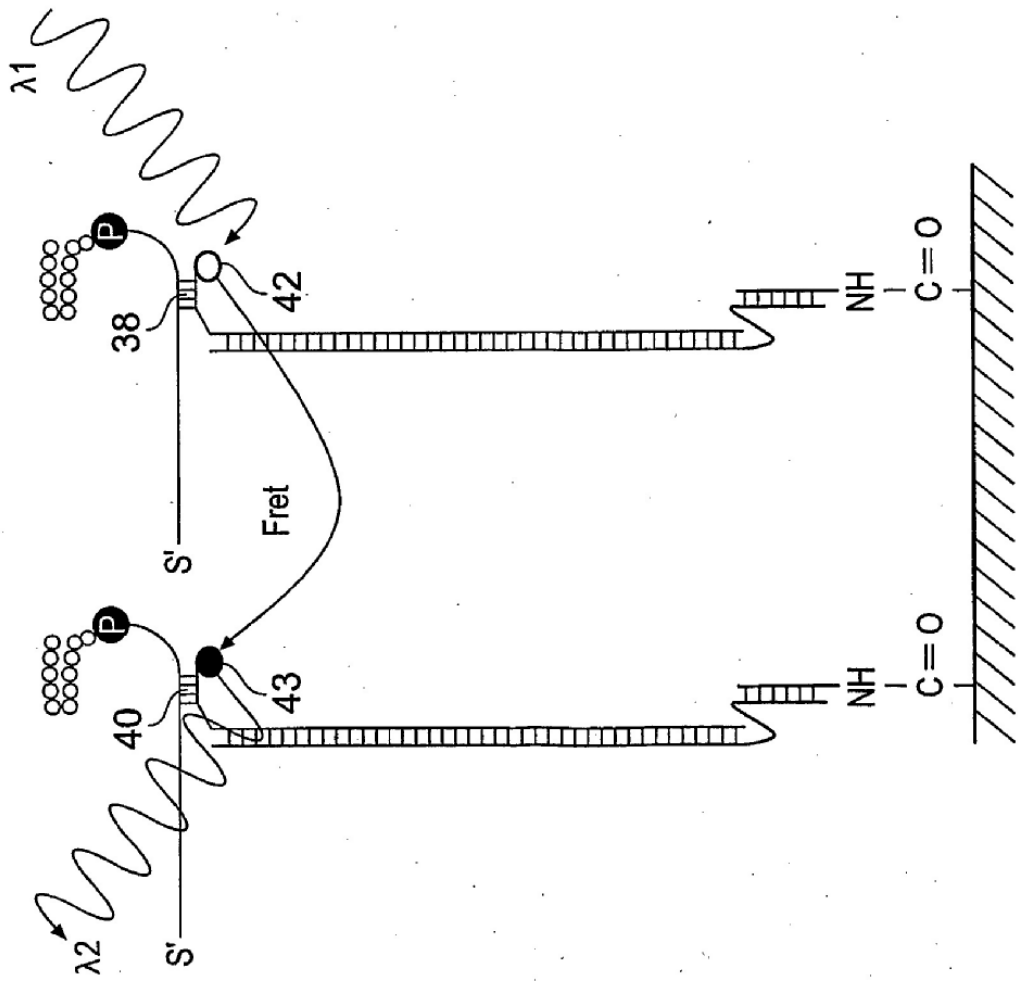
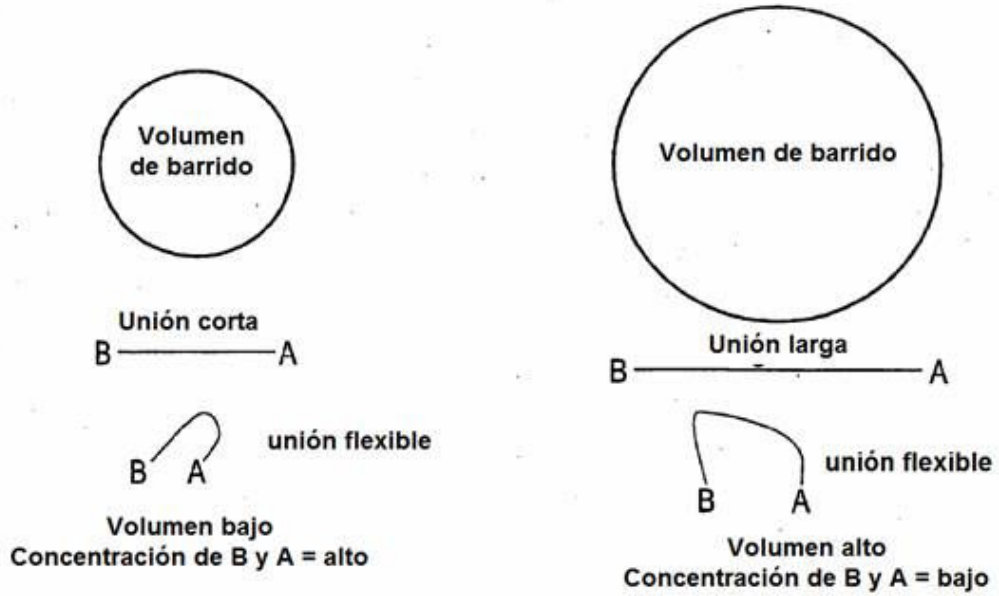


Fig. 10

A Variación de las concentraciones de A y B alterando la longitud de unión



B **Pares unidos ligados y libres**



C **Interacciones intermoleculares ligadas y libres**

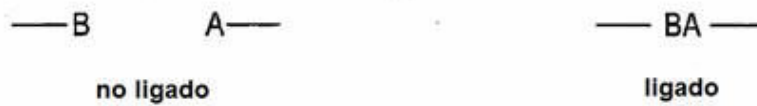


Fig. 12

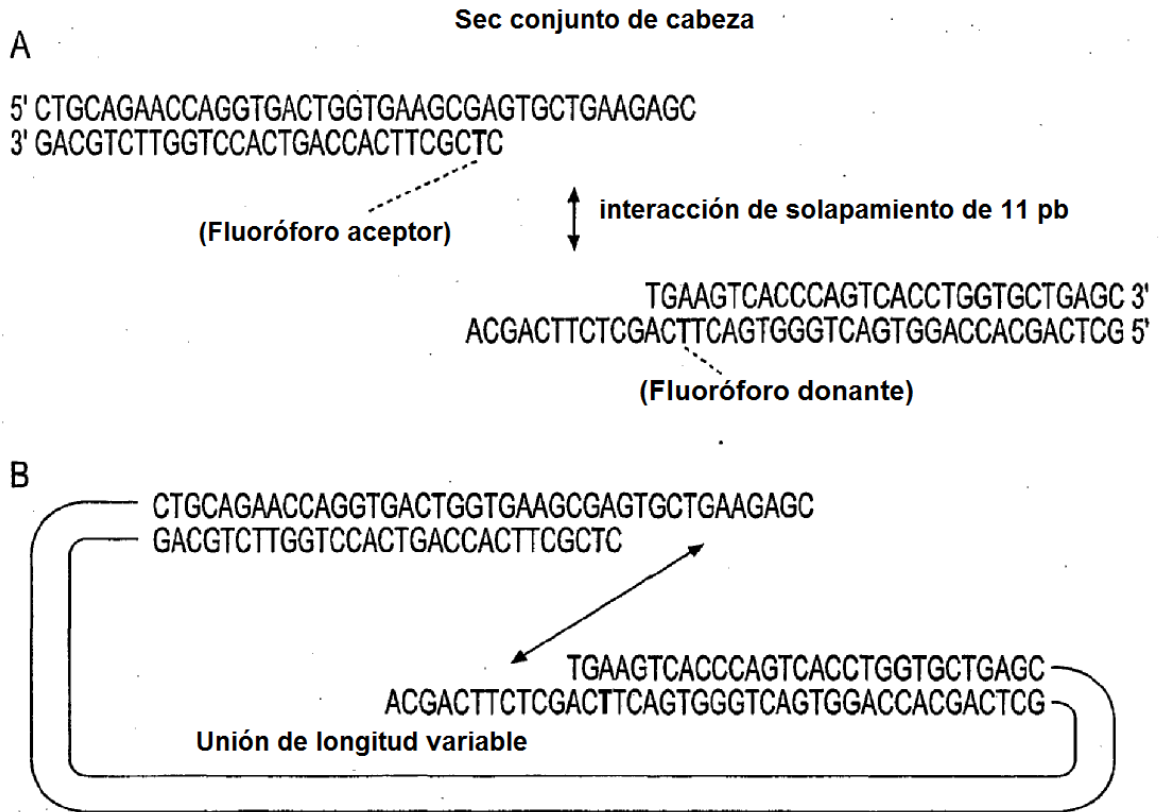


Fig. 13

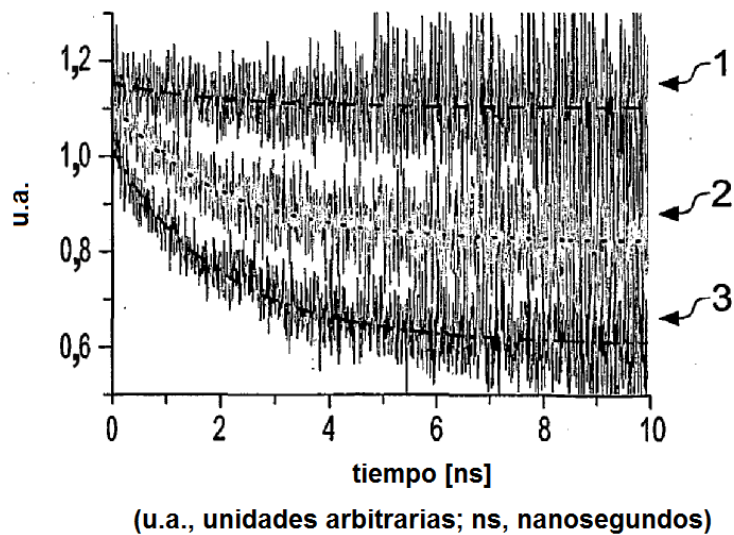


Fig. 14

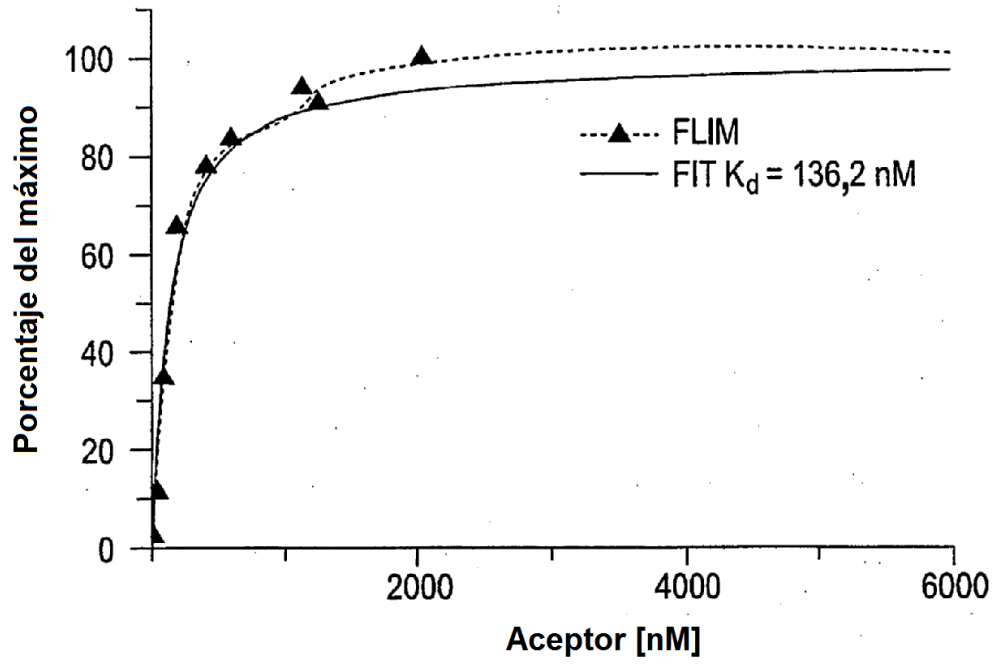


Fig. 15

Longitud p [pb]	$f=[AD]/D$	U	R	τ [ns]	$[A]_{TOT}$ [nM]	$[D]_{TOT}$ [nM]	$[A]$ [nM]
710	0,1181	0,8905	0,134	0,5569	778,15	778,15	686,25
515	0,2922	0,7299	0,413	0,6724	2039,0	2039,0	1443,2

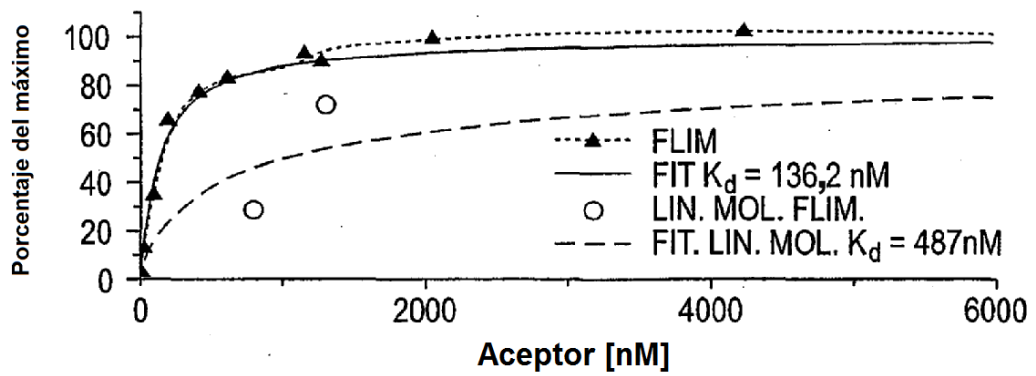


Fig. 16

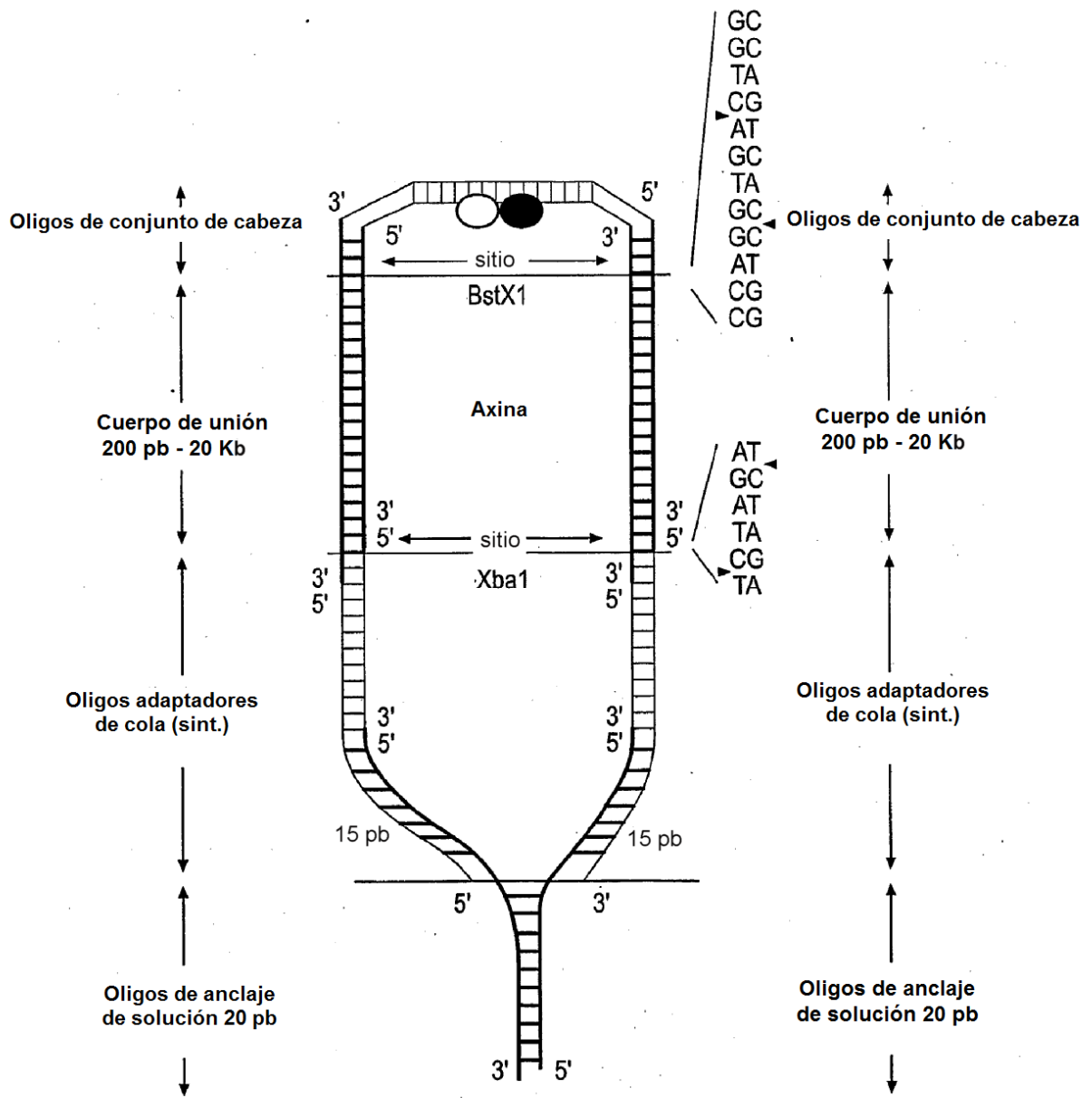


Fig. 17

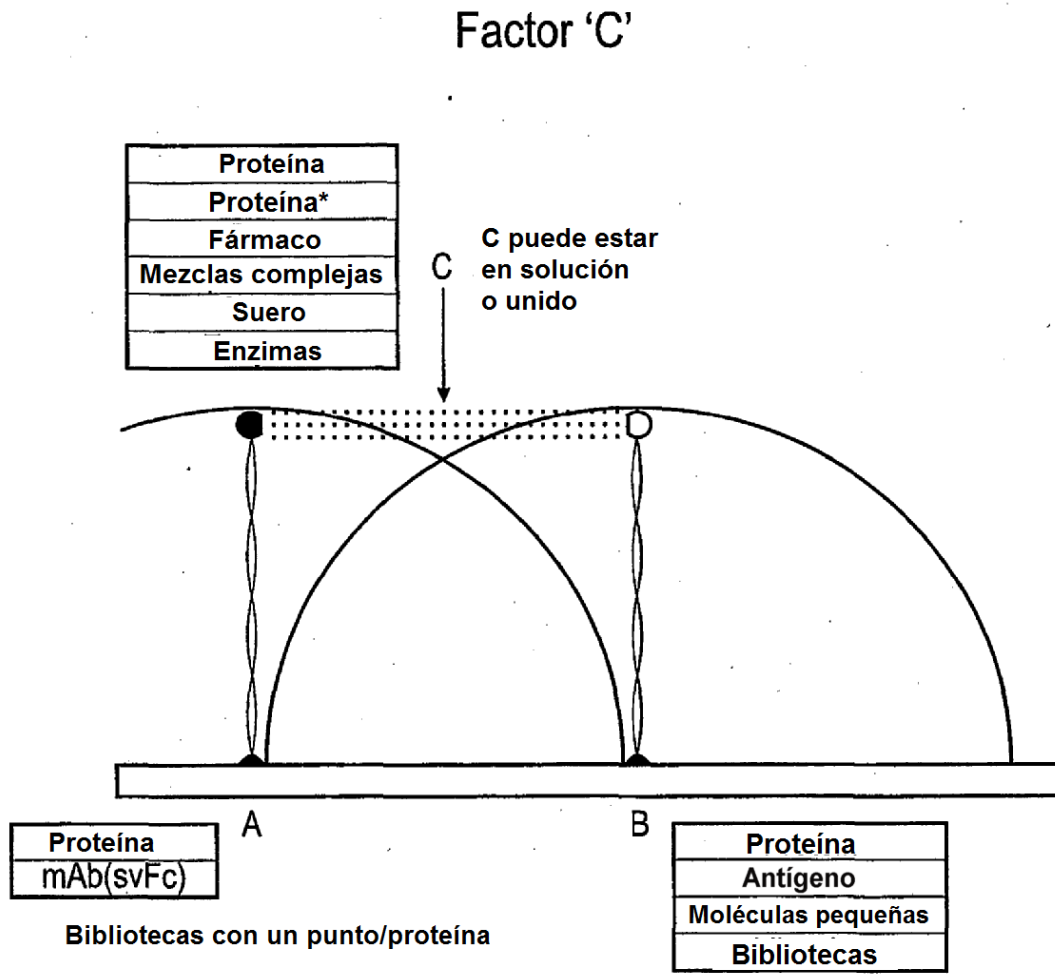


Fig. 18

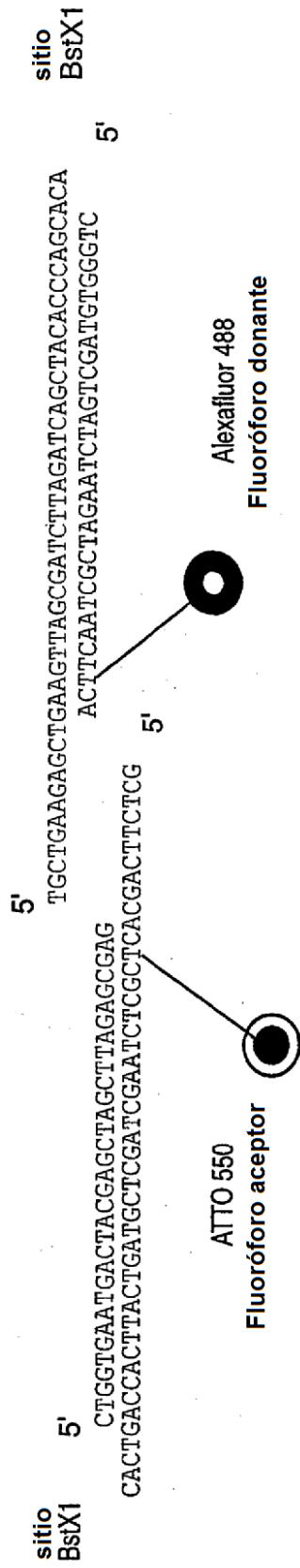


Fig. 19A

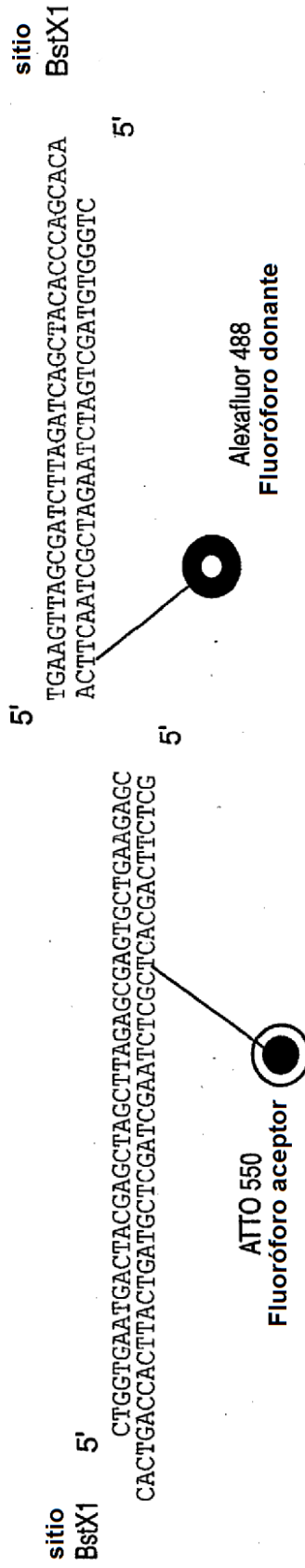


Fig. 19B

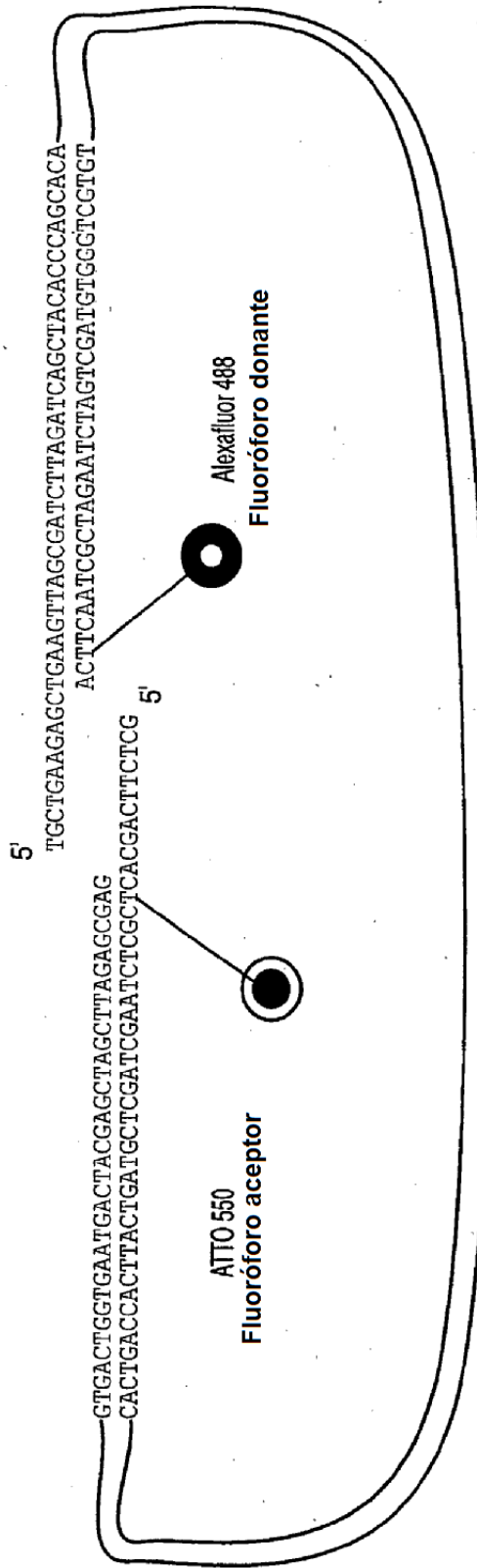


Fig. 19C

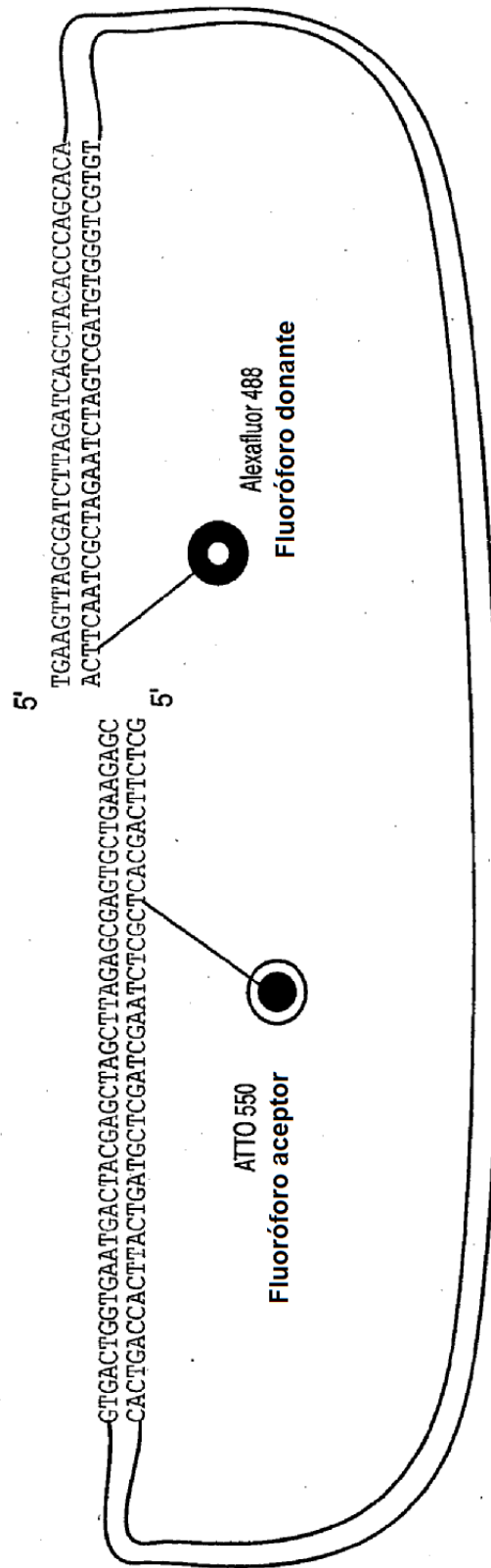


Fig. 19D

Producto ligado	286 pb			498 pb			692 pb		
Conjunto de cabeza	-	0 pb	11 pb	-	0 pb	11 pb	-	0 pb	11 pb
Longitud	205	286	286	417	498	498	611	692	692

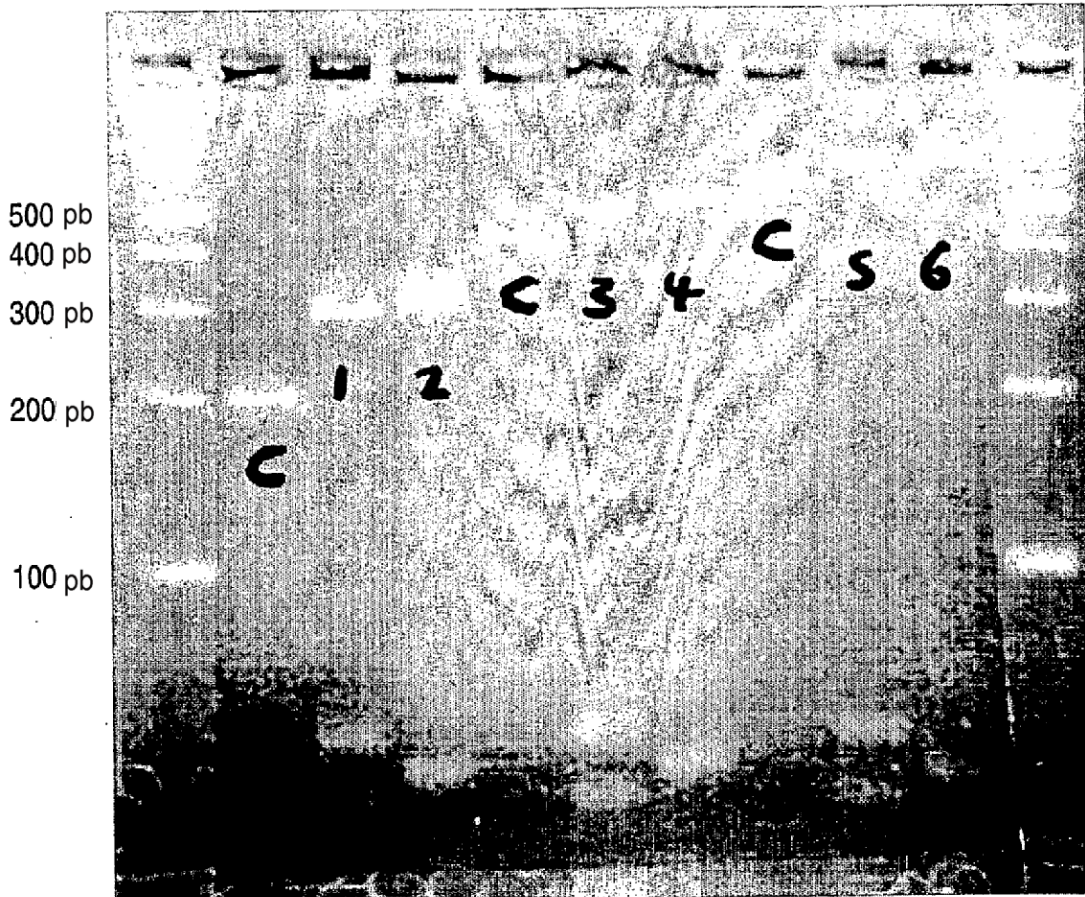


Fig. 20

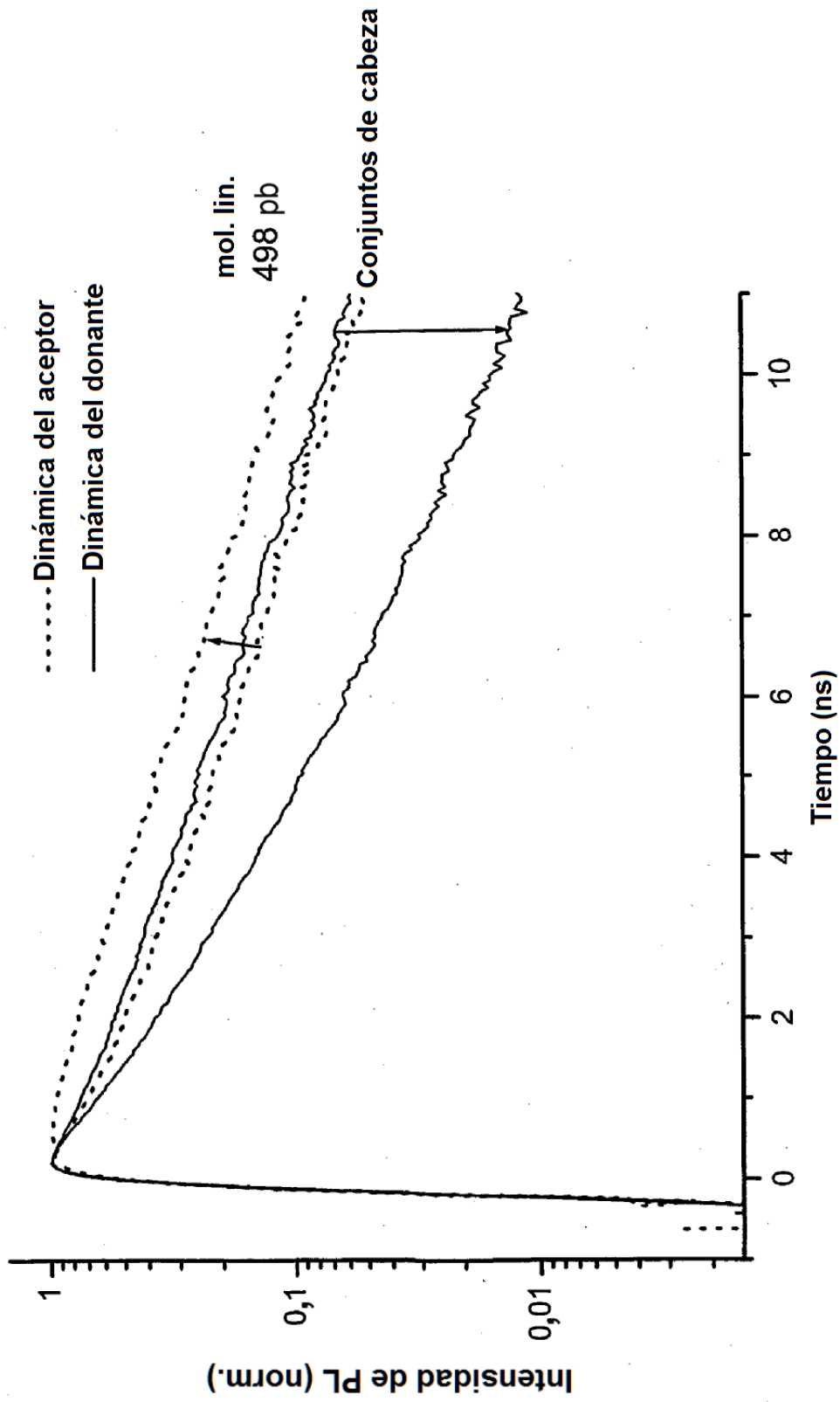


Fig. 21A

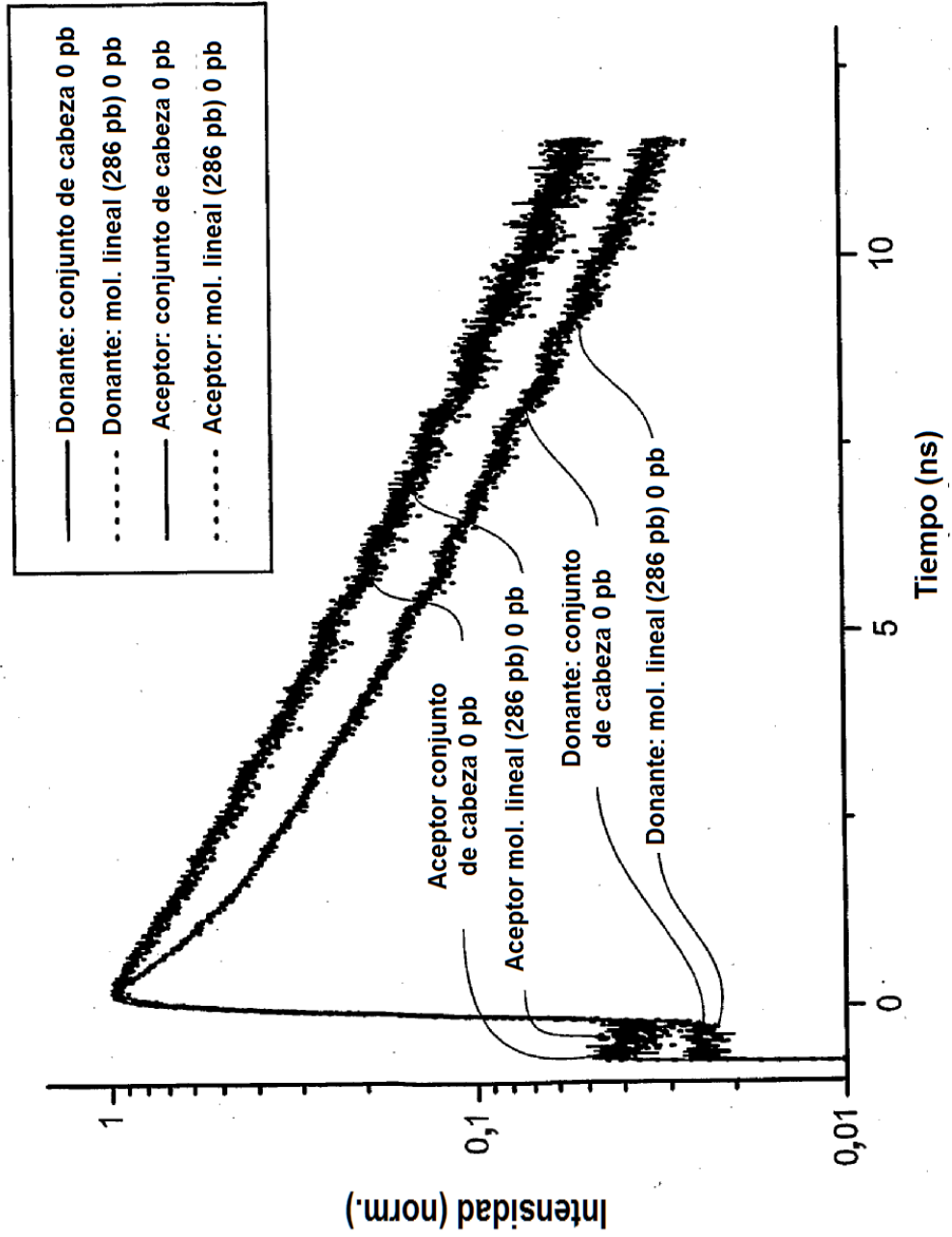


Fig. 21B

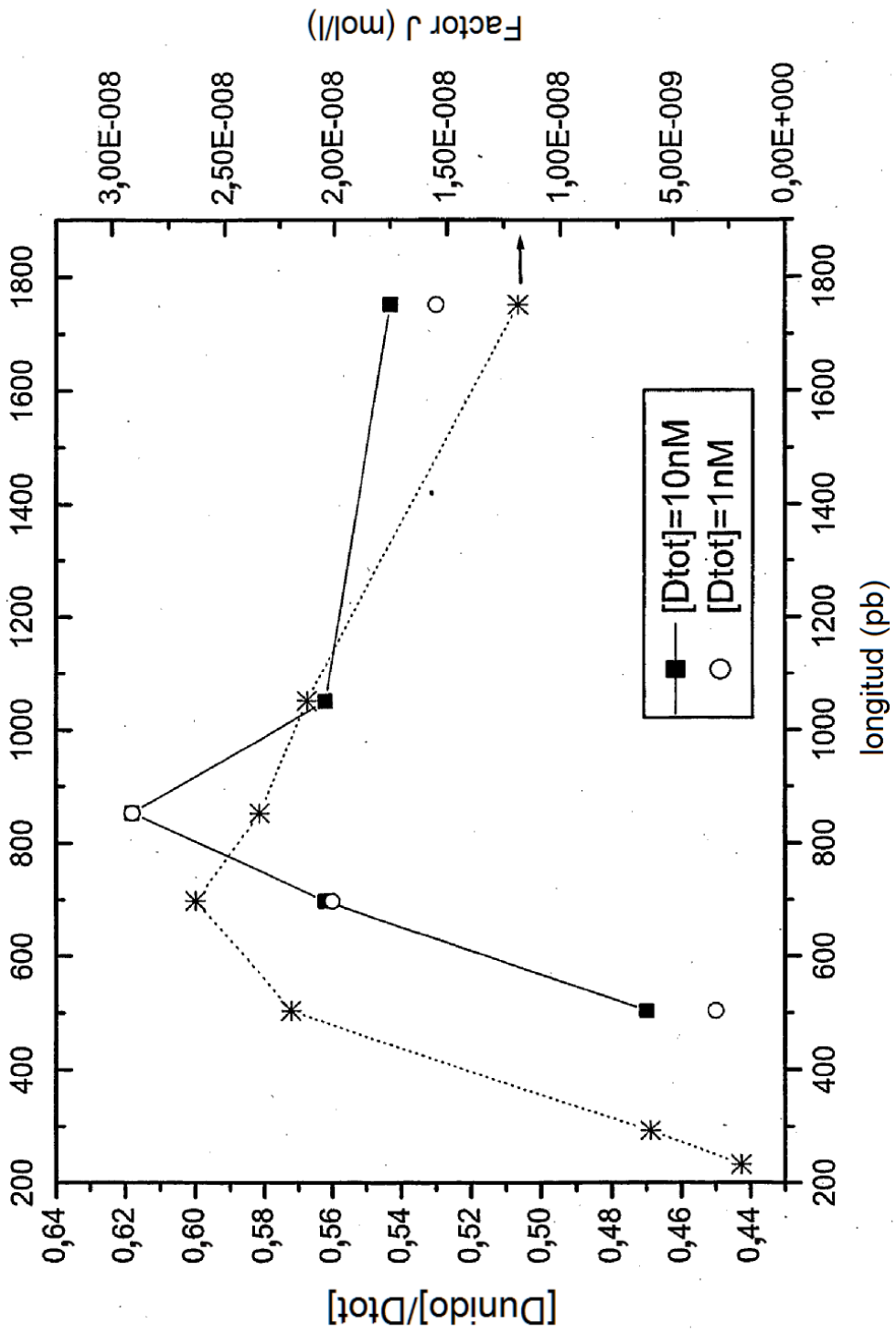


Fig. 22

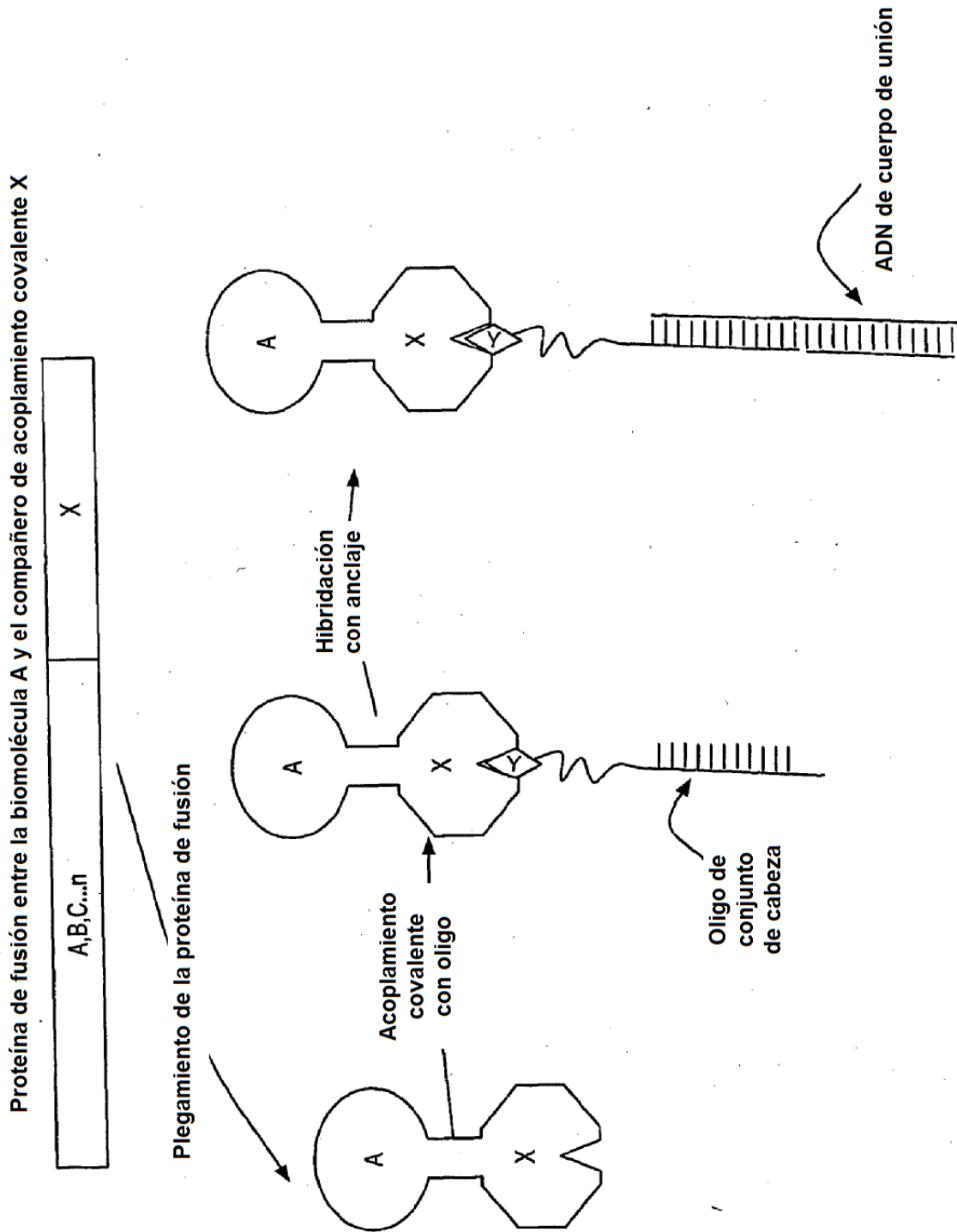


Fig. 23