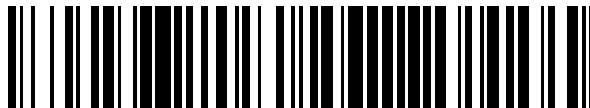


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 137**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009** **E 09785845 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2329039**

54 Título: **Estrategias y métodos de detección de ácidos nucleicos mediante biosensores**

30 Prioridad:

03.09.2008 US 94017 P

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**QUANTUMDX GROUP LIMITED (100.0%)
Lugano Building, 57 Melbourne Street
Newcastle upon Tyne, NE1 2JQ , GB**

72 Inventor/es:

O'HALLORAN, JONATHAN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 574 137 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

Estrategias y métodos de detección de ácidos nucleicos mediante biosensores

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 **[0001]** Las realizaciones de la presente invención se refieren, de manera general, a estrategias y métodos de detección de un analito que comprende secuencias de nucleótidos.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** En general, la detección y cuantificación de biomoléculas en muestras biológicas/clínicas puede resultar importante para la identificación y cuantificación de especies de moléculas biológicas que pueden estar vinculadas a enfermedades, de cara a un pronóstico, previsión y/o diagnóstico exactos, puesto que el tratamiento o la prevención que se elige aplicar, así como el desenlace de la enfermedad en el paciente depende, en parte, de ello. La elección de un protocolo de diagnóstico es importante para el diagnóstico, dado que los errores pueden conducir a un diagnóstico incorrecto y a que se emplee una estrategia de tratamiento/prevencción incorrecta. Además, en algunas enfermedades, 20 si se carece de pruebas empíricas que sustenten los diagnósticos tradicionales, basados en síntomas, la eficacia del diagnóstico puede verse limitada.

En W02003/091406 se describe un método para detectar un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana, y en dicho método se hace uso de una sonda generada mediante PCR, y del recorte enzimático del producto.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

[0003] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana, y dicho método comprende: amplificar la secuencia de nucleótidos diana y, 30 opcionalmente, al menos una secuencia de nucleótidos adicional, con uno o más cebadores que comprenden: una región 5' ancla configurada para hibridarse con una secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana y que es complementaria, al menos en parte, de dicha secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana; una región 3' de extensión configurada para hibridarse con una porción de la secuencia de nucleótidos diana; y una región "burbuja" situada entre ambas regiones, y dicha región burbuja no es 35 complementaria, o es únicamente parcialmente complementaria, de la secuencia de nucleótidos diana, y al menos parte de la región 5' ancla es escindida, tras amplificación, de una secuencia de nucleótidos amplificada, generándose así una sonda; opcionalmente, uno o más cebadores comprenden secuencias de nucleótidos que son escindidas por una nucleasa, y la mencionada sonda comprende parte de la secuencia de nucleótidos amplificada que queda tras la escisión de la mencionada al menos parte de la región 5' ancla; y el mencionado método comprende, además, poner en 40 contacto el analito con la sonda, en condiciones de hibridación, y detectar una señal asociada a la presencia, el nivel (cantidad) y/o variación en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana presente en el analito.

[0004] En algunas realizaciones, los analitos pueden comprender ADN, ARN, o derivados de los mismos y/o el cebador o los cebadores pueden comprender secuencias de nucleótidos que son escindidas por una nucleasa, y la 45 nucleasa puede ser una enzima de restricción de ADN y/o de ARN. En algunas otras realizaciones, las secuencias de nucleótidos escindidas por la nucleasa pueden estar presentes al menos en la región burbuja o al menos en la región 5' ancla (o en ambas), y en algunas de dichas realizaciones, las secuencias de nucleótidos escindidas por la nucleasa no están presentes ni en la región 3' ancla ni en la secuencia de nucleótidos diana. Además, en algunas otras realizaciones, la sonda comprende ADN, ARN, o derivados de los mismos, y a menudo puede ser inmovilizada en un 50 medio conductor. El medio conductor puede seleccionarse del grupo que comprende un nanoalambre, un nanotubo, un nanohuevo, un nanoporo, una nanopera y cualquier otra nanoestructura capaz de conducir una corriente eléctrica.

[0005] En algunos aspectos de la presente invención, la señal, detectada mediante el método que se acaba de describir, puede generarse cuando la hibridación del analito con la sonda ocasiona un cambio en la carga eléctrica de la 55 sonda. Con el método que se acaba de describir se pueden detectar variaciones en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana; además, con él, se pueden detectar dos o más de las siguientes circunstancias, simultáneamente: presencia de la secuencia de nucleótidos diana, nivel de la secuencia de nucleótidos diana, variación en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el método antedicho puede comprender, además, dos o más tipos de sondas, y cada uno de esos tipos de sondas comprende secuencias de nucleótidos distintas.

60 **[0006]** En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un cebador integrado por un oligonucleótido, en un método para la detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana conforme con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, y el cebador integrado por un oligonucleótido comprende: una 65 región 5' ancla, y la región 5' ancla se configura de manera que se hibrida con una secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana y es complementaria, al menos en parte, de dicha secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana; una región 3' de extensión, y la región 3' de extensión se configura

de manera que se hibrida con una porción de la secuencia de nucleótidos diana; y una región burbuja situada entre la región 5' ancla y la región 3' de extensión, y la región 5' ancla o la región burbuja, o ambas, comprenden una secuencia de escisión por una nucleasa.

5 **[0007]** En un ejemplo, el cebador integrado por un oligonucleótido comprende la región 5' ancla, que tiene de unos 15 a 30 pares de bases (pb) y que es complementaria, en un 70% (aproximadamente) - 100%, de la secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana; la región 3' de extensión tiene de unos 5 a 30 pb y es complementaria, en un 80% (aproximadamente) - 100%, de una porción de la secuencia de nucleótidos diana; y se optimiza la temperatura de fusión de la región 3' de extensión hibridada con la porción de la secuencia de nucleótidos diana, de manera tal que la región 3' de extensión sólo puede hibridarse con la porción de la secuencia de nucleótidos diana en condiciones selectivas cuando la región 5' ancla se hibrida con la secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana; y la región burbuja es complementaria, en un 50% (aproximadamente) o menos, de la secuencia de nucleótidos diana, y comprende una secuencia de escisión por una nucleasa.

15 **[0008]** En realizaciones preferidas, los cebadores integrados por oligonucleótidos facilitan la multiplexación por PCR en una sola reacción y la amplificación homogénea de amplicones cortos.

[0009] Con arreglo a un aspecto de la presente invención, el método antedicho de detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana, puede comprender: obtener el analito; poner en contacto el analito con una sonda, que se inmoviliza en un medio conductor, en condiciones de hibridación, y dicha sonda es al menos parcialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos diana, de manera que la sonda se hibrida con la secuencia de nucleótidos diana, generándose así un dúplex integrado por la secuencia de nucleótidos diana y la sonda; retirar las secuencias de nucleótidos de una sola cadena que no están presentes en el dúplex; y detectar una señal asociada a la presencia, al nivel y/o a la variación en la secuencia de la secuencia diana.

25 **[0010]** Con arreglo a otro aspecto de la presente invención, el método antedicho de detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana, puede comprender: obtener el analito que comprende la secuencia de nucleótidos diana; poner en contacto el analito con un oligonucleótido, y dicho oligonucleótido se hibrida con la secuencia de nucleótidos diana, generándose así un dúplex integrado por la secuencia de nucleótidos diana y el oligonucleótido; retirar las secuencias de nucleótidos de una sola cadena que no están presentes en el dúplex; obtener la secuencia de nucleótidos diana del dúplex; poner en contacto la secuencia de nucleótidos diana así obtenida con una sonda, que se inmoviliza en un medio conductor, en condiciones de hibridación, y dicha sonda es al menos parcialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos diana, de manera que la sonda se hibrida con la secuencia de nucleótidos diana, generándose así un dúplex integrado por la secuencia de nucleótidos diana y la sonda; y detectar una señal asociada a la presencia, al nivel y/o a la variación en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana.

[0011] El analito que se detecta en cualquiera de los métodos precedentes puede obtenerse mediante uno de los siguientes métodos: amplificar el analito que comprende la secuencia de nucleótidos diana, con uno o más cebadores que comprenden secuencias de nucleótidos correspondientes a parte de la secuencia de nucleótidos diana; obtener secuencias de nucleótidos de un organismo y cortar dichas secuencias de nucleótidos hasta un tamaño adecuado para el contacto con la sonda; y obtener secuencias de nucleótidos de un organismo y escindir dichas secuencias de nucleótidos, mediante una o más nucleasas, hasta un tamaño adecuado para el contacto con la sonda.

45 **[0012]** En algunos de los métodos precedentes para la detección de un analito, en los que se pueden escindir secuencias de nucleótidos de una sola cadena, para tal escisión de las secuencias de nucleótidos de una sola cadena se pueden usar una o más nucleasas. En algunos casos, la nucleasa o nucleasas comprenden nucleasas específicas de secuencia y/o nucleasas no específicas de secuencia. En algunos otros casos, la nucleasa o nucleasas pueden seleccionarse de entre la nucleasa S1, nucleasa P1, nucleasa microcócica, nucleasa de judía mungo, exonucleasa, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, y fragmento de Klenow.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[0013]

55 La Figura 1 proporciona una realización ilustrativa de un novedoso diseño de sondas.

La Figura 2 proporciona una realización ilustrativa del procesado de ácidos nucleicos con la nucleasa S1.

La Figura 3 es una realización ilustrativa de un diseño experimental de una reacción de detección múltiplex.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

65 **[0014]** Hay diversos métodos y protocolos para la detección y la cuantificación de compuestos y moléculas biológicos; entre ellos figuran los siguientes: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), microarrays, electroforesis, cultivo celular, etc. Cada método puede resultar adecuado para una especie de molécula biológica concreta y mostrar una diversidad de sensibilidades diferentes. Los biosensores detectores sensibles, como los basados en nanoalambres,

nanotubos de carbono, nanoporos, nanoperlas, nanohuecos, etc., suelen precisar de estrategias de biología molecular nuevas que faciliten la detección mediante métodos de detección sensibles que puedan ser capaces de detectar moléculas a concentraciones molares pequeñas (del orden de fM e inferiores), o incluso, a nivel de una sola molécula (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N° 7129554, 7256466, 7385267, y la solicitud de patente estadounidense N° 12/038794).

Nanoestructuras

[0015] Tal y como se usa en diversas realizaciones, un nanoalambre es un semiconductor elongado a nanoescala que, en cualquier punto a lo largo de su longitud, tiene al menos una dimensión transversal y, en algunas realizaciones, dos dimensiones transversales ortogonales, inferiores a 500 nanómetros, preferiblemente inferiores a 200 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 150 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 100 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 70 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 50 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 20 nanómetros, más preferiblemente inferiores a 10 nanómetros, e incluso inferiores a 5 nanómetros. En otras realizaciones, la dimensión transversal puede ser inferior 2 nanómetros o a 1 nanómetro. En un conjunto de realizaciones, el nanoalambre tiene al menos una dimensión transversal que oscila entre 0,5 nanómetros y 200 nanómetros. En los casos en los que se describe que los nanoalambres tienen un núcleo y una región externa, las dimensiones que se acaban de mencionar se refieren a las del núcleo. La sección transversal del semiconductor elongado puede tener una forma arbitraria como, por ejemplo, circular, cuadrangular, rectangular, elíptica o tubular. Puede tener forma regular o irregular. Más adelante, se proporciona una lista, no limitadora, de ejemplos de materiales de los que pueden estar hechos los nanoalambres de la invención.

[0016] Los nanotubos son una clase de nanoalambres que pueden resultar útiles en la invención, y los dispositivos en los que el método de la invención puede ser llevado a cabo comprenden alambres a una escala proporcional a los nanotubos. Tal y como se usa en la presente invención, un “nanotubo” es un nanoalambre que tiene un núcleo hueco, e incluye los nanotubos conocidos por los expertos en la materia. Un “nanoalambre no-nanotubo” es cualquier nanoalambre que no sea un nanotubo. En un conjunto de realizaciones de la invención, un nanoalambre no-nanotubo que tiene una superficie no modificada (no incluida una entidad de reacción auxiliar no inherente en el nanotubo en el entorno en el que se coloca) se usa en cualquier disposición de la invención aquí descrita en la que se puede usar un nanoalambre o un nanotubo. Un “alambre” se refiere a cualquier material que tenga una conductividad que sea, al menos, la de un semiconductor o la de un metal. Por ejemplo, el término “eléctricamente conductor” o “conductor” o “conductor eléctrico”, cuando se usa en referencia a un alambre “conductor” o a un nanoalambre, se refiere a la capacidad, de ese alambre, de hacer pasar carga a través de sí mismo. Los materiales eléctricamente conductores preferidos tienen una resistividad inferior a unos 10^{-3} , más preferiblemente inferior a unos 10^{-4} y, en el caso más preferible, inferior a unos 10^{-6} o 10^{-7} ohmios-metro.

[0017] Por lo general, un nanoporo tiene uno o más orificios pequeños en una membrana eléctricamente aislante que se puede usar como detector de una sola molécula. En algunos casos, puede ser un canal proteínico biológico en una bicapa lipídica de alta resistencia eléctrica o un poro en una membrana de estado sólido. Por lo general, el nanoporo es una estructura esférica con un tamaño de nivel nanoescala, que presenta uno o más poros. Conforme a algunos aspectos, un nanoporo está hecho de carbono o de algún material conductor.

[0018] Por lo general, una nanoperla es una estructura esférica con un tamaño de nivel nanoescala. Por lo general, la forma de la nanoperla es esférica, aunque también puede ser circular, cuadrada, rectangular, elíptica o tubular. Puede tener forma regular o irregular. En algunos ejemplos, la nanoperla puede tener un poro en su interior.

[0019] Por lo general, el nanohueco se usa en un biosensor que comprende una separación entre dos contactos, de una magnitud nanométrica. Detecta cuándo una molécula diana, o una serie de moléculas diana, se hibridan o unen entre los dos contactos, lo que permite la transmisión de una señal eléctrica entre las moléculas.

[0020] Las nanoestructuras precedentes, a saber, nanoalambre, nanotubo, nanoporo, nanoperla y nanohueco, se describen a fin de proporcionar una ilustración, comprensible al instante, de algunas realizaciones, y no se debe considerar que limiten el ámbito de la presente invención. Se debe considerar que, además de los ejemplos precedentes, está incluida en el ámbito de la presente invención toda nanoestructura que tenga un tamaño de nivel nanoescala y que resulte adecuada para ser aplicada en métodos de detección de ácidos nucleicos tales como los que se describen en la solicitud.

[0021] En general, las estrategias de detección para uso con nanoestructuras o nanosensores cuya finalidad es detectar moléculas y compuestos comprenden detectar cambios en la carga en las superficies de dichas nanoestructuras o nanosensores o cerca de sus superficies, o dentro (a través) de un nanohueco o nanoporo, que ocasionen un cambio en sus propiedades que se puede medir (por ejemplo, mediante transistores de efecto campo, nanohuecos, o nanosensores piezoeléctricos), a fin de detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana (ADN, ARN, cADN, etc.).

[0022] Preferiblemente, el nanoalambre o los nanoalambres forman parte de un sistema construido y dispuesto para determinar un analito en una muestra a la que es expuesto el nanoalambre o son expuestos los nanoalambres.

“Determinar”, en este contexto, significa determinar la cantidad y/o la presencia del analito en la muestra. La presencia del analito puede determinarse determinando un cambio en una característica del nanoalambre; habitualmente, una característica eléctrica o una característica óptica. Por ejemplo, un analito ocasiona un cambio detectable en la conductividad eléctrica del nanoalambre, o en las propiedades ópticas. En una realización, el nanoalambre incluye, inherentemente, la capacidad de determinar el analito. Se puede dotar al nanoalambre de funcionalidad, es decir, que puede comprender fracciones funcionales de superficie, a las que el analito se une e induce un cambio, medible, en una propiedad del nanoalambre. Los eventos de unión pueden ser específicos o inespecíficos. Las fracciones funcionales pueden incluir grupos simples, seleccionados de entre los grupos que incluyen, entre otros, --OH, --CHO, --COOH, --SO₃H, --CN, --NH₂, --SH, --COSH, COOR, haluro; entidades biomoleculares, incluidas, entre otras, aminoácidos, proteínas, azúcares, ADN, anticuerpos, antígenos, enzimas; cadenas poliméricas injertadas, con longitudes de cadena inferiores al diámetro del núcleo del nanoalambre, seleccionadas de un grupo de polímeros que incluye, entre otros, poliamida, poliéster, poliimida, poliacrilato; un recubrimiento fino que cubre la superficie del núcleo del nanoalambre, incluidos, entre otros, los siguientes grupos de materiales: metales, semiconductores y aislantes, que pueden ser un elemento metálico, un óxido, un sulfuro, un nitruro, un seleniuro, un polímero y un gel polimérico.

Una entidad de reacción con la que el analito interacciona puede situarse, respecto del nanoalambre, de modo tal que puede determinarse el analito determinando un cambio en una característica del nanoalambre.

Transistor de efecto campo (FET, por sus siglas en inglés)

[0023] En general, el efecto campo se refiere a un efecto observable experimentalmente, simbolizado por “F” (en las velocidades de reacción, etc.), de la interacción coulombica intramolecular entre el centro de interés y un unipolo o dipolo remoto (distante), mediante acción directa a través del espacio, en vez a través de uniones. La magnitud del efecto campo (o “efecto directo”) puede depender de la carga unipolar/del momento dipolar, de la orientación del dipolo, de la distancia más corta entre el centro de interés y el unipolo o dipolo remoto, y de la constante dieléctrica efectiva. Esto se explota en los transistores que se usan en los ordenadores y, más recientemente, en los transistores de efecto campo para ADN, usados como nanosensores.

[0024] Por lo general, un transistor de efecto campo (FET) es un transistor de efecto campo que puede hacer uso del efecto campo en virtud de cambios parciales realizadas en las biomoléculas para que funcionen como biosensores. La estructura de los FETs puede ser similar a la de los transistores de efecto campo con semiconductor de óxido metálico (MOSFETs), con la excepción de la estructura de la compuerta que, en los FETs con biosensor, puede ser sustituida por una capa de moléculas sonda inmovilizadas que actúan de receptores de superficie. Cuando las biomoléculas diana se hibridan con o unen a dichos receptores, la distribución de la carga cerca de la superficie cambia, lo que a su vez modula el transporte de corriente a través del transductor semiconductor (por ejemplo, un nanoalambre).

Materiales biológicos

[0025] Por lo general, el término muestra, o muestra biológica, se refiere a cualquier célula, tejido o líquido procedente de una fuente biológica (una “muestra biológica”), o de cualquier otro medio, biológico o no biológico, que pueda ser evaluado de conformidad con la invención; por ejemplo, suero o agua. Una muestra incluye, entre otras posibilidades, una muestra biológica extraída de un organismo (por ejemplo, un ser humano, un mamífero no humano, un invertebrado, una planta, un hongo, un alga, una bacteria, un virus, etc.), una muestra extraída de alimentos destinados a consumo humano, una muestra extraída de alimentos destinados a consumo animal, como pienso para ganado, leche, una muestra de una donación de órganos, una muestra de sangre destinada a usarse como fuente de sangre, una muestra tomada de un suministro de agua, y similares. Un ejemplo de una muestra es una muestra extraída de un ser humano o de un animal con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos concreta.

[0026] Los términos ácido nucleico u oligonucleótido, o los equivalentes gramaticales que se usan en la presente invención, se refieren a al menos dos nucleótidos unidos por enlaces covalentes. Un ácido nucleico de la presente invención es, preferiblemente, de cadena simple o de cadena doble y, por lo general, contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se describe más adelante, el concepto incluye también a los análogos de ácidos nucleicos, que pueden tener esqueletos alternativos que comprendan, por ejemplo, fosforamida (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925 y las referencias allí incluidas; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; y Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26:1419), fosfotioato (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y patente estadounidense N° 5.644.048), fosfoditioato (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), uniones O-metilfosfoamidito (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), así como esqueletos y uniones péptido-ácido nucleico (véase Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365:566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen esqueletos positivos (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097), esqueletos no iónicos (patentes estadounidenses N° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; y capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994),

Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395; Jeffs *et al.* (1994) J. Biomolecular NMR 34:17; Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y esqueletos no ribósicos, incluidos los descritos en las patentes estadounidenses N° 5.235.033 y 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. Dentro de la definición de “ácidos nucleicos” están también incluidos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (véase Jenkins *et al.* (1995), Chem. Soc. Rev. páginas 169-176). En Rawls, C & E News, 2 de junio de 1997, página 35, se describen varios análogos de ácidos nucleicos. Estas modificaciones al esqueleto de ribosas-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de fracciones adicionales tales como marcadores, o con la finalidad de aumentar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

10 Estrategias de detección

[0027] En un aspecto de la invención, un material biológico configurado para unirse a una nanoestructura es un ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN y derivados del ADN y del ARN. En una realización, el material biológico es ADN. Cuando se une ADN a la nanoestructura, el número de nucleótidos puede oscilar entre 5 bases y 100 bases. En algunas realizaciones, el número de nucleótidos del ADN puede ser 7 bases, 10 bases, 15 bases, 20 bases, 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40 bases, 45 bases, 50 bases, 60 bases, 70 bases, 80 bases, 90 bases y 100 bases. En algunas otras realizaciones, pueden unirse a la nanoestructura ácidos ribonucleicos y derivados de ácidos nucleicos. Y en algunas otras realizaciones, se pueden usar simultáneamente ADN, ARN y derivados del ADN y del ARN. Por lo tanto, en un ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de ADN; en otro ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de ARN; y en otro ejemplo, se pueden unir a la nanoestructura derivados de ácidos nucleicos, tales como un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un péptido-nucleótido, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un glicol-nucleótido, y un treosa-nucleótido, cualesquiera nucleótidos sintéticos, cualquier isoforma de los mismos y cualquier derivado de los mismos. En algunos otros ejemplos, se pueden unir a la nanoestructura secuencias de nucleótidos que comprendan ADN y ARN, ADN y derivados de ácidos nucleicos, ARN y derivados, y ADN, ARN y derivados.

[0028] En otro aspecto de la invención, una nanoestructura es conductora y es capaz de detectar la carga eléctrica en su superficie, en sus cercanías, en sus tubos internos y/o en los poros que tiene dentro. Uno de los aspectos más importantes de cualquier dispositivo diagnóstico es su capacidad para realizar una detección exacta de las biomoléculas, estando su eficacia determinada por lo bien que detecta de manera específica (es decir, un porcentaje bajo de falsos positivos) y sensible (es decir, un porcentaje bajo de falsos negativos). Los nanosensores que pueden detectar cambios en la carga en sus superficies o cerca de éstas, o dentro de un nanohuevo o nanoporo, que ocasionan un cambio en sus propiedades que se puede medir gracias, al menos en parte, a la unión de la molécula diana a una sonda inmovilizada en o cerca de las nanoestructuras, proporcionan un método de detección ultra-sensible, con o sin el uso, limitado, de marcadores (que son compuestos químicos costosos que se pueden unir a la biomolécula o molécula de interés para hacer posible que los dispositivos detectores las “detecte”).

[0029] En general, la presente invención se refiere a protocolos de biología molecular y a estrategias de detección para uso con nanosensores que pueden detectar moléculas y compuestos mediante la detección de cambios en la carga en las superficies de dichos nanosensores o cerca de sus superficies, o a través de un nanohuevo o nanoporo, cambios que ocasionan un cambio en sus propiedades que se puede medir (por ejemplo, mediante transistores de efecto campo, nanohuecos, o nanosensores o nanoestructuras piezoeléctricos), a fin de detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana (ADN, ARN, cADN, etc). Para que estos biosensores puedan llevar a cabo su función básica, puede ser necesario que una sonda que sea un polímero de nucleótidos (o un polímero de nucleótidos sintéticos, tales como PNA, morfolinos, etc) sea inmovilizada en las nanoestructuras o cerca de ellas, y que la acumulación de moléculas diana que se unen a la sonda pueda ocasionar un aumento en la densidad de carga en la superficie de las nanoestructuras o nanosensores, o cerca de dicha superficie, a causa de la carga de la sonda. Por ejemplo, un fragmento amplificado por PCR, que se une a una sonda (con una secuencia complementaria inversa a la del polímero de nucleótidos diana), inmovilizado en un nanoalambre, puede ocasionar un cambio medible en la conductancia (ΔG), a causa del aumento de carga negativa en la superficie del nanoalambre o cerca de dicha superficie, debido a un fenómeno denominado “efecto campo”.

[0030] Dichos nanosensores pueden brindar la posibilidad de detectar biomoléculas de manera sensible y dinámica, aunque la sensibilidad puede acarrear una serie de problemas. Por ejemplo, las fluctuaciones naturales de la carga en la superficie, dentro de la matriz de muestras, puede provocar interferencias, en parte a causa de las secuencias flanqueadoras de las moléculas de polímeros de nucleótidos diana (es decir, las secuencias sobresalientes que no se unen a las sondas). Además, si en un conjunto de nanosensores se están detectando muchas moléculas diana al mismo tiempo, sería beneficioso estandarizar el tamaño y, por ende, la masa de carga, de cada una de dichas moléculas, para posibilitar comparaciones más rigurosas y el control de la calidad. Asimismo, disponer de un tamaño estándar para todas las moléculas diana permite estandarizar las condiciones de hibridación de la sonda en el diseño de los estudios con conjuntos.

[0031] Algunos aspectos de los protocolos biológicos que se presentan en esta solicitud pueden mejorar los nanosensores, de manera que proporcionen detección sensible y específica, y asimismo describen metodologías en las que los ácidos nucleicos diana pueden ser procesados enzimáticamente para que se escindan secuencias flanqueadoras (definidas como secuencias que no pueden unirse a las sondas de detección), o amplificados usando

cebadores novedosos que pueden posibilitar la amplificación homogénea y específica de fragmentos cortos, y dichos cebadores pueden contener sitios para enzimas de restricción a fin de que retiren la mayoría de los cebadores de los amplicones, para asegurar un corte preciso, así como señales reproducibles para detección y cuantificación, dado que las moléculas diana pueden tener un tamaño uniforme y que es posible que no tengan secuencias flanqueadoras, o que éstas sean cortas.

[0032] Por su propia definición, las secuencias flanqueadoras de las moléculas poliméricas de nucleótidos diana hibridadas pueden estar muy cerca de las nanoestructuras o nanosensores y, por lo tanto, pueden ocasionar un efecto medible que podría sobrecargar la señal procedente de la hibridación. Además, dichas secuencias flanqueadoras pueden aumentar el riesgo de hibridación no específica, de formación de dímeros y de impedimento estérico en las nanoestructuras o cerca de éstas, lo que también podría afectar a la señal de la nanoestructura. Retirando las secuencias flanqueadoras largas, las nanoestructuras conglomeradas pueden situarse más cercanas entre sí, lo que aumenta de manera efectiva la densidad de los elementos de los conglomerados; además, de este modo se estandarizan las condiciones de los ensayos de hibridación, la señal procedente de todas las dianas es la misma, y se eliminan las señales de fondo procedentes de las secuencias flanqueadoras retiradas.

[0033] Las realizaciones que aquí se presentan proporcionan tanto métodos para la retirada de las secuencias flanqueadoras, como las ventajas que ello aporta a la detección de biomoléculas usando nanosensores capaces de detectar cambios en la carga en las superficies de dichos nanosensores o cerca de sus superficies, o a través de un nanohueco o nanoporo, que pueden ocasionar un cambio medible en sus propiedades, en virtud de la unión de la molécula diana a una sonda inmovilizada en o cerca de las nanoestructuras o nanosensores.

[0034] Por lo general, un biosensor es un dispositivo de análisis capaz de convertir eventos moleculares en señales eléctricas. En general, las nanoestructuras utilizadas en un biosensor se usan para detectar componentes de interés como, por ejemplo, ácidos nucleicos. Por lo general, los biosensores pueden funcionar en una fase líquida o gaseosa, lo que abre un enorme abanico de aplicaciones; por ejemplo, dispositivos integrados y aplicaciones derivadas. Por lo tanto, se pueden fabricar biosensores de manera barata y que sean portátiles y que, opcionalmente, se usen como dispositivos implantables de detección y seguimiento. Otra alternativa comprende combinar el biosensor con otro aparato de alta resolución (por ejemplo, un espectroscopio de masas) y proporcionar información adicional, como la detección de la presencia, la abundancia y/o la variación estructural de las biomoléculas diana.

[0035] Puede usarse, en el método de la invención, un elemento detector de un biosensor, que puede ser un elemento detector electrónico, y un nanoalambre capaz de detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra (por ejemplo, una muestra de líquido) que contiene el analito o que se sospecha que lo contiene. Los sensores a nanoescala se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones químicas para detectar el pH o la presencia de iones metálicos; en aplicaciones biológicas para detectar una proteína, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, etc.), un azúcar o hidrato de carbono, y/o iones metálicos; y en aplicaciones medioambientales para detectar el pH, iones metálicos u otros analitos de interés.

[0036] Puede usarse, en el método de la invención, un artículo de un biosensor que comprende una región de exposición de muestras y un nanoalambre capaz de detectar la presencia o ausencia de un analito. La región de exposición de muestras puede ser cualquier región que esté muy cerca del nanoalambre; y una muestra en la región de exposición de muestras accede al menos a una porción del nanoalambre. Los siguientes son ejemplos de dichas regiones de exposición de muestras, entre otros posibles: un pocillo, un canal, un microcanal, un gel. En realizaciones preferidas, la región de exposición de muestras presenta una muestra próxima al nanoalambre, o puede dirigir a una muestra hacia el nanoalambre, para la determinación de un analito en dicha muestra. Puede situarse el nanoalambre adyacente a la región de exposición de muestras o dentro de ésta. Otra posibilidad es que el nanoalambre sea una sonda que se inserte en un líquido o en la trayectoria de flujo de un líquido. Además, la sonda nanoalámbrica puede comprender una microaguja y la región de exposición de muestras puede ser accesible por una muestra biológica. En tal disposición, un dispositivo que se construye y dispone para la inserción de una sonda con microaguja en una muestra biológica incluirá una región que circunde a la microaguja y que define la región de exposición de muestras, y una muestra en la región de exposición de muestras es accesible por el nanoalambre y viceversa. Se pueden crear canales de flujo de líquidos a un tamaño y una escala que sean beneficiosos para el uso en la invención (microcanales), mediante diversas técnicas, como las que se describen en la patente internacional N° WO 97/33737, publicada el 18 de septiembre de 1997.

[0037] En otro aspecto de la invención, pueden usarse, en el método de la invención, varios nanoalambres capaces de detectar la presencia o ausencia de una pluralidad de uno o más analitos. Cada uno de esos nanoalambres puede modificarse diferencialmente, como se ha descrito anteriormente, con lo que la sensibilidad de cada nanoalambre en relación al analito varía. En otra posibilidad, se puede seleccionar cada uno de los nanoalambres con arreglo a su capacidad de interactuar con analitos concretos, con lo que se posibilita la detección de una diversidad de analitos. La pluralidad de nanoalambres puede orientarse al azar o paralelos entre sí. En otra posibilidad, la pluralidad de nanoalambres puede orientarse en un conjunto en un sustrato.

[0038] Si hay un detector presente, se puede usar cualquier detector capaz de determinar una propiedad asociada al nanoalambre. Dicha propiedad puede ser electrónica, óptica o similar. Una propiedad electrónica del nanoalambre

puede ser, por ejemplo, su conductividad, resistividad, etc. Una propiedad óptica asociada al nanoalambre puede ser, por ejemplo, la intensidad de sus emisiones, o la longitud de onda de sus emisiones, si el nanoalambre es un nanoalambre emisor en el que la emisión se produce a nivel de la unión p-n. Por ejemplo, puede construirse un detector para medir un cambio en una propiedad electrónica o magnética (por ejemplo, voltaje, intensidad, conductividad, resistencia, impedancia, inductancia, carga, etc.). El detector suele incluir una fuente de alimentación y un voltímetro o un amperímetro. En una realización, puede detectarse una conductancia inferior a 1 nS. En una realización preferida, puede detectarse una conductancia del orden de milésimas de 1 nS. La concentración de una sustancia o analito puede detectarse desde concentraciones inferiores a 1 micromol hasta concentraciones molares y superiores. Usando nanoalambres con detectores conocidos, la sensibilidad puede aplicarse a una sola molécula. En una realización, un artículo de la invención es capaz de suministrar un estímulo al nanoalambre y el detector está construido y organizado/dispuesto para determinar una señal resultante del estímulo. Por ejemplo, a un nanoalambre que incluye una unión p-n se le puede suministrar un estímulo (corriente electrónica), y el detector está construido y dispuesto/organizado de manera que puede determinar una señal (radiación electromagnética) resultante del estímulo. En una disposición así, la interacción de un analito con el nanoalambre, o con una entidad de reacción situada cerca del nanoalambre, puede afectar a la señal de una manera detectable. En otro ejemplo, en el que la entidad de reacción es un punto cuántico, dicho punto cuántico puede estar construido de manera que recibe radiación electromagnética de una longitud de onda y emite radiación electromagnética de una longitud de onda diferente. Si el estímulo es radiación electromagnética, puede verse afectada por la interacción con un analito, y el detector puede detectar un cambio en la señal resultante. Son ejemplos de estímulos: una intensidad/voltaje constante, un voltaje alterno, y una radiación electromagnética como, por ejemplo, luz.

[0039] En algunas realizaciones, las nanoestructuras pueden ensamblarse de manera que formen una pluralidad de conjuntos paralelos como, por ejemplo, microcolumnas, a densidades más altas a las habituales, y en un formato compatible con los sistemas microfluidicos disponibles actualmente. Opcionalmente, los conjuntos de nanoestructuras comprenden una pluralidad de nanoestructuras tales como nanoalambres, nanotubos, nanoporos, nanopelículas, nanohuecos, o una combinación de los mismos. Cada nanoestructura del conjunto puede conectarse eléctricamente, por ejemplo mediante dos o más electrodos, a una pila, para la aplicación de un voltaje a través del nanoalambre y de un detector, de cara a la detección de cualquier cambio que aparezca en la conductancia del nanoalambre. En otra posibilidad, cada nanoestructura recibe electricidad por separado, o puede que sólo una porción de las nanoestructuras del conjunto esté conectada eléctricamente.

[0040] Opcionalmente, se usa un solo detector o una combinación de detectores para detectar la señal procedente del conjunto de nanoalambres. Por ejemplo, cada nanoalambre unido a una sonda que comprende una secuencia diana diferente, que pueden estar unida a una misma sonda o a una sonda diferente, se detecta opcionalmente, por separado, de modo que puede usarse un conjunto (una disposición) espacial de una pluralidad de nanoalambres para identificar con rapidez, por ejemplo, una pluralidad de diferentes secuencias de nucleótidos presentes en una muestra biológica (por ejemplo, sangre). En algunos ejemplos, se prepara en el conjunto una pluralidad de conglomerados de nanoestructuras, y cada conglomerado presenta diferentes sondas a fin de detectar varias secuencias diana en una muestra biológica. Como otra posibilidad, en algunos otros ejemplos, la totalidad de las nanoestructuras presentes en el conjunto puede presentar las mismas sondas, por lo que únicamente se analizaría una secuencia diana, en cuanto a su presencia, abundancia y/o variación en la secuencia.

[0041] Por lo general, la detección que realiza la nanoestructura o el nanosensor es de un cambio en la conductancia de la nanoestructura o de su entorno. La señal puede expresarse en términos de un cambio en el voltaje que atraviesa la nanoestructura, o en la intensidad que pasa a través de la nanoestructura. Tales cambios suelen detectarse eléctricamente; por ejemplo, con un voltímetro y/o un amperímetro. En otra posibilidad, la señal es detectada digitalmente. En una realización, se aplica un voltaje a través de una nanoestructura (por ejemplo, un nanoalambre), proporcionando una señal de estado estacionario. Cuando acaece un evento de unión en la sonda unida a la nanoestructura, el campo eléctrico cercano a la nanoestructura cambia, y la conductancia de la nanoestructura cambia, lo que produce una fluctuación o cambio en la señal de estado estacionario. La señal puede ser detectada, eléctrica o digitalmente, y proporciona detección, en tiempo real, del evento de interés.

[0042] El biosensor puede integrarse asimismo en un sistema para la detección de la presencia, nivel y/o variación de las biomoléculas. En un aspecto, un sistema así puede incluir una fuente de alimentación eléctrica y un sistema de seguimiento/vigilancia para aplicar y medir la intensidad eléctrica que atraviesa el elemento nanoestructural. En otro aspecto, un sistema así puede incluir, además, capacidades de procesamiento de datos que posibiliten el funcionamiento programado de las nanoestructuras, y que hagan posible recibir y guardar los datos que se obtengan, así como proporcionar análisis y visualizaciones útiles de los mismos. Además, si se desea, se puede integrar en un sistema biosensor un sistema informático para procesar los datos obtenidos, así como un procesador o procesadores adicionales. El sistema informático o los elementos adicionales presentes en un sistema biosensor pueden proporcionar software para el análisis de los datos o para el funcionamiento automático y/o un manual o manuales de realización de procesos de detección con un biosensor. Asimismo, pueden añadirse elementos adicionales que puedan mejorar el rendimiento/la eficacia de un sistema biosensor.

65 Cebadores

[0043] Una realización empleada en conexión con la presente invención describe un novedoso diseño de cebadores que puede hacer posible la amplificación de secuencias cortas y el subsiguiente “recorte” por una enzima de restricción, a fin de proporcionar secuencias diana amplificadas cortas. Dicho novedoso diseño de cebadores y método de procesamiento puede aplicarse no sólo a la preparación de sondas, sino también a analitos, que comprenden una secuencia de nucleótidos diana y secuencias adicionales opcionales unidas a la secuencia diana. Además, en algunas realizaciones, las sondas y los analitos se preparan con el novedoso diseño de cebadores y procesamiento mediante recorte, a fin de aumentar la exactitud de la detección por un biosensor. Como se describe también en otras partes de esta especificación, la preparación y/o procesamiento de las sondas y los analitos, conforme al novedoso diseño de cebadores y procesamiento mediante recorte, pueden llevarse a cabo antes de introducirlos en un biosensor o, de hecho, pueden llevarse a cabo en el biosensor. Con la finalidad de proporcionar una ilustración comprensible al instante, en el siguiente apartado de Ejemplos se presentan algunos ejemplos, no limitadores del ámbito de la presente invención, de las aplicaciones antedichas.

[0044] El método de la invención puede comprender retirar, por medios enzimáticos, una secuencia polimérica de nucleótidos diana no hibridada y, por tanto, de una sola cadena, empleando para ello enzimas nucleasa que pueden catalizar, de manera específica, la división de los polímeros de nucleótidos de una sola cadena en sus monómeros constituyentes nucleótidos; asimismo, puede comprender métodos de uso de este proceso para proporcionar multiplexación muy sensible y reproducible. En el siguiente apartado de Ejemplos, a fin de proporcionar una ilustración comprensible al instante, se presentan también algunos ejemplos no limitadores de esta última aplicación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Novedoso diseño de sondas que posibilita amplicones cortos homogéneos y el recorte de cebadores amplificados

[0045] En general, en la biología molecular se han estudiado secuencias poliméricas nucleotídicas de interés mediante la amplificación de regiones concretas de los genomas, u otros polímeros de nucleótidos tales como ARN, cADN, etc., usando un método llamado “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR, por sus siglas en inglés). A menudo, este método requiere que se sinteticen dos cebadores (oligonucleótidos cortos) que tengan una secuencia que sea la complementaria inversa de las secuencias de interés, comprendidas dentro de las moléculas poliméricas nucleotídicas diana, que flanquean a la secuencia de interés (por ejemplo, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), o una repetición, etc). Estos cebadores se añaden a la molécula diana, junto con una polimerasa (una enzima que cataliza la polimerización de los nucleótidos, a partir de una secuencia plantilla, para formar un polímero de nucleótidos). En la PCR se usan polimerasas especiales, termoestables (tales como la “Taq polimerasa” de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que tiene una temperatura óptima de actividad de 75-80 °C), así como monómeros nucleotídicos (adenina, guanina, citosina y timina) y tampones, que hacen posible la acción de la polimerasa. Se calienta la mezcla hasta 92-94 °C, temperatura a la que se funde (es decir, se rompen los enlaces de hidrógeno entre las dos cadenas de polímeros de nucleótidos complementarios), y luego, se enfría rápidamente dicha mezcla, hasta la temperatura de fusión de los cebadores integrados por oligonucleótidos, lo que permite que se hibriden con la molécula diana. Después, se calienta rápidamente la mezcla hasta 72 °C, que es la temperatura óptima para la catálisis por la Taq polimerasa, y esta enzima “rellena” el hueco existente entre los dos cebadores, creando así otra copia del polímero de nucleótidos entre ambos cebadores. Este ciclo térmico se repite a fin de producir dos copias más, y luego otra vez para producir cuatro copias más, y así sucesivamente hasta que el número de copias esté en un nivel detectable. Otros métodos para amplificar secuencias concretas a partir de moléculas de polímeros de nucleótidos diana son los métodos isotérmicos de HDA, RPA, LAMP, etc.

[0046] Sin embargo, en general, el diseño de cebadores puede ser una tarea compleja y muy dependiente de secuencias. A menudo resulta difícil amplificar de manera homogénea secuencias de polímeros de nucleótidos cortas, ya que es posible que no estén disponibles, justo adyacentes a la secuencia de interés presente en la molécula diana, los tradicionales y deseables “sitios para cebadores” (es decir, lugares, dentro de una molécula polimérica nucleotídica que tienen una secuencia adecuada para la unión de los cebadores). Además, pueden estar incluidos en el amplicón los cebadores en sí, y eso puede significar 18 o más nucleótidos adicionales, tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la secuencia diana. Algunos ejemplos ilustrativos de la presente invención describen un método de diseño de cebadores que puede posibilitar amplificaciones cortas homogéneas, así como un método de retirada de parte de las secuencias de los cebadores presentes en el amplicón final.

[0047] En algunas realizaciones, los cebadores que se describen en este ejemplo concreto comprenden al menos tres secciones continuas separadas, dentro de una sola molécula de oligonucleótido:

- (1) una sección 5' ancla que une el cebador a la región específica de la molécula diana,
- (2) una región 3' “de extensión” que comprende una secuencia corta, de unos 8-15 pb de longitud, pero que puede tener hasta 15 pb o más, con una T_m (temperatura de fusión) baja (optimizada para hibridarse únicamente en condiciones selectivas cuando se hibrida la región ancla), que puede actuar de sitio de inicio de la polimerización, y
- (3) una región “burbuja” que es complementaria en un 50% aproximadamente, o menos, de la secuencia diana. En algunas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos que pueden ser escindidas por una nucleasa pueden estar presentes en la región 5' ancla y/o en la región burbuja.

- [0048]** La sección “ancla”, situada en el extremo 5’ de la secuencia del oligonucleótido, puede diseñarse de manera que tenga entre 15 y 30 pb, aunque puede ser más corta, con un alto contenido en GC, o más larga si resulta necesario, y en algunas realizaciones, es complementaria en un 100% de la secuencia diana, aunque también puede ser complementaria en aproximadamente un 70%-100% de la secuencia diana a la que se debe unir. En algunas realizaciones, la longitud de la región 5’ ancla puede ser variable, de modo que puede tener en torno a 15-30 pb, 15-25 pb o 15-20 pb, en diversos ejemplos. A diferencia de lo que ocurre en algunos otros métodos de diseño de cebadores, no es necesario que esta sección (región) sea plenamente homóloga de la secuencia diana. Se le llama “ancla” porque, inicialmente, puede anclar el cebador a la molécula diana.
- [0049]** La sección (región) “de extensión” puede estar situada en el extremo 3’ del cebador, y puede diseñarse de manera que sea también, en algunos ejemplos, completamente o casi completamente complementaria inversa de la secuencia diana. La longitud de la región 3’ de extensión también puede ser variable, de modo que puede tener en torno a 5-30 pb, 5-25 pb, 5-20 pb, 5-15 pb, 5-12 pb o 5-10 pb, en diversos ejemplos. La temperatura de fusión (T_m) de esta región puede ser importante, ya que puede ser baja a fin de posibilitar la unión una vez que la región ancla se ha hibridado. Así, la termodinámica del sistema y las condiciones de la PCR sólo permiten que la sección de extensión se hibride con la molécula diana si la coincidencia es plena, o al menos casi plena.
- [0050]** La temperatura de fusión (T_m), tal y como se usa en algunas de las realizaciones aquí presentadas, es la temperatura a la que el enlace de hidrógeno que puede unir a dos cadenas de polímeros de nucleótidos entre sí (como, por ejemplo, dúplexes de ADN), se rompe, originando así dos moléculas poliméricas nucleotídicas de una sola cadena. La temperatura de fusión puede depender de la longitud (es decir, del número de monómeros de nucleótido presentes en el polímero que pueden unirse mediante enlaces de hidrógeno), de la concentración salina y de la composición de la secuencia polimérica nucleotídica (la guanina y la citosina se unen entre sí mediante tres enlaces de hidrógeno, y la timina y la adenina se unen exclusivamente entre sí mediante dos enlaces de hidrógeno, de manera que los dúplexes con alto contenido en CG tienen una T_m superior a la de los dúplexes con alto contenido en AT). La siguiente ecuación proporciona una estimación (cálculo) útil de la T_m :
- $$\text{[0055]} \quad T_m = 16,6 \times \log C_s + 0,41 \times (\% G + C) + 81,5 - 820/L$$
- donde C es la concentración salina y L es la longitud del dúplex. (Schildkraut, C. & Lifson, S. 1965 - Biopolymers 3, 195-208; Thomas, C.A. Jnr. & Dancis B.M. 1973 - Journal of molecular biology, 77, 43-55).
- [0051]** La región “burbuja” es la sección interna comprendida entre la región “ancla” y la región “de extensión”. Puede ser complementaria o no o, en algunas realizaciones, puede ser parcialmente complementaria o, en otras realizaciones, no contiene pares de bases que coincidan con la secuencia diana y consta de unos 2-10 nucleótidos no coincidentes. En algunas realizaciones, el par de bases situado más hacia el extremo 3’ es una base universal (como la inosina), lo que ayuda a crear la burbuja. Debido a que la secuencia de los nucleótidos en la cadena polimérica no coincide o sólo coincide parcialmente con la secuencia de la molécula diana, puede formar una “burbuja”: es decir, un área de polímero nucleotídico sin hibridar. Debido a la termodinámica de esta burbuja, para el diseño del cebador, en ciertas realizaciones, puede ser necesario que la “extensión” coincida al 100% con su región correspondiente en la molécula diana, a fin de hacer posible que se una y, por lo tanto, hacer posible que la polimerasa actúe y proceda con la polimerización. Además, puede ser necesario que partes de la sección burbuja coincidan parcialmente, o que la sección ancla sea más larga, para contrarrestar la sección burbuja no coincidente.
- [0052]** En parte, dado que no es necesario que la sección “ancla” sea completamente complementaria y dada la termodinámica de las regiones “burbuja” y “de extensión”, en ciertos aspectos de las realizaciones, pueden diseñarse cebadores, homogéneamente, justo adyacentes a la secuencia de interés presente en la molécula diana, y pueden diseñarse conjuntos de cebadores de manera tal que hagan posible amplificar secuencias diana cortas y en múltiplex, ya que con estos cebadores no se observa dimerización de cebadores.
- [0053]** Una vez llevado a cabo el proceso de amplificación, las secuencias diana amplificadas pueden ser recortadas a fin de retirar las dos regiones “ancla” y/o burbuja, lo que reduce aún más el tamaño de las secuencias diana que se deben detectar en los biosensores descritos anteriormente.
- [0054]** La estructura de los cebadores que se acaba de describir posibilita un diseño de cebadores menos exigente. Puesto que el ancla es larga, se hibrida a la plantilla con facilidad; no obstante, la burbuja que no se hibrida aísla la región de extensión que, por ello, debe ser casi perfectamente coincidente con la secuencia a la que se debe unir, ya que la termodinámica exige una homología de casi el 100%. Por ejemplo, podemos diseñar los cebadores de manera que el SNP de interés esté en el extremo 3’ o cerca de él. Así la secuencia de tipo natural permitirá la extensión y, por ende, la amplificación, pero el tipo mutante no la permitirá, porque la región de extensión no se hibridará, de modo que no permitirá la extensión. Esta termodinámica se traduce en que pueden multiplexarse grandes cantidades (por ejemplo, hasta 100-plex en un solo tubo), sin tener que preocuparse demasiado acerca de dónde se sitúan los cebadores, lo que permite asegurar un diseño homogéneo para amplicones cortos.
- [0055]** En la Figura 1 se presentan algunas ilustraciones, no limitadoras, del Ejemplo 1 concreto precedente. En referencia a la Figura 1:

- i) ilustra la topología de los cebadores descritos en algunas realizaciones, “a” representa la sección “ancla”, “b” representa la región “burbuja” y “c” representa la región “de extensión”;
- ii) ilustra dos cebadores hibridados satisfactoriamente, adyacentes a la secuencia de interés, “a” representa la sección “ancla”, “b” representa la región “burbuja” y “c” representa la región “de extensión”;
- 5 iii) ilustra una situación en la que la región “ancla” se ha hibridado, pero en la que la región “de extensión” aún tiene que unirse. Este hecho podría deberse a uno de varios motivos; 1. la temperatura aún tiene que bajar, hasta un punto que pueda facilitar la hibridación de la región de extensión, 2. es posible que la secuencia presente en la región de extensión no sea perfectamente complementaria inversa de la secuencia correspondiente presente en la secuencia diana. Ello podría deberse a la unión de la región “ancla” a una secuencia repetida, o podría haber una coincidencia
- 10 muy alta, pero, a causa de la termodinámica de las regiones burbuja y de extensión, es posible que la región de extensión deba ser coincidente al 100% para poder hibridarse (al menos, en algunos ejemplos);
- iv) ilustra la topología de un amplicón, amplificado usando este sistema de cebadores, “a” representa la sección “ancla”, “b” representa la región “burbuja”, “c” representa la región “de extensión”, y “d” representa la secuencia de interés;
- 15 v) representa la topología del amplicón tras la digestión con enzima de restricción.

Ejemplo 2 - Preparación de analitos mediante un novedoso diseño de cebadores y el recorte de cebadores amplificados

- [0056]** Un método similar al usado para preparar sondas, que se describe en el Ejemplo 1, puede emplearse también para preparar analitos en algunas realizaciones. Los analitos preparados por tales procedimientos comprenderían una secuencia o secuencias de nucleótidos diana y parte de las secuencias de cebadores, y no contendrían secuencias adicionales, que pueden añadirse mediante errores en la PCR o por discordancia aleatoria de los cebadores. Por lo tanto, la señal de la detección de ácidos nucleicos estaría determinada principalmente por las secuencias diana, y no se vería influenciada por la presencia de secuencias no diana adicionales. Al menos en algunas realizaciones, la exactitud de la detección aumentaría.

Ejemplo 3 - Procesado de analitos con ayuda de la nucleasa

- [0057]** Una nucleasa es una enzima capaz de dividir (escindir, romper) los enlaces fosfodiéster que hay entre las subunidades nucleótido de los ácidos nucleicos. Algunas nucleasas son capaces de reconocer y dividir secuencias concretas, mientras que otras nucleasas pueden dividir polímeros de nucleótidos sin preferencia alguna por secuencias de nucleótidos determinadas. En general, entre las nucleasas específicas de secuencia están incluidas diversas enzimas de restricción fácilmente disponibles en esta disciplina. En el estado de la técnica se dispone también de nucleasas no específicas de secuencia; algunos ejemplos son la nucleasa S1, la nucleasa P1, la nucleasa microcócica, la nucleasa de judía mungo, la exonucleasa, II, III, IV, V, VI, VII y VIII, y el fragmento de Klenow. En diversas realizaciones de la presente invención, están incluidas dichas nucleasas específicas de secuencia y no específicas de secuencia, y también la nucleasa específica de ADN, la nucleasa específica de ARN o ambas. En ciertas realizaciones, una nucleasa que puede escindir únicamente un ácido nucleico de una sola cadena puede usarse para procesar analitos. En el siguiente ejemplo, en el que se emplea la nucleasa S1 como ejemplo no limitador, se describen más detalladamente algunas realizaciones de la invención.

- [0058]** La actividad enzimática de la nucleasa específica de ADN de una sola cadena fue observada por primera vez en 1960 por I.R. Lehman, en extractos de *Escherichia coli* libres de células y, posteriormente, se observó en células de *E. coli* infectadas con un fago (S. Bose & N. Nossal, 1964), y en veneno de serpiente (I.L. Nikolskaya, *et al.* 1964). La fosfodiesterasa de *E. coli* muestra una magnitud baja de actividad enzimática cuando el sustrato es ADN de doble cadena intacto, lo que se debe a la incapacidad de la enzima de catalizar una estructura de ADN de doble cadena, unida por enlaces de hidrógeno, extendida.

- [0059]** La nucleasa S1, que escinde específicamente el enlace fosfodiéster del ssADN, está disponible en el mercado, pudiéndose obtener de la mayoría de los proveedores de reactivos para biología molecular (Sigma, Fermentas, etc). La variante disponible comercialmente suele ser la nucleasa S1 aislada de *Aspergillus oryzae* (T. Ando, 1965). Esta enzima es una glicoproteína de 29 kd que tiene un contenido del 18% de hidratos de carbono.

- [0060]** La enzima puede ser más activa en presencia de 1×10^{-4} M de Zn^{2+} , y menos activa en presencia de una cantidad igual de ARN; una unidad de la enzima produce, en 1 minuto a 37 °C, 1 µg de desoxiribonucleótidos solubles en ácido. El tampón de reacción también está disponible comercialmente: 200 mM de acetato sódico (pH 4,5 a 25 °C), 1,5 M de NaCl y 10 mM de $ZnSO_4$ (Fermentas). Los productos de digestión que se obtienen de un ADN desnaturalizado pueden identificarse como 5'-desoxinucleótidos.

- [0061]** En general, la detección de polímeros de nucleótidos puede basarse en las moléculas diana que pueden escindirse, expresarse o amplificarse (teniendo en cuenta o no la longitud de las moléculas diana), e hibridarse a sondas, y la detección es proporcionada por la unión de otra sonda fluorescente a ese complejo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con una fracción fluorescente que se detecta ópticamente). En algunos sistemas de detección, esto puede ser aceptable en general, puesto que las metodologías de “informe” mediante fluorescencia no se ven afectadas por las secuencias flanqueadoras adicionales que no se hibridan. Sin embargo, cuando hablamos de detectar nucleótidos usando nanosensores que pueden aprovechar los cambios que se producen en las propiedades eléctricas

en parte a causa de los eventos de hibridación, la secuencia flanqueadora puede ser importante, ya que puede portar una carga eléctrica que puede afectar a la señal del biosensor. En un ejemplo de algunas realizaciones, se proponen métodos para el procesamiento de secuencias diana que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante escisión, o al ser enzimáticamente fragmentadas, expresadas o amplificadas, de manera que se forman moléculas de ADN “diana” que contienen la región de interés específica.

[0062] Esto, en una realización, puede lograrse mediante digestión *in situ*, por la nucleasa (por ejemplo, la nucleasa S1), de la secuencia flanqueadora de una sola cadena no hibridada a sondas, después de la hibridación de los polímeros de nucleótidos diana. Reduciendo el tamaño de las moléculas diana podemos conseguir que el sistema sea más sensible y que diferencie más fácilmente entre diferentes concentraciones de molécula diana, lo que posibilita análisis cuantitativos de especies de ácidos nucleicos diana.

[0063] En una realización, una vez que se ha llevado a cabo la digestión de la secuencia flanqueadora por la nucleasa, esta molécula diana “recortada” puede ser “fundida”, incrementando la temperatura hasta liberarla, para que pueda ser detectada por el biosensor o, si la sonda ya está inmovilizada en el biosensor, para que pueda realizarse una medición.

[0064] En algunas realizaciones ilustrativas, una vez que se ha llevado a cabo la digestión de la secuencia flanqueadora por la nucleasa, esta molécula diana “recortada” puede ser “fundida”, incrementando la temperatura hasta liberarla, para que pueda ser detectada por el nanosensor o, si la sonda ya está inmovilizada en el nanosensor, para que pueda realizarse una medición.

[0065] En las Figuras 2 y 3 se presentan algunas ilustraciones del Ejemplo 3 concreto precedente. En referencia a la Figura 2:

i) ilustra una sonda, b, inmovilizada en un soporte sólido, a, que podría ser el biosensor (por ejemplo, un nanoalambre, o un nanotubo de carbono, entre otras posibilidades), una nanopartícula (por ejemplo, una nanoesfera o una microperla, entre otras posibilidades), o cualquier otro soporte sólido;

ii) ilustra un polímero de nucleótidos diana, c, que se puede obtener por escisión o ser enzimáticamente fragmentado, expresado o amplificado, unido a la sonda unida al soporte sólido, a. Obsérvese que, en esta ilustración concreta de algunas realizaciones, sólo la región duplexada contiene la secuencia de interés específica y que la región flanqueadora permanece monocatenaria.

iii) este diagrama ilustra lo que puede quedar tras la digestión con una nucleasa (por ejemplo, la nucleasa S1), a saber: sólo la secuencia diana, c (al menos en esta ilustración concreta), que se duplexó con la sonda y con los monómeros de nucleótido, d. Esta molécula diana “recortada” puede entonces ser “fundida” incrementando la temperatura hasta liberarla, para que pueda ser detectada por el biosensor o, si la sonda ya está inmovilizada en el biosensor, para que pueda realizarse una medición.

Ejemplo 4 - Detección de múltiples secuencias de nucleótidos diana (multiplexación)

[0066] Además, en algunas otras realizaciones, la detección múltiplex de muchos sitios dentro de las secuencias diana se posibilita apilando sondas a fin de interrogar los múltiples sitios presentes en una secuencia diana o en múltiples secuencias diana. En este ejemplo concreto, la secuencia diana podría contener varias mutaciones conocidas y puede obtenerse por escisión o siendo enzimáticamente fragmentada, expresada, y sometida a transcripción inversa o amplificada. En una realización, resulta posible, en general, diseñar cada una de las sondas apiladas solapadas de manera que tengan las mismas T_m, o T_m similares, a fin de cubrir la secuencia de tipo natural. Además, en ciertas realizaciones, se pueden diseñar sondas “específicas de mutación” o “específicas de especie” o “específicas de secuencia de interés” (una sonda por cada mutación, o por cada secuencia específica de especie, o por cada haplotipo/alelo/o secuencia de interés), con las mismas T_m que las sondas de tipo natural, o con T_m similares a las de estas.

[0067] Cada sonda puede unirse a una copia (escindida o enzimáticamente fragmentada, expresada y sometida a transcripción inversa o amplificada) de la secuencia diana y, una vez hibridada a la T_m de las sondas, ser digerida con nucleasa a fin de obtener, en un ejemplo, únicamente la secuencia duplexada. Las discordancias (por ejemplo, si una sonda mutante puede unirse de manera no específica a una secuencia diana de tipo natural) pueden eliminarse ajustando las condiciones experimentales, de manera que se impidan las uniones no específicas (por ejemplo, modificando la concentración salina o la temperatura, o usando PNAs como sondas (PNA/ADN)).

[0068] En referencia a la Figura 3:

i) ilustra un posible diseño experimental de una reacción de detección múltiplex que puede hacer posible que un solo amplicón largo sea interrogado por sondas más cortas. En este caso, la secuencia diana a, exón 10 del gen BRCA, que puede contener 16 mutaciones conocidas, puede obtenerse siendo escindida o enzimáticamente fragmentada, expresada y sometida a transcripción inversa o amplificada. Resulta posible diseñar cada una de las sondas apiladas solapadas de manera que tengan las mismas T_m, o T_m similares, a fin de cubrir la secuencia de tipo natural, c. Además, se pueden diseñar sondas “específicas de mutación”, d (una sonda por cada mutación) que tengan las mismas T_m que las sondas de tipo natural, o T_m similares a las de estas. Cada sonda puede unirse a una copia

amplificada de la secuencia diana y, una vez hibridada a la Tm de las sondas, ser digerida con nucleasa a fin de obtener la secuencia duplexada. Las discordancias –por ejemplo, si una sonda mutante se une de manera no específica a una secuencia diana de tipo natural– pueden eliminarse ajustando las condiciones experimentales de manera que se impidan tales uniones no específicas (por ejemplo, modificando la concentración salina o la temperatura, o usando PNAs como sondas, ya que los complejos PNA/ADN pueden ser menos estables que los complejos ADN/ADN, y las discordancias presentes dentro de eventos de unión no específica pueden ser accesibles por la nucleasa y retiradas (eliminadas)).

Ejemplo 5 - Detección de analitos con un biosensor-I

[0069] En los Ejemplos 5 a 7, con la finalidad de ilustrar algunas realizaciones, se describen métodos de detección de variaciones en la secuencia de un gen *adenomatous polyposis coli* humano. Esta ilustración se proporciona únicamente a fin de explicar más expresamente algunas realizaciones de los métodos que se presentan en esta invención, y no se debe considerar que limite el ámbito de la presente invención. Tal y como se describe también en otras partes de la especificación, en esta solicitud se presentan diversos métodos de detección que pueden aplicarse a una diversidad de finalidades como, entre otras posibles, al pronóstico, previsión y/o diagnóstico de determinadas enfermedades en un mamífero, incluidos los seres humanos, así como a la detección de algunos patógenos tales como bacterias, virus y hongos en un líquido, un gas o cualquier entorno de interés.

[0070] Se ha demostrado que la mutación del gen *adenomatous polyposis coli* (APC) humano, y en especial, las mutaciones somáticas de dicho gen en tejidos del colon, están implicadas en la aparición de tumores y/o en el cáncer colorrectal. Por ejemplo, en la publicación sobre investigación realizada por Jass *et al* (Journal of Clinical Pathology 2003;56: 69-73) se enumeran las bases implicadas en la mutación somática en el gen y el tipo de cáncer colorrectal asociado. Sería deseable detectar si alguna de dichas mutaciones del gen APC está presente en un individuo, a fin de evaluar su estado de salud en ese momento y también un posible riesgo de cáncer de colon. Por ejemplo, cuando se trata del tipo MSI-H del cáncer de colon, que está asociado a una mutación en el codón nº 1295 del gen APC, pueden ponerse en práctica los siguientes procedimientos.

1. Extracción de muestras: a fin de determinar la mutación somática del gen APC en un individuo, pueden obtenerse algunas muestras de tejidos del colon, mediante diversos métodos disponibles en esta disciplina, como, por ejemplo, incisión quirúrgica y extracción. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para extraer muestras. Otra opción es que la muestra sea extraída por un equipo por separado.

2. Preparación de los analitos: Una vez obtenido el tejido del colon, puede obtenerse también el ADN genómico del tejido mediante diversos métodos conocidos en la disciplina como, por ejemplo, un método de extracción del ADN mediante lisis alcalina. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar analitos; en algunos otros casos, la preparación de los analitos puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse los analitos así preparados a un biosensor.

En un ejemplo (Ejemplo 5A), el ADN genómico puede obtenerse y fragmentarse más, para que resulte adecuado para su hibridación con las sondas mediante métodos físicos y/o químicos. Los métodos físicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la sonicación del ADN. Los métodos químicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la restricción con nucleasas. En algunas realizaciones, pueden aplicarse métodos físicos y químicos, combinados, al ADN genómico.

En otro ejemplo (Ejemplo 5B), usando cebadores específicos de la región diana del gen APC, puede realizarse la amplificación de la secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, los cebadores que se usan en dicha amplificación pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, tal y como se describe en otras partes de la especificación. Una vez que el analito que comprende la región diana del gen APC y las secuencias de los cebadores se obtiene de la reacción de amplificación (por ejemplo, PCR), puede ser tratado con ciertas nucleasas a fin de retirar al menos parte de las secuencias de los cebadores. Tales realizaciones serían deseables si hay una o más secuencias de reconocimiento de las nucleasas en la región 5' ancla y/o región burbuja de los cebadores. Sin embargo, en algunos otros casos, es posible que los cebadores no comprendan una, o más, de las regiones 5' ancla, 3' de extensión y burbuja, y que no puedan ser escindidas con nucleasas. En tales casos, los analitos amplificados se pueden hibridar con las sondas, sin tratamiento con nucleasas.

3. Preparación de las sondas: conforme a los métodos que se describen en el Ejemplo 1, en este ejemplo concreto pueden prepararse sondas específicas de la región diana del gen APC humano. Los cebadores que se usan para esta preparación de sondas pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, y uno o más sitios de escisión por las nucleasas pueden estar presentes en la región 5' ancla y/o en la región burbuja. Una vez que las secuencias diana son amplificadas con los cebadores específicos, al menos parte de las secuencias de los cebadores pueden ser escindidas mediante tratamiento con nucleasa. Las secuencias diana resultantes, que serán usadas como sondas, pueden tener un tamaño esencialmente homogéneo. Las sondas preparadas pueden unirse a nanoestructuras/nanosensores (por ejemplo, nanoalambres, nanotubos, nanopelotas, nanoporos, nanohuecos, y otros) mediante diversos métodos disponibles en la disciplina. Si se desea analizar más de un tipo de cáncer de colon, pueden prepararse varios tipos de sondas (a saber, sondas específicas de diferentes regiones diana del gen APC) y unirlos a

los nanosensores. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar sondas; en algunos otros casos, la preparación de las sondas puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse las sondas así preparadas a un biosensor.

5 4. Hibridación: los analitos preparados conforme al Ejemplo 5A o 5B pueden proporcionarse al conjunto de nanoestructuras/nanosensores que comprenden las sondas. Tal hibridación puede producirse en un estado líquido o gaseoso. Como se describe en otras partes de la especificación, la incorporación de la secuencia diana a la sonda puede ocasionar cambios en la carga en las superficies de las nanoestructuras o cerca de sus superficies, o en el seno de las nanoestructuras. La rigurosidad de la hibridación entre las sondas y las secuencias diana (que, en algunos casos, presentan variaciones en su secuencia) puede controlarse manipulando diversos factores tales como pH, concentración salina, y/o temperatura del entorno de reacción. Una vez que las señales son detectadas individual o colectivamente a partir de la pluralidad de nanoestructuras, los datos de dichas señales pueden procesarse adicionalmente, si se desea. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para llevar a cabo la hibridación. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de hibridación se acopla operativamente a otras unidades/otros elementos tales como una unidad de extracción de muestras, una unidad de preparación de muestras y/o una unidad de preparación de sondas.

20 5. Procesamiento de datos: en función de las configuraciones experimentales, pueden obtenerse diversos tipos de datos, que indiquen, por ejemplo, la presencia de determinados alelos de mutación del gen APC en el individuo analizado, la abundancia de determinados alelos de mutación del gen APC en el individuo analizado, y la determinación de una mutación o mutaciones concretas del gen APC en el individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para procesar los datos obtenidos de las nanoestructuras. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de procesamiento de datos se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.

25 6. Generación de un informe: una vez que se han procesado los datos de detección y que se han obtenido los resultados deseados (por ejemplo, presencia y/o abundancia de las mutaciones relevantes en el gen APC, y el tipo de cáncer correspondiente), puede generarse un informe sobre dicha información, y puede proporcionarse dicho informe al profesional sanitario y/o al individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para generar un informe obtenido a partir de las nanoestructuras/los nanosensores. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de generación de informes se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.

35 Ejemplo 6 - Detección de analitos con un biosensor-II

[0071] En el Ejemplo 6 se presenta otra realización de la presente invención, usando un escenario ilustrativo de la detección del gen APC humano.

40 1. Extracción de muestras: a fin de determinar la mutación somática del gen APC en un individuo, pueden obtenerse algunas muestras de tejidos del colon, mediante diversos métodos disponibles en este campo del conocimiento como, por ejemplo, incisión quirúrgica y extracción. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para extraer muestras. Otra opción es que la muestra sea extraída por un equipo por separado.

45 2. Preparación de los analitos: Una vez obtenido el tejido del colon, puede obtenerse también el ADN genómico del tejido mediante diversos métodos conocidos en la disciplina como, por ejemplo, un método de extracción del ADN mediante lisis alcalina. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar analitos; en algunos otros casos, la preparación de los analitos puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse los analitos así preparados a un biosensor.

50 En un ejemplo (Ejemplo 5A), el ADN genómico puede obtenerse y fragmentarse más, para que resulte adecuado para su hibridación con las sondas mediante métodos físicos y/o químicos. Los métodos físicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la sonicación del ADN. Los métodos químicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la restricción con nucleasas. En algunas realizaciones, pueden aplicarse métodos físicos y químicos, combinados, al ADN genómico.

55 En otro ejemplo (Ejemplo 5B), usando cebadores específicos de la región diana del gen APC, puede realizarse la amplificación de la secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, los cebadores que se usan en dicha amplificación pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, tal y como se describe en otras partes de la especificación. Una vez que el analito que comprende la región diana del gen APC y las secuencias de los cebadores se obtiene de la reacción de amplificación (por ejemplo, PCR), puede ser tratado con ciertas nucleasas a fin de retirar al menos parte de las secuencias de los cebadores. Tales realizaciones serían deseables si hay una o más secuencias de reconocimiento de las nucleasas en la región 5' ancla y/o región burbuja de los cebadores. Sin embargo, en algunos otros casos, es posible que los cebadores no comprendan una, o más, de las regiones 5' ancla, 3' de extensión y burbuja, y que no puedan ser escindidas con nucleasas. En tales casos, los analitos amplificados se pueden hibridar con las sondas, sin tratamiento con nucleasas.

3. Preparación de las sondas: conforme a los métodos que se describen en el Ejemplo 1, en este ejemplo concreto pueden prepararse sondas específicas de la región diana del gen APC humano. Los cebadores que se usan para esta preparación de sondas pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, y uno o más sitios de escisión por las nucleasas pueden estar presentes en la región 5' ancla y/o en la región burbuja. Una vez que las secuencias diana son amplificadas con los cebadores específicos, al menos parte de las secuencias de los cebadores pueden ser escindidas mediante tratamiento con nucleasa. Las secuencias diana resultantes, que serán usadas como sondas, pueden tener un tamaño esencialmente homogéneo. Las sondas preparadas pueden unirse a nanoestructuras/nanosensores (por ejemplo, nanoalambres, nanotubos, nanopelotas, nanoporos, nanohuecos, y otros) mediante diversos métodos disponibles en la disciplina. Si se desea analizar más de un tipo de cáncer de colon, pueden prepararse varios tipos de sondas (a saber, sondas específicas de diferentes regiones diana del gen APC), y unirlos a los nanosensores. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar sondas; en algunos otros casos, la preparación de las sondas puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse las sondas así preparadas a un biosensor.
4. Hibridación de la secuencia diana con la sonda, y escisión de las secuencias flanqueadoras de la secuencia diana: en algunos ejemplos, especialmente cuando el analito se prepara conforme al Ejemplo 5A, el analito puede comprender secuencias adicionales que no forman parte de las secuencias diana. En dichos ejemplos, una vez que la sonda y el analito se han hibridado, las secuencias adicionales presentes en el analito, que no forman parte de las secuencias diana, pueden estar presentes en forma de ADN de una sola cadena. Estas secuencias flanqueadoras de una sola cadena pueden escindirse mediante tratamiento con una o más nucleasas. En algunos casos, para escindir las secuencias de ADN flanqueadoras de una sola cadena, puede usarse la nucleasa S1, que es capaz de escindir el ADN de una sola cadena. Una vez retiradas las secuencias flanqueadoras, la detección de las señales por las nanoestructuras puede proseguir. En algunos ejemplos, se pueden añadir uno o más pasos de lavado a fin de sacar los nucleótidos flanqueadores, degradados, de la mezcla de reacción. Además, tras la extracción de las secuencias de nucleótidos flanqueadores, puede producirse la fusión o disociación del dúplex, y puede efectuarse la rehibridación de los analitos procesados y las sondas. En otra opción, tras la retirada de la secuencia flanqueadora, la detección de las señales por las nanoestructuras o los nanosensores puede realizarse sin los pasos de fusión y rehibridación. Como se describe en otras partes de la especificación, la incorporación de la secuencia diana a la sonda puede ocasionar cambios en la carga en las superficies de las nanoestructuras o cerca de sus superficies, o en el seno de las nanoestructuras. La rigurosidad de la hibridación entre la sonda y las secuencias diana (que, en algunos casos, presentan variaciones en su secuencia) puede controlarse adicionalmente manipulando diversos factores tales como pH, concentración salina, y/o temperatura del entorno de reacción. Una vez que las señales son detectadas individual o colectivamente a partir de una pluralidad de nanoestructuras, los datos de dichas señales pueden procesarse adicionalmente, si se desea. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para llevar a cabo la hibridación con la sonda. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de hibridación con la sonda se acopla operativamente a otras unidades/otros elementos tales como una unidad de extracción de muestras, una unidad de preparación de muestras y/o una unidad de preparación de sondas.
5. Procesamiento de datos: en función de las configuraciones experimentales, pueden obtenerse diversos tipos de datos, que indiquen, por ejemplo, la presencia de determinados alelos de mutación del gen APC en el individuo analizado, la abundancia de determinados alelos de mutación del gen APC en el individuo analizado, y la determinación de una mutación o mutaciones concretas del gen APC en el individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para procesar los datos obtenidos de las nanoestructuras. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de procesamiento de datos se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.
6. Generación de informes: una vez que se han procesado los datos de detección y que se han obtenido los resultados deseados (por ejemplo, presencia y/o abundancia de las mutaciones relevantes en el gen APC, y el tipo de cáncer correspondiente), puede generarse un informe sobre dicha información, y puede proporcionarse dicho informe al profesional sanitario y/o al individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para generar un informe obtenido a partir de las nanoestructuras/los nanosensores. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de generación de informes se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.

55 Ejemplo 7 - Detección de analitos con un biosensor-III

[0072] En el Ejemplo 7 se presenta otra realización adicional de la presente invención, usando un escenario ilustrativo de la detección del gen APC humano.

1. Extracción de muestras: a fin de determinar la mutación somática del gen APC en un individuo, pueden obtenerse algunas muestras de tejidos del colon, mediante diversos métodos disponibles en este campo del conocimiento como, por ejemplo, incisión quirúrgica y extracción. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para extraer muestras. Otra opción es que la muestra sea extraída por un equipo por separado.
2. Preparación de los analitos: Una vez obtenido el tejido del colon, puede obtenerse también el ADN genómico del tejido mediante diversos métodos conocidos en la disciplina como, por ejemplo, un método de extracción del ADN

mediante lisis alcalina. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar analitos; en algunos otros casos, la preparación de los analitos puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse los analitos así preparados a un biosensor.

5 En un ejemplo (Ejemplo 5A), el ADN genómico puede obtenerse y fragmentarse más, para que resulte adecuado para su hibridación con las sondas mediante métodos físicos y/o químicos. Los métodos físicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la sonicación del ADN. Los métodos químicos de fragmentación del ADN pueden incluir, entre otras posibilidades, la restricción con nucleasas. En algunas realizaciones, pueden aplicarse métodos físicos y químicos, combinados, al ADN genómico. En otro ejemplo (Ejemplo 5B), usando cebadores
10 específicos de la región diana del gen APC, puede realizarse la amplificación de la secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, los cebadores que se usan en dicha amplificación pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, tal y como se describe en otras partes de la especificación. Una vez que el analito que comprende la región diana del gen APC y las secuencias de los cebadores se obtiene de la reacción de amplificación (por ejemplo, PCR), puede ser tratado con ciertas nucleasas a fin de retirar al menos parte de las
15 secuencias de los cebadores. Tales realizaciones serían deseables si hay una o más secuencias de reconocimiento de las nucleasas en la región 5' ancla y/o región burbuja de los cebadores. Sin embargo, en algunos otros casos, es posible que los cebadores no comprendan una, o más, de las regiones 5' ancla, 3' de extensión y burbuja, y que no puedan ser escindidas con nucleasas. En tales casos, los analitos amplificados se pueden hibridar con las sondas, sin tratamiento con nucleasas.

20 3. Preparación de las sondas: conforme a los métodos que se describen en el Ejemplo 1, en este ejemplo concreto pueden prepararse sondas específicas de la región diana del gen APC humano. Los cebadores que se usan para esta preparación de sondas pueden comprender una región 5' ancla, una región 3' de extensión y una región burbuja, y uno o más sitios de escisión por las nucleasas pueden estar presentes en la región 5' ancla y/o en la región burbuja. Una
25 vez que las secuencias diana son amplificadas con los cebadores específicos, al menos parte de las secuencias de los cebadores pueden ser escindidas mediante tratamiento con nucleasa. Las secuencias diana resultantes, que serán usadas como sondas, pueden tener un tamaño esencialmente homogéneo. Las sondas preparadas pueden unirse a nanoestructuras/nanosensores (por ejemplo, nanoalambres, nanotubos, nanoperlas, nanoporos, nanohuecos, y otros) mediante diversos métodos disponibles en la disciplina. Si se desea analizar más de un tipo de cáncer de colon, pueden
30 prepararse varios tipos de sondas (a saber, sondas específicas de diferentes regiones diana del gen APC), y unirlos a los nanosensores. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para preparar sondas; en algunos otros casos, la preparación de las sondas puede efectuarse por separado, y pueden proporcionarse las sondas así preparadas a un biosensor.

35 4. Hibridación del analito y de los oligonucleótidos: en algunos ejemplos, especialmente cuando el analito se prepara conforme al Ejemplo 5A, el analito puede comprender secuencias flanqueadoras adicionales que no forman parte de las secuencias diana. En tales ejemplos, el analito puede hibridarse con algunos oligonucleótidos, que sean esencialmente complementarios de las secuencias diana. Una vez que los oligonucleótidos y el analito se han hibridado, las secuencias
40 adicionales presentes en el analito, que no forman parte de las secuencias diana, pueden estar presentes en forma de ADNs de una sola cadena. Estas secuencias flanqueadoras de una sola cadena pueden escindirse mediante tratamiento con una o más nucleasas. En algunos casos, para escindir las secuencias de ADN flanqueadoras de una sola cadena, puede usarse la nucleasa S1, que es capaz de escindir los ADNs de una sola cadena. Una vez retiradas las secuencias flanqueadoras, el dúplex de secuencia diana y oligonucleótidos puede disociarse o fundirse, y puede extraerse la secuencia diana, de manera específica. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para llevar a cabo la
45 hibridación con el oligonucleótido. En algunos ejemplos determinados, dicha hibridación con el oligonucleótido se acopla operativamente a otras unidades/otros elementos tales como una unidad de extracción de muestras, una unidad de preparación de muestras y/o una unidad de preparación de sondas.

50 5. Hibridación de la secuencia diana con la sonda: Tras la retirada de las secuencias flanqueadoras, puede proporcionarse la secuencia diana al conjunto de nanoestructuras/nanosensores que comprenden las sondas. Tal hibridación puede producirse en un estado líquido o gaseoso. Como se describe en otras partes de la especificación, la incorporación de la secuencia diana a la sonda puede ocasionar cambios en la carga en las superficies de las nanoestructuras o cerca de sus superficies, o en el seno de las nanoestructuras. La rigurosidad de la hibridación entre las sondas y las secuencias diana (que, en algunos casos, presentan variaciones en su secuencia) puede controlarse manipulando diversos factores tales como pH, concentración salina, y/o temperatura del entorno de reacción. Una vez que las señales son detectadas individual o
55 colectivamente a partir de la pluralidad de nanoestructuras, los datos de dichas señales pueden procesarse adicionalmente, si se desea. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para llevar a cabo la hibridación. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de hibridación se acopla operativamente a otras unidades/otros elementos tales como una unidad de extracción de muestras, una unidad de preparación de muestras y/o una unidad de preparación de sondas.

60 6. Procesamiento de datos: en función de las configuraciones experimentales, pueden obtenerse diversos tipos de datos, que indiquen, por ejemplo, la presencia de determinado(s) alelo(s) de mutación del gen APC en el individuo analizado, la abundancia de determinado(s) alelo(s) de mutación del gen APC en el individuo analizado, y la determinación de una mutación o mutaciones concretas del gen APC en el individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para procesar los datos obtenidos de las

nanoestructuras. En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de procesamiento de datos se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.

- 5 7. Generación de informes: una vez que se han procesado los datos de detección y que se han obtenido los resultados deseados (por ejemplo, presencia y/o abundancia de las mutaciones relevantes en el gen APC, y el tipo de cáncer correspondiente), puede generarse un informe sobre dicha información, y puede proporcionarse dicho informe al profesional sanitario y/o al individuo analizado. En algunos casos, un biosensor puede comprender una unidad o elemento configurados para generar un informe obtenido a partir de las nanoestructuras/los nanosensores.
- 10 En algunos ejemplos determinados, dicha unidad de generación de informes se acopla operativamente a otras unidades u otros elementos de un biosensor; otra opción es usarla operativamente por separado.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana, y dicho método comprende:
 - 5 5 amplificar la secuencia de nucleótidos diana y, opcionalmente, al menos una secuencia de nucleótidos adicional, con uno o más cebadores que comprenden:
 - una región 5' ancla configurada para hibridarse con una secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana, y que es al menos parcialmente complementaria de dicha secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana;
 - 10 una región 3' de extensión configurada para hibridarse con una porción de la secuencia de nucleótidos diana; y
 - una región burbuja situada entre las dos regiones mencionadas anteriormente, y dicha región burbuja no es complementaria o es sólo parcialmente complementaria de la secuencia de nucleótidos diana,
 - en el que se retira al menos parte de la región 5' ancla, después de la amplificación, de una secuencia de nucleótidos amplificada, generándose así una sonda y opcionalmente el cebador o cebadores comprenden secuencias de
 - 15 nucleótidos que son escindidas por una nucleasa, y la mencionada sonda comprende parte de la secuencia de nucleótidos amplificada que queda tras la retirada de la mencionada al menos parte de la región 5' ancla;
 - poner en contacto el analito con la sonda en condiciones de hibridación; y
 - detectar una señal asociada a la presencia, nivel y/o variación en la secuencia, de la secuencia de nucleótidos diana presente en el analito.
 - 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que las mencionadas secuencias de nucleótidos escindidas por la mencionada nucleasa están presentes en la región burbuja o en la región 5' ancla o en ambas y, opcionalmente, en el que dichas secuencias de nucleótidos escindidas por dicha nucleasa no están presentes ni en la región 3' ancla ni en la secuencia de nucleótidos diana.
 - 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda se inmoviliza en un medio conductor y, dicho medio conductor se selecciona del grupo que comprende un nanoalambre, un nanotubo, un nanohuevo, un nanoporo, una nanopera y cualquier otra nanoestructura capaz de conducir una corriente eléctrica.
 - 30 4. El método de la reivindicación 3, en el que la señal se genera cuando la hibridación del analito con la sonda ocasiona un cambio en la carga eléctrica de la sonda.
 5. El método de la reivindicación 1, en el que se detectan las variaciones en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana o en el que se detectan simultáneamente dos o más de las siguientes circunstancias: presencia de la
 - 35 secuencia de nucleótidos diana, nivel de la secuencia de nucleótidos diana y variación en la secuencia de la secuencia de nucleótidos diana.
 6. El método de la reivindicación 1, que además comprende dos o más tipos de sondas, y cada uno de esos tipos de sondas comprende secuencias de nucleótidos distintas.
 - 40 7. El uso de un cebador integrado por un oligonucleótido en un método de detección de un analito que comprende una secuencia de nucleótidos diana conforme con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 6, y el cebador integrado por un oligonucleótido comprende:
 - una región 5' ancla, en la que dicha región 5' ancla se configura de manera que se hibrida con una secuencia de
 - 45 nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana, y es al menos parcialmente complementaria de dicha secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana;
 - una región 3' de extensión, en la que dicha región 3' de extensión se configura de manera que se hibrida con una porción de la secuencia de nucleótidos diana; y
 - una región burbuja situada entre la región 5' ancla y la región 3' de extensión, en la que la región 5' ancla o la región
 - 50 burbuja, o ambas, comprenden una secuencia de escisión por una nucleasa.
 8. El uso de un cebador integrado por un oligonucleótido conforme con la reivindicación 7, en el que:
 - la región 5' ancla tiene de unos 15 a 30 pb y es complementaria en aproximadamente un 70-100% de la antedicha
 - secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana;
 - 55 la región 3' de extensión tiene de 5 a 30 pb y es complementaria en aproximadamente un 80-100% de la mencionada porción de la secuencia de nucleótidos diana; y en la que se optimiza la temperatura de fusión de la región 3' de extensión hibridada con la porción de la secuencia de nucleótidos diana, de manera tal que la región 3' de extensión sólo puede hibridarse con la porción de la secuencia de nucleótidos diana en condiciones selectivas cuando la región 5' ancla se hibrida con la mencionada secuencia de nucleótidos situada fuera de la secuencia de nucleótidos diana; y
 - 60 la región burbuja es complementaria, en aproximadamente un 50% o menos, de la secuencia de nucleótidos diana, y comprende una secuencia de escisión por una nucleasa.

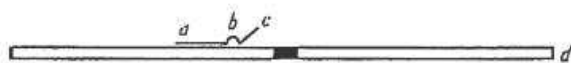
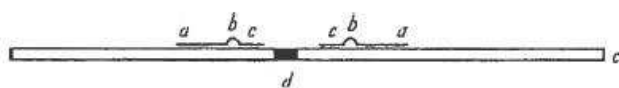
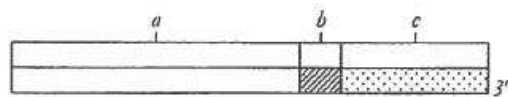
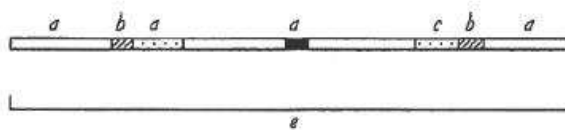
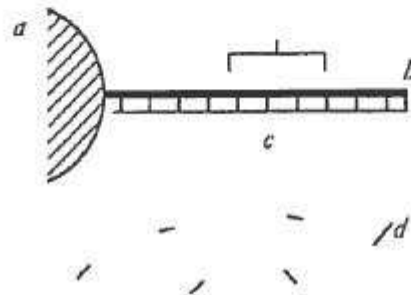
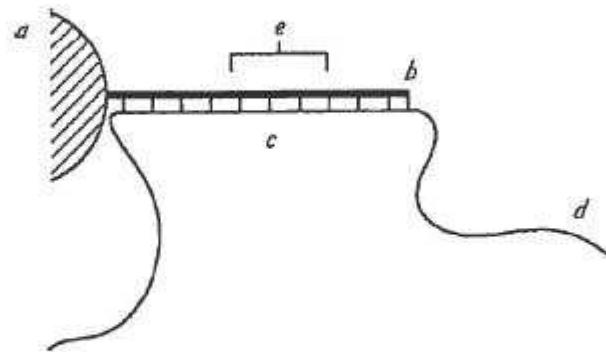


FIG. 1



b c d c b

FIG. 2



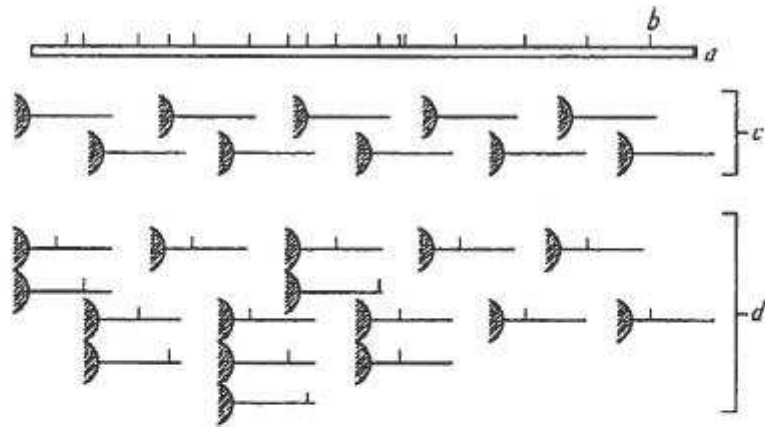


FIG. 3