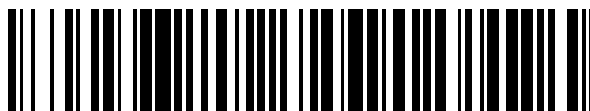


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 131**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/EP2014/064097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14739093 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 3017064**

54 Título: **Procedimiento y disposición para detectar eventos de unión de moléculas**

30 Prioridad:

02.07.2013 DE 102013011304

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

18.08.2017

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (100.0%)
MommSENstrasse 13
01069 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**LIN, WEILIN;
WIEDUWILD, ROBERT;
MANNOCCI, LUCA;
HERRMANN, JANA;
ZHANG, YIXIN y
REDDAVIDE, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 630 131 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y disposición para detectar eventos de unión de moléculas

La invención se refiere a un procedimiento y una disposición para detectar eventos de unión de moléculas, que son adecuados en particular para aplicaciones de alto rendimiento.

5 El conocimiento y la comprensión de eventos de unión e interacciones de unión entre biomoléculas constituye un campo de trabajo esencial de la investigación biológica, farmacéutica y médica. El objetivo es, por lo tanto, localizar posibles copartícipes de unión y caracterizar sus rutas de señalización para, con el conocimiento obtenido de ello, poder desarrollar terapias o fármacos. Por ejemplo, se descubren sustancias activas farmacéuticamente relevantes con ayuda de procedimientos de cribado en los cuales se ensayan, en cuanto a sus propiedades de unión, un gran número de moléculas o estructuras catalogadas en bibliotecas, una frente a otra o frente a estructuras diana conocidas. Así, del gran número de estructuras catalogadas se pueden determinar, por ejemplo, las estructuras que se unen a una proteína patógena y, por consiguiente, la inhiben. Para detectar tales estructuras, generalmente se unen covalentemente las estructuras objetivo (estructuras diana) conocidas a investigar, como fase estacionaria, a la superficie de un "biochip", poniéndose después en contacto por inundación las dianas así inmovilizadas, con una fase móvil, un líquido en el que están contenidas numerosas estructuras de unión (moléculas o partes de moléculas) posibles. Durante este contacto se puede determinar, por ejemplo mediante métodos basados en resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) o en microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), la asociación y disociación entre las dianas inmovilizadas y las estructuras móviles (moléculas o partes de moléculas).

20 Resulta obvio que, en vista del gran número de posibles copartícipes de unión, es necesario aplicar procedimientos de alto rendimiento adecuados, con los cuales se pueda procesar dentro de un tiempo aceptable el gran número de posibles combinaciones de unión. En particular, debido a la ampliación constante de las bibliotecas de sustancias, la presión para lograr mayores tasas de producción está aumentando. Sin embargo, a causa de la fijación covalente de las dianas por el lado del sustrato o el biochip, sólo en condiciones extremas es posible conseguir la separación de las dianas así inmovilizadas. Por lo tanto, es necesario preparar de nuevo, laboriosamente, un biochip para cada diana a investigar. En consecuencia, cuando se realizan, en particular, cribados de alto rendimiento con varias dianas, tales biochips no son suficientemente adecuados.

30 Se conocen ya procedimientos en los que se utiliza la unión entre biotina y estreptoavidina para regenerar un biochip. En este caso se une covalentemente estreptoavidina a la superficie del biochip. En un paso ulterior, se unen ligandos biotinilados a la estreptoavidina inmovilizada y forman una fase estacionaria. Inmovilizados en la fase estacionaria, se pueden ensayar los ligandos en cuanto a sus propiedades de unión. Sin embargo, debido a la elevada afinidad de unión de la biotina hacia la estreptoavidina, que es equivalente a la fuerza de unión de un enlace químico covalente, son necesarias condiciones extremas (por ejemplo, altas temperaturas) para provocar la disociación de los ligandos biotinilados con respecto a la estreptoavidina unida covalentemente. Aunque en principio es posible una escisión de la fase estacionaria formada con los ligandos biotinilados, las condiciones extremas conducen a una desnaturalización parcial o completa de la molécula de estreptoavidina, de modo que no es posible, o lo es solo con una fuerza de unión disminuida, una inmovilización adicional con ligandos biotinilados a estas moléculas de estreptoavidina.

Por tanto, es misión de la presente invención señalar posibilidades para inmovilizar de manera reversible ligandos.

40 Según la invención, esta misión se cumple con un procedimiento según la reivindicación 1 y una disposición según la reivindicación 9.

De las reivindicaciones subordinadas se pueden deducir ejecuciones ventajosas de la presente invención.

45 El procedimiento según la invención comprende las características según la reivindicación 1. En el caso del procedimiento según la invención para detectar eventos de unión de moléculas a una superficie bioactiva, en un paso (I), a al menos una primera molécula, que está inmovilizada mediante un enlace covalente a una superficie bioactiva, se une al menos una segunda molécula, con formación de al menos una unión no covalente específica.

La segunda molécula puede estar funcionalizada de manera que sea apta para fijar o acoplar terceras o cuartas moléculas adicionales. Mediante la puesta en contacto [paso (II)], con una fase móvil que comprende una estructura diana (es decir, un analito), se pueden llevar a cabo entonces experimentos cinéticos (asociaciones y disociaciones) entre las segundas, terceras o cuartas moléculas inmovilizadas y las estructuras diana móviles (analitos).

50 En un paso (II) adicional, se escinde de nuevo la al menos una unión no covalente específica mediante el aporte de una disolución tampón. Aquí, por "escisión" de la unión no covalente específica se puede entender una disociación de la segunda molécula con respecto a la primera molécula, permaneciendo la primera molécula unida covalentemente a la superficie bioactiva, y la segunda molécula, incluidas todas las moléculas unidas a la misma, es eliminada de la superficie. Después del paso (II), se pueden repetir al menos una vez de nuevo los pasos (I) y (II) con las mismas segundas y/o terceras moléculas funcionalizadas y analitos o bien con otras segundas y/o terceras moléculas funcionalizadas y analitos.

Por "superficie bioactiva" se ha de entender una superficie que es adecuada por sus propiedades materiales y/o está funcionalizada o puede funcionalizarse por modificación química de forma que se puede inmovilizar sobre la misma al menos la primera molécula.

5 Por lo tanto, la superficie bioactiva también puede estar configurada con distintas formas geométricas. Así, la superficie bioactiva puede estar configurada, por ejemplo, en forma de chips biosensores o de bioensayos previstos para este fin o bien puede tener una forma esférica si está configurada en forma de nanopartículas o perlas. Así pues, la superficie bioactiva puede estar configurada sobre la superficie de figuras geométricas de diversos tipos.

10 Durante los pasos (I) y (II), la superficie bioactiva puede estar cubierta en todo momento con una disolución tampón (tampón de elución). En el paso (I) se puede utilizar un tampón de unión que ofrezca un entorno favorable a la unión, en particular para las moléculas que han de unirse.

15 Para escindir la unión no covalente específica formado entre la al menos una primera molécula y la al menos una segunda molécula, en el paso (II) se puede poner en contacto la superficie bioactiva con una disolución tampón que tenga al menos una molécula adecuada para escindir la unión no covalente específica, que se una específicamente a la segunda molécula y presente una constante de disociación $K_D(I)$ con respecto a la segunda molécula que sea menor que una constante de disociación $K_D(II)$ de la al menos una primera molécula con respecto a la al menos una segunda molécula.

20 Así, dado que la molécula aportada para la escisión tiene una constante de disociación $K_D(I)$ con respecto a la segunda molécula que es menor que una constante de disociación $K_D(II)$ de la al menos una primera molécula con respecto a la al menos una segunda molécula, la molécula aportada también es adecuada para escindir la unión no covalente específica, ya que la molécula aportada para la escisión tiene una mayor afinidad de unión hacia la segunda molécula que la que tiene la primera molécula hacia la segunda molécula, de manera que la primera molécula es desalojada de la segunda molécula. La escisión se puede realizar de una manera especialmente suave si la concentración de la molécula adecuada para la escisión se incrementa de manera progresiva o continua durante el contacto con la disolución tampón. En este caso, se debería alcanzar al menos una concentración de la molécula adecuada para la escisión equivalente a la concentración de la primera molécula inmovilizada sobre la superficie bioactiva.

25 Como alternativa, también se puede lograr, según la invención, una escisión de la unión no covalente específica poniendo en contacto, en el paso (II), la superficie bioactiva con una disolución tampón que tenga un valor de pH de pH 1 a 4, preferiblemente inferior a pH 3. En este caso se puede lograr una escisión suave mediante una reducción lenta del valor de pH, no debiendo descender de un valor de pH de 1.

30 La unión no covalente específica de la al menos una segunda molécula a la al menos una primera molécula puede considerarse como una inmovilización de una fase estacionaria formada por la al menos una segunda molécula, que puede ser escindida fácilmente en el paso (II) mediante la variación del sistema de tampón, mientras que una fase inferior, que está formada por la al menos una primera molécula, permanece sobre la superficie bioactiva debido a la unión covalente, y la segunda molécula, incluidas todas las moléculas unidas a ella, es eliminada de la superficie. Por tanto, la fase estacionaria formada con la al menos una segunda molécula puede considerarse como fase estacionaria temporal, y sucesivas fases estacionarias temporales pueden tener propiedades diferentes debido a las diferentes inmovilizaciones o funcionalizaciones.

35 Así pues, se puede entender como "fase inferior" la fase que está formada con la al menos una primera molécula y que es adecuada para unir químicamente la fase estacionaria formada con la al menos una segunda molécula. Sin embargo, también se pueden utilizar como fase inferior primeras moléculas unidas covalentemente a la superficie bioactiva, constituidas de una manera compleja. Pueden ser estas, por ejemplo, enlazadores de diamino acoplados a grupos carboxilo activados, que se unen covalentemente a la primera molécula, debiendo tener la primera molécula una funcionalización de amino correspondiente. Es concebible, además, que la primera molécula se inmovilice en una matriz sólida o de tipo gel sobre la superficie bioactiva, por ejemplo de un chip biosensor.

40 Después de la escisión de la fase estacionaria formada con la al menos una segunda molécula, a continuación del paso (II) se puede realizar de nuevo una fijación de una fase estacionaria adicional formada con al menos una segunda molécula.

45 Ventajasamente, en el paso (II) se debe desbordar la superficie bioactiva con un flujo volumétrico prefijable de la disolución tampón, con el fin de poder eliminar específicamente segundas moléculas escindidas y otras moléculas unidas a las mismas. Por lo tanto, el procedimiento es adecuado en particular para aplicaciones en celdas de flujo en las que se puede conseguir de manera sencilla una variación de los flujos de fluidos.

50 El procedimiento según la invención también es adecuado, en particular, para aplicaciones de alto rendimiento, ya que se pueden llevar a cabo, sin interrupciones sustanciales, un gran número de cargas y escisiones sucesivas de diversas segundas moléculas, es decir, diversas fases estacionarias temporales.

55 Además de la fase estacionaria formada con la segunda molécula, en el paso (I) también se pueden aportar para la inmovilización otras moléculas. Así, en el paso (I) puede tener lugar también una fijación de la al menos una tercera

molécula, y opcionalmente de la al menos una cuarta molécula, en particular a través de una unión cooperativa, a la al menos una segunda molécula. De este modo se pueden obtener fases estacionarias con diferentes propiedades.

Preferiblemente, en este caso se debe emplear una primera molécula que tenga una constante de disociación $K_D(II)$, con respecto a la al menos una segunda molécula, que sea mayor que la constante de disociación $K_D(III)$ de la al menos una segunda molécula con respecto a la al menos una tercera o cuarta molécula. De esta manera se puede garantizar que también una fase estacionaria formada en el paso (II) a partir de varias terceras y cuartas moléculas se pueda escindir de forma fiable de la fase inferior formada con la al menos una primera molécula, sin que las segundas, terceras y/o cuartas moléculas se disocien durante la elución, es decir, durante la escisión de la unión específica no covalente (entre la primera y la segunda molécula) en el paso (II). Así, se pueden escindir y eliminar por completo de la fase inferior complejos formados a partir de las segundas, terceras y cuartas moléculas durante el primer paso (I).

Se puede utilizar también una primera molécula que comprenda un primer ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico) monocatenarios o moléculas tales como, por ejemplo, APN (ácido peptidonucleico) o ANB (ácido nucleico bloqueado), o consista en ello, a la que se haya fijado de manera complementaria, al menos por zonas, al menos una segunda molécula que comprenda un segundo ADN o ARN monocatenarios o moléculas APN o ANB, o consista en ello. Aquí, la fase estacionaria está formada por las cadenas individuales de los segundos ADN o ARN o de las moléculas de APN o ANB, que se hibridan o se unen, al menos por zonas, a los primeros ADN, ARN, APN o ANB inmovilizados, con formación de dobles cadenas de ADN o ARN, o de complejos moleculares de APN o ANB. En este caso se debe emplear una disolución tampón fisiológica con un valor de pH de pH 6 a pH 8.

En caso de que se utilice como primera molécula un primer ADN o ARN monocatenario y como segunda molécula un segundo ADN o ARN monocatenario, en donde el segundo ADN o ARN monocatenario se hibrida de manera complementaria como fase estacionaria, al menos por zonas, a los primeros ADN o ARN unidos covalentemente, inmovilizados, en el paso (II) se debe poner en contacto la superficie bioactiva con una disolución tampón que tenga un valor de pH inferior a 3, para provocar la escisión de la fase estacionaria. Si se utilizan APN o ANB como primera y segunda moléculas, se puede proceder de la misma manera.

A consecuencia de la variación del valor de pH durante el contacto con la disolución tampón, las moléculas de ADN/ARN se desnaturalizan, disociándose las cadenas dobles de ADN/ARN formadas en el paso (I) para dar cadenas sencillas de ADN/ARN. Se pueden eliminar entonces los componentes disociados, es decir, en particular las segundas cadenas sencillas de ADN/ARN, por ejemplo con el flujo de disolución tampón. Para conseguir la regeneración y fijación repetidas a las cadenas sencillas de ADN/ARN inmovilizadas, se puede aportar un tampón de neutralización (por ejemplo, tampón de fosfato de pH 7,4), con lo cual se puede lograr en la zona de las primeras moléculas inmovilizadas un valor de pH que equivalga al valor inicial de pH.

La tercera molécula utilizada puede tener un ligando o consistir en ello, en donde el ligando se une, o está unido, preferiblemente de forma covalente, a la tercera molécula. En particular, la tercera molécula comprende un ligando (denominado segundo ligando) que está unido químicamente de manera covalente a la tercera molécula. De manera particularmente preferible, el primer y/o el segundo ligandos están repartidos sobre toda la superficie bioactiva, es decir, la superficie bioactiva está cubierta homogéneamente con el primer y/o el segundo ligandos. El primer y el segundo ligandos pueden ser distintos o iguales. El primer y/o el segundo ligandos se pueden seleccionar de un grupo consistente en proteínas, péptidos, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da, y combinaciones de los mismos. En particular, cuando se utiliza ADN/ARN como primera y segunda moléculas, el ligando puede hibridarse, por ejemplo en forma de una sonda génica (secuencia nucleotídica), al ADN/ARN inmovilizado. No obstante, el ligando también puede acoplarse en forma de una proteína al ADN/ARN.

Como se ha descrito ya en lo que antecede, se pueden realizar más pasos (II), en particular entre los pasos (I) y (II), por ejemplo para detectar eventos de unión de ligando-analito, preferiblemente por medio de espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), medición de interferencia luminosa (LIM) y/o microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), sin que se afecte con ello a la estabilidad de unión de la fase estacionaria unida a la fase inferior. Preferiblemente, se pone en contacto la superficie bioactiva con una disolución que comprende al menos una molécula de analito determinada, preferiblemente sólo una molécula de analito determinada (por ejemplo, una proteína como molécula de analito). A continuación se determina, a través de una medición analítica, el evento de unión de la molécula de analito a la superficie bioactiva. Entra aquí en consideración, como copartícipe de unión para la molécula de la solución, el ligando que está unido a la al menos una segunda molécula. Si la tercera molécula comprende asimismo un ligando (denominado segundo ligando), entonces este ligando también entra en consideración como copartícipe de unión, siendo la unión particularmente fuerte si ambos ligandos participan en la unión a la molécula de analito. La primera, segunda y/o tercera moléculas sirven simplemente como plataforma para el o los ligandos, y no deben participar en la unión al analito. Por lo tanto, con el procedimiento según la invención se pueden ofrecer, de manera específica y reversible, ligandos potenciales para un analito conocido y medir eventos de unión entre moléculas de analito y ligandos. En particular, cuando se aplica con, y sobre, partículas o perlas, se pueden utilizar métodos (Perkin Elmer) que se basan en ALPHA (siglas inglesas de "ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada") para detectar interacciones

- 5 proteína-proteína. Además, es concebible el uso de sistemas de clasificación de partículas basados en fluorescencia, por ejemplo citometría de flujo o FACS (siglas inglesas de "clasificación de células activada por fluorescencia"), en donde se pueden detectar mediante fluorescencia o quimioluminiscencia fijaciones moleculares o interacciones molécula-molécula. En este caso pueden ser necesarios, además, otros pasos o incubaciones, por ejemplo para marcar con colorantes fluorescentes.
- Para formar la fase inferior, la superficie bioactiva formada sobre nanopartículas, perlas, bioensayos o chips biosensores puede presentar grupos carboxilo activables, a los que se pueden acoplar otras (primeras) moléculas.
- 10 La disposición según la invención comprende las características según la reivindicación 9. La disposición según la invención para detectar eventos de unión de moléculas tiene al menos una primera molécula que está inmovilizada sobre una superficie bioactiva mediante un enlace covalente. La disposición según la invención tiene, además, al menos una segunda molécula que está unida a la al menos una primera molécula mediante una unión no covalente específica, siendo escindible la unión no covalente específica.
- 15 La ventaja determinante de la disposición según la invención reside en el hecho de que se puede inmovilizar una fase estacionaria temporal formada con la segunda molécula, y esta se puede eliminar de nuevo en caso necesario, de forma que la superficie bioactiva queda disponible para la fijación de otras segundas moléculas. Ventajosamente, la fase inferior formada a partir de la al menos una primera molécula no se ve afectada en sus propiedades de unión por la escisión de la fase estacionaria temporal y, por lo tanto, se puede restaurar casi por completo sin necesidad de una laboriosa preparación.
- 20 Como ya se ha indicado más arriba, se entiende por superficie bioactiva una superficie que es adecuada en virtud de sus propiedades materiales, y/o está funcionalizada o puede funcionalizarse por modificación química, de manera que se puede inmovilizar covalentemente sobre la misma al menos la primera molécula. Por lo tanto, la disposición según la invención es adecuada, en particular, para chips biosensores, bioensayos, nanopartículas, perlas y lechos de perlas (o lechos de cuerpos moldeados) y, en particular, para celdas de flujo.
- 25 La disposición según la invención o al menos la superficie bioactiva debe estar humedecida con una disolución tampón fisiológica (pH neutro), que la proteja de la desecación. Para ello, la disposición según la invención también puede estar rodeada por una carcasa.
- 30 A la al menos una segunda molécula puede unirse preferiblemente al menos una tercera y/o cuarta molécula (en donde, en el caso de la cuarta molécula, se trata de la molécula de analito), en particular a través de una unión cooperativa. De este modo, la fase estacionaria puede presentar un gran número de formas de configuración, por ejemplo una inmovilización de pares de ligandos y analitos que interactúan entre sí.
- 35 La escisión de la unión no covalente específica formada entre la al menos una primera molécula y la al menos una segunda molécula puede conseguirse por ponerla en contacto con una disolución tampón que comprenda al menos una molécula adecuada para escindir la unión no covalente específica, que tenga una constante de disociación $K_D(I)$ con respecto a la segunda molécula que sea menor que una constante de disociación $K_D(II)$ de la al menos una primera molécula con respecto a la al menos una segunda molécula.
- 40 La primera molécula puede tener una constante de disociación $K_D(II)$ con respecto a la al menos una segunda molécula que sea mayor que la constante de disociación $K_D(III)$ de la al menos una segunda molécula con respecto a la al menos una tercera o cuarta molécula. De este modo se puede garantizar la escindibilidad de una fase estacionaria formada con la al menos una segunda molécula y la tercera y/o cuarta molécula, sin que se disocie la fase estacionaria en sí. Por consiguiente, los complejos formados a partir de la al menos una segunda molécula y la tercera y/o cuarta moléculas, permanecen incluso después de la escisión de la fase estacionaria y, por lo tanto, son eliminados de la superficie.
- 45 En una realización ventajosa adicional de la disposición según la invención, la primera molécula también puede comprender al menos un primer ADN/ARN monocatenario o, respectivamente, APN o ANB, o puede estar formada por ello, a la cual está unida de manera complementaria, al menos por zonas, una segunda molécula que comprende un segundo ADN/ARN monocatenario o, respectivamente, APN o ANB, o está formada por ello. En este caso, el segundo ADN/ARN o, respectivamente, APN o ANB forma la fase estacionaria escindible, siendo las uniones no covalentes específicas formadas entre el primer ADN/ARN o, respectivamente, APN o ANB y el segundo ADN/ARN o, respectivamente, APN o ANB, escindibles por contacto con una disolución tampón que tenga un valor de pH que sea inferior a pH 3.
- 50 Para determinar eventos de unión entre ligandos y analitos (estructuras diana), se puede inundar o poner en contacto la fase estacionaria con una fase líquida móvil en la que estén presentes los analitos. Además de la al menos una segunda molécula, la al menos una tercera molécula puede tener un ligando o consistir en ello, estando el ligando unido preferiblemente de forma covalente a la tercera molécula. De manera particularmente preferible, el primer y/o el segundo ligando están repartidos sobre toda la superficie bioactiva, es decir, la superficie bioactiva está cubierta homogéneamente con el primer y/o segundo ligandos. Los ligandos pueden ser, por ejemplo, proteínas, péptidos, lípidos, ADN, APN, ANB y/o ARN, oligosacáridos, compuestos de bajo peso molecular (moléculas pequeñas) con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible

≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da, y también combinaciones de los mismos. Durante la inundación o el contacto con la fase móvil, los analitos (estructuras diana) contenidos en la misma interactúan con los ligandos inmovilizados.

5 En otra forma de realización, la fase inferior de la disposición según la invención puede tener otras moléculas unidas covalentemente, adecuadas para inmovilizar la primera molécula, o bien complejos formados a partir de moléculas. Estas moléculas pueden ser moléculas que tengan un grupo carboxilo.

10 La disposición según la invención es adecuada en general para detectar analíticamente eventos de unión de moléculas (por ejemplo, de ligandos inmovilizados sobre la disposición y determinadas moléculas analito), en particular para aplicaciones de alto rendimiento en celdas de flujo y para mediciones por medio de resonancia de plasmón superficial (SPR), medición de interferencia luminosa (LIM) y/o mediante microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Con la disposición se pueden detectar selectivamente eventos de unión de moléculas analito específicas, desde una disolución a la superficie bioactiva de la disposición. En este caso, se considera copartícipe de unión para la molécula de analito de la disolución el ligando que comprende al menos una segunda molécula. Si la tercera molécula tiene igualmente un ligando, este ligando también se considera copartícipe de unión, siendo la unión particularmente fuerte si ambos ligandos participan en la unión a la molécula de analito. La primera, segunda y/o

15 tercera moléculas, sirven meramente como plataforma para el o los ligandos, y no deben participar en la unión al analito. Así, con la disposición según la invención se pueden ofrecer, de manera específica y reversible, ligandos potenciales para un analito conocido, y medirse eventos de unión entre moléculas de analito y ligandos. La disposición según la invención se puede utilizar también para detectar interacciones molécula-molécula, en particular cuando se aplica con, o sobre, partículas o perlas, y también para métodos de medida o procedimientos de

20 detección que se basan en el principio de la clasificación de partículas activada por fluorescencia, tales como, por ejemplo, la citometría de flujo FACS (clasificación de células activada por fluorescencia). Es obvio que, en este caso, se utilizan marcadores fluorescentes adecuados que se unen específicamente a al menos una molécula unida o inmovilizada sobre la superficie bioactiva.

La disposición según la invención encuentra una aplicación adicional en conjunción con ALPHA.

25 En lo que sigue se describen la presente invención y sus ejecuciones ventajosas por medio de ejemplos de realización.

Las Figuras muestran:

la Figura 1, una carga y regeneración de un chip biosensor,

30 la Figura 2a, un ejemplo de una hibridación reversible de cadenas sencillas de ADN (A'; A), recurriendo a un diagrama de señal QCM

las Figuras 2b-2c, experimentos ilustrativos de la detección de eventos de unión (asociación y disociación) entre moléculas inmovilizadas y móviles, recurriendo a diagramas de señal QCM

la Figura 3: una representación esquemática del principio de procedimiento según la invención, con referencia a una forma de realización adicional.

35 La Figura 1 muestra una carga y regeneración de un chip biosensor, en donde el chip biosensor presenta como primera molécula, en el estado inicial A, una inmovilización de cadenas sencillas 3 de ADN unidas covalentemente. En este caso, las cadenas sencillas 3 de ADN están inmovilizadas covalentemente sobre la superficie bioactiva 1 en complejos 2 unidos covalentemente. Con el número de referencia 8 se designa una fase inferior que está formada al menos por los complejos 2 con las cadenas sencillas 3 de ADN unidas covalentemente a los mismos. En el paso (I)

40 del procedimiento, se pone en contacto la fase inferior 8 con una disolución tampón en la que están contenidas segundas cadenas sencillas 4 de ADN como segunda molécula. En este caso, las segundas cadenas sencillas 4 de ADN presentan ligandos 6 acoplados covalentemente. Durante el contacto, las segundas cadenas sencillas 4 de ADN se hibridan complementariamente, es decir, específicamente y de manera no covalente, a las cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas, con formación de cadenas dobles de ADN. En este caso, se designa con el número de

45 referencia 7 la zona que forma la fase estacionaria superior.

En el paso (II) del procedimiento se pone en contacto, por inundación, la fase estacionaria 7 con una fase móvil, pudiendo asociarse a los ligandos 6 estructuras 9 (analitos) presentes en la fase móvil. Durante el paso (II) del procedimiento, la asociación y disociación se pueden determinar, por ejemplo, mediante microbalanza de cristal de cuarzo.

50 Para la regeneración (escisión de la fase estacionaria temporal, número de referencia 7), en el paso (II) se pone en contacto la superficie bioactiva 1 con una disolución tampón, mediante inundación con un caudal prefijable, presentando la disolución tampón inicialmente un valor de pH que se sitúa en el intervalo de pH 8 a pH 6 y, durante el contacto, se reduce lentamente hasta alcanzar un valor de pH inferior a 3.

55 A consecuencia de la variación del valor de pH durante el contacto con la disolución tampón, las cadenas dobles formadas a partir de las cadenas sencillas 3 y 4 de ADN se desnaturalizan, disociándose las segundas cadenas

sencillas 4 de ADN de las primeras cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas. De este modo se escinde la fase estacionaria 7 y se elimina con el flujo de la disolución tampón. Se aporta a continuación un tampón de neutralización o tampón de elución que tiene un valor de pH fisiológico en el intervalo de pH 6 a pH 7, con lo que se pueden renaturalizar las cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas.

5 En la Figura 2a se puede apreciar, gracias a un diagrama de señal QCM, la hibridación de dos cadenas sencillas (A'; A) de ADN, como se ha descrito más arriba, en donde se hibridan cadenas sencillas A de ADN que están presentes en una fase móvil (tampón de hibridación) y tienen una conjugación con ciclosporina A (CsA), a cadenas sencillas A' de ADN inmovilizadas. Para escindir la segunda molécula inmovilizada por la hibridación, es decir, el ADN A conjugado con CsA, se puede emplear HCl 2,5 mM con el cual se inunda o se incuba, durante 120 s, la superficie del chip sensor. Como se puede deducir asimismo del diagrama de la Figura 5a, los ciclos de hibridación, es decir, acoplamiento repetidos de ADN con las cadenas sencillas A' de ADN inmovilizadas, muestran señales de QCM 51, 52 y 53 correspondientes.

10 En las Figuras 2b a 2d se representan, recurriendo a diagramas de señal QCM, experimentos cinéticos para determinar los procesos de unión (asociación y disociación) entre las moléculas de CsA inmovilizadas descritas en la Figura 2a y ciclofilina A (CypA, Figura 2b), y también las variantes de ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 2c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 2d).

15 En primer lugar, el chip de QCM descrito en la Figura 2a, sobre el cual están inmovilizadas las moléculas de CsA acopladas a ADN A, se lava con tampón de unión a proteína (HEPS 10 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween 20, ASB (albúmina sérica de bovino) 1 μ M, pH 7,4), añadiéndose en este caso al tampón de unión a proteína, respectivamente, ciclofilina A (CypA, Figura 2b), ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 2c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 2d) en distintas concentraciones. Las correspondientes concentraciones de moléculas de ciclofilina se manifiestan en señales QCM más intensas, como se puede deducir de los diagramas de las Figuras 2b a 2d. Las inyecciones (contactos) de las distintas concentraciones de moléculas de ciclofilina A (CypA, Figura 2b), ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 2c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 2d) se realizaron en cada caso con un flujo volumétrico de 25 μ l/minuto, a 22°C, durante un tiempo de inyección de 84 s.

20 La Figura 2b muestra la fijación y disociación de CypA al chip sensor QCM en el noveno ciclo de hibridación o, respectivamente, deshibridación. En este caso se utilizó CypA en las siguientes concentraciones: 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM y 200 nM. Después de medir la señal QCM, se realizó en cada caso una limpieza del chip sensor, mediante inundación con tampón de laurilsulfato sódico (SDS) al 1% durante 120 s.

30 La Figura 2c muestra la fijación y disociación de CypA mutante al chip sensor QCM, aportándose la CypA mutante en concentraciones de 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM y 1.000 nM.

La Figura 2d muestra la fijación y disociación de Cyp40 al chip sensor QCM, aportándose la Cyp40 en concentraciones de 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM y 1.000 nM.

35 Durante la ejecución de los experimentos de fijación (2b a 2d), en ninguno de los chips sensores QCM según la invención utilizados en las Figuras 2b a 2d se pudo constatar una deshibridación de la doble hélice (A'; A) de ADN como consecuencia del proceso de lavado con la disolución tampón de SDS al 1%. La escisión o, respectivamente, deshibridación de la cadena A de ADN acoplada a CsA sólo se puede lograr mediante la reducción del pH.

40 La Figura 3 muestra una representación esquemática de un principio de procedimiento según la invención para detectar eventos de unión de moléculas a una superficie bioactiva de un chip biosensor, en donde se indica con las flechas el progreso del procedimiento. En el estado inicial A, la superficie bioactiva 1 del chip biosensor está cubierta por completo con un tampón de unión, y presenta una inmovilización de al menos una primera molécula 3 que consiste en ADN monocatenario y que está unida químicamente de manera covalente al chip 1. Esta inmovilización química covalente se puede conseguir, por ejemplo, haciendo reaccionar un chip que tiene grupos carboxilo libres, con ADN monocatenario que tiene grupos amino libres (NH₂-ssDNA) en presencia de EDC/sNHS. De manera análoga, se puede hacer reaccionar con un NH₂-ssDNA 4, 5, y EDC/sNHS, cualquier ligando 6a, 6b que tenga un grupo carboxilo libre. De este modo se pueden generar segundas moléculas 4 y/o terceras moléculas 5 según la invención, que se han unido químicamente de forma covalente a un ligando 6a, 6b.

45 En un paso (I), primeramente se une (se hibrida) a la al menos una primera molécula 3 una segunda molécula 4, consistente ahora en ADN monocatenario, con formación de al menos una unión no covalente específica (uniones de puente de hidrógeno entre las bases nucleotídicas). La segunda molécula 4 presenta una unión (por ejemplo, químicamente covalente) a un ligando 6a. Además, en el paso (I) también se puede unir una tercera molécula 5 a la segunda molécula 4. La tercera molécula presenta un enlace (por ejemplo, químicamente covalente) a un ligando 6b (denominado segundo ligando), siendo diferentes en este ejemplo los dos ligandos 6a, 6b.

50 En el paso (II) del procedimiento, se ponen en contacto las moléculas con ligandos mediante inundación con una fase móvil, pudiéndose asociar las moléculas 9 presentes en la fase móvil (por ejemplo, una proteína específica en calidad de analito) a los ligandos 6a, 6b. Durante el paso (II) del procedimiento, la asociación y disociación entre los ligandos inmovilizados 6a, 6b y las estructuras 9 se pueden determinar analíticamente, por ejemplo mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial.

En el paso (II), se pone en contacto (no mostrado) la superficie bioactiva 1 con una disolución tampón que tiene un valor de pH inferior a tres, mediante inundación con un flujo volumétrico prefijable. Gracias al bajo valor de pH, se escinde la hibridación de los ADN monocatenarios (disociación), y la primera molécula 3 inmovilizada químicamente de forma covalente sobre la superficie 1 del biochip permanece en su lugar, es decir, se regenera el biochip y queda listo para un nuevo ensamblaje con segundas y opcionalmente terceras moléculas. Por consiguiente, todo el procedimiento es reversible, de modo que el biochip se puede utilizar sucesivamente muchas veces para las mediciones.

Después del paso (II), se puede lavar la superficie bioactiva 1 con un tampón de elución (preferiblemente tampón de fosfato (PBS) de pH 7) para ajustar el valor de pH desde pH 3 a un valor de pH neutro.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de un ejemplo de realización del procedimiento según la invención, recurriendo a una carga y regeneración de un chip biosensor, en donde el chip biosensor presenta como primera molécula, en el estado inicial A, una inmovilización de cadenas sencillas 3 de ADN unidas covalentemente. En este caso, las cadenas sencillas 3 de ADN están inmovilizadas covalentemente sobre la superficie bioactiva 1 en complejos 2 unidos covalentemente. Con el número de referencia 8 se designa una fase inferior que está formada al menos por los complejos 2 con las cadenas sencillas 3 de ADN unidas covalentemente a los mismos. En el paso (I) del procedimiento, se pone en contacto la fase inferior 8 con una disolución tampón en la que están contenidas segundas cadenas sencillas 4 de ADN como segunda molécula. En este caso, las segundas cadenas sencillas 4 de ADN presentan ligandos 6 acoplados covalentemente. Durante el contacto, las segundas cadenas sencillas 4 de ADN se hibridan complementariamente, es decir, específicamente y de manera no covalente, a las cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas, con formación de cadenas dobles de ADN. En este caso, se designa con el número de referencia 7 la zona que forma la fase estacionaria superior

En el paso (II) del procedimiento se pone en contacto, por inundación, la fase estacionaria 7 con una fase móvil, pudiendo asociarse a los ligandos 6 estructuras 9 (analitos) presentes en la fase móvil. Durante el paso (II) del procedimiento, la asociación y disociación se pueden determinar, por ejemplo, mediante microbalanza de cristal de cuarzo.

Para la regeneración (escisión de la fase estacionaria temporal, número de referencia 7), en el paso (II) se pone en contacto la superficie bioactiva 1 con una disolución tampón, mediante inundación con un caudal prefijable, presentando la disolución tampón inicialmente un valor de pH que se sitúa en el intervalo de pH 8 a pH 6 y, durante el contacto, se reduce lentamente hasta alcanzar un valor de pH inferior a 3.

A consecuencia de la variación del valor de pH durante el contacto con la disolución tampón, las cadenas dobles formadas a partir de las cadenas sencillas 3 y 4 de ADN se desnaturalizan, disociándose las segundas cadenas sencillas 4 de ADN de las primeras cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas. De este modo se escinde la fase estacionaria 7 y se elimina con el flujo de la disolución tampón. Se aporta a continuación un tampón de neutralización o tampón de elución que tiene un valor de pH fisiológico en el intervalo de pH 6 a pH 7, con lo que se pueden renaturalizar las cadenas sencillas 3 de ADN inmovilizadas.

La Figura 3 muestra un ejemplo de realización de la disposición de la invención para detectar eventos de unión de moléculas, con al menos una primera molécula 3 que está inmovilizada sobre una superficie bioactiva 1 mediante un enlace covalente 20. En este caso, la primera molécula 3 unida covalentemente forma una capa inferior 8. Se designa, además, con el número de referencia 4, una segunda molécula que está unida mediante una unión no covalente específica a la al menos una primera molécula 3. En el presente ejemplo, la primera molécula 3 es el derivado de biotina destiobiotina y la segunda molécula 4 es estreptoavidina, presentando la destiobiotina 3 una constante de disociación K_D con respecto a la estreptoavidina 4 en el intervalo de 10^{-6} M a 10^{-10} M.

A la estreptoavidina 4, que forma una capa cerrada, se fijan otras terceras moléculas 5, que presentan un acoplamiento de un ligando 6. En el ejemplo presente, las moléculas 5 son moléculas de biotina a las que están unidos covalentemente los ligandos 6.

La fase estacionaria superior 7, formada con la estreptoavidina 4 y los ligandos 5/6 biotinilados (que contienen moléculas de biotina) puede escindirse de la superficie bioactiva 1 mediante la escisión de la unión no covalente específica entre la destiobiotina 3 y la estreptoavidina 4.

La unión no covalente específica formada entre la destiobiotina 3 y la estreptoavidina 4 se escinde poniendo en contacto la superficie bioactiva 1 con una disolución tampón que contiene moléculas de biotina libres, sin unir. La constante de disociación de biotina y estreptoavidina 4 se sitúa por debajo de 10^{-14} M, de manera que las moléculas de biotina libres tienen una afinidad hacia la unión específica con estreptoavidina que es mayor que la de la destiobiotina 3. Por consiguiente, las moléculas de biotina aportadas desplazan a la destiobiotina 3 de los sitios de unión de la estreptoavidina 4, con lo cual la fase estacionaria superior 7 se escinde de la fase inferior 8. Dependiendo del método de medida (por ejemplo, SPR, LIM o QCM), la disposición según la invención puede estar configurada correspondientemente. Por lo tanto, la disposición de la invención entra en consideración, por ejemplo, conjuntamente con chips o bioensayos de sensor SPR, LIM o QCM. Si la disposición según la invención se implementa sobre, y/o con, nanopartículas o perlas, también son concebibles otros métodos de medida o métodos

de detección, además de los métodos mencionados de SPR, QCM o LIM (medición de interferencia luminosa), que se basen en el principio de la clasificación de partículas activada por fluorescencia. Es obvio que, en este caso, se utilizan marcadores fluorescentes adecuados que se unen específicamente a al menos una molécula unida o inmovilizada sobre la superficie bioactiva.

- 5 En lo que sigue se explica con más detalle, en un ejemplo, la preparación u obtención de amino-PEG-destiobiotina, que, debido a su funcionalización con amino y PEGilación (PEG significa polietilenglicol), es adecuada en particular para fijarse a enlazadores de diamino inmovilizados y, así, formar la fase inferior (Figura 1, número de referencia 8).

Para preparar amino-PEG-destiobiotina se combinan en primer lugar 107,5 mg de destiobiotina con 500 mg de resina de O-bis-(aminoetil)etilenglicol-tritilo, utilizando 165 μ l de N-metilmorfolina y 170 mg de HBTU (reactivo de acoplamiento peptídico) en 2 ml de dimetilformamida (DMF), y se agitan durante 30 minutos. A continuación, se lava la resina con DMF y diclorometano (DCM). Para separarlo, se incuba la resina durante 20 minutos con 3 ml de una disolución de incubación, consistente en 3 ml de DCM y 2% de ácido trifluoroacético (TFA). A continuación, se lava la resina dos veces, con 1 ml de la disolución de incubación cada vez. En el paso siguiente, se precipita el producto separado con, o en, 30 ml de éter dietílico, y se filtra el precipitado con un filtro de 0,22 μ m. Después se disuelve en agua el retenido y se purifica mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase invertida (CLAE-FI). Para ello se puede utilizar, por ejemplo, un aparato de CLAE-FI ProStar, Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU., que está equipado con una columna C18 de AXIA 100A, tamaño de partícula 10 μ m, 250x30 mm, Phenomenex, Torrance, EE.UU., eluyéndose la columna durante 50 minutos con un gradiente lineal que comienza en 5% hasta 95%. El gradiente se prepara con dos disoluciones A y B, de las cuales la solución A contiene 99,9% de agua y 0,1% de TFA y la disolución B contiene 94,9% de acetonitrilo, 5% de agua y 0,1% de TFA. Para determinar la fracción buscada de la amino-PEG-destiobiotina se puede utilizar, por ejemplo, espectrometría de masas con ionización por electrospray (EM-IES). La fracción de la amino-PEG-destiobiotina se puede recoger como liofilizado en un aceite.

En lo que sigue, se muestra en otro ejemplo cómo se utiliza o se puede utilizar la amino-PEG-destiobiotina como primera molécula 3 para formar la fase inferior de la disposición según la invención, en particular para formar la superficie bioactiva. Sirve como base, en este caso, una superficie bioactiva de un chip sensor carboxílico.

En primer lugar, se equilibra con tampón de elución (1x PBS, pH 7,4), a razón de 10 μ m/minuto, un chip sensor carboxílico (chip sensor cuya superficie está cargada con grupos carboxilo). Sigue después la incubación del chip sensor durante 300 s con una disolución compuesta de hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) 0,2 M y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) 0,05 M. En la incubación del chip sensor, se funcionalizan los grupos carboxilo de tal manera que son capaces de unirse o acoplarse a la amino-PEG-destiobiotina. En consecuencia, en una incubación adicional se expone durante 300 s la superficie del chip sensor a la destiobiotina PEGilada funcionalizada con amino (2 μ l de aceite de amino-PEG-destiobiotina en 300 μ l de tampón acetato 10 mM, pH 4,75). Después de la incubación, se bloquean los grupos carboxilo activados restantes con etanolamina 1 M (pH 8). A continuación, se equilibra el chip sensor con tampón de elución 25 μ l/minuto. El resultado se corresponde con un chip de biosensor como el dibujado en la Figura 1 en el estado A, sobre cuya superficie 1 está formada la fase inferior 8, en donde el número de referencia 3 representa la amino-PEG-destiobiotina. La superficie del chip sensor 1 así funcionalizada es adecuada para la fijación reversible de otras segundas moléculas 4, preferiblemente estreptoavidina.

En la Figura 4 está representada a modo de ejemplo, recurriendo a un diagrama QCM, la fijación reversible de la estreptoavidina a un chip sensor funcionalizado con amino-PEG-destiobiotina. En este caso se trata, por consiguiente, de una aplicación del dispositivo según la invención con un chip sensor QCM. Después de equilibrar con 25 μ l/minuto de tampón de elución, se pone en contacto con estreptoavidina, durante 300 s, el chip sensor funcionalizado con amino-PEG-destiobiotina. En la Figura 4, estos 300 s se representan por la sección entre los números de referencia 41 y 42. Aquí, el contacto con estreptoavidina genera una señal fuerte de QCM (eje Y en Hz).

Tras el contacto con estreptoavidina, se equilibra con tampón de elución la superficie bioactiva del chip sensor, con lo cual la estreptoavidina no unida se elimina junto con la corriente líquida de tampón de elución. Se finaliza el equilibramiento cuando la señal QCM ya no varía sustancialmente, por lo que se puede asumir que en la superficie del chip sensor solamente permanecen moléculas de estreptoavidina unidas a la amino-PEG-destiobiotina. En el caso presente, el equilibramiento con el tampón de elución finalizó después de aproximadamente 51 minutos (número de referencia 43), cuando se pudo medir una señal QCM constante. En la posición indicada por el número de referencia 43, el chip sensor y la superficie del chip sensor son adecuadas para unir otras terceras moléculas o ligandos, en particular, biotinilados. Para tales experimentos cinéticos (asociación y disociación de ligandos y sus analitos), también se puede incubar previamente la estreptoavidina, es decir, antes de la fijación al chip sensor, con compuestos químicos biotinilados o componentes biotinilados (terceros ligandos o moléculas) en proporción 2:1 (componente con respecto a estreptoavidina).

En el paso (II) siguiente se efectúa la regeneración de la superficie bioactiva, entendiéndose por regeneración la escisión de la segunda molécula, es decir, la escisión de la estreptoavidina. Para escindir (disociar) la estreptoavidina, se pone en contacto la superficie bioactiva del chip sensor tres veces, durante 300 s cada vez, con 1 mg/ml de biotina en PBS, manteniéndose en cada caso un caudal volumétrico de 25 μ l/minuto, de forma que se puedan eliminar las moléculas escindidas. El proceso de escisión se puede entenderse recurriendo a las secciones

designadas con los números de referencia 43-44, 44-45, 45-46, en donde la señal QCM es siempre menor. Después de la escisión se efectúa otra carga con estreptoavidina, poniendo la superficie bioactiva del chip sensor otra vez en contacto con estreptoavidina durante 300 s. La nueva carga se puede reconocer por el aumento repentino de la señal QCM en la sección 46-47. Después del contacto con estreptoavidina, se equilibra la superficie del chip sensor con un tampón de elución para eliminar la estreptoavidina no unida o unida inespecíficamente, con el flujo volumétrico del tampón de elución. Como representa el número de referencia 48, incluso con cargas repetidas de estreptoavidina se consigue una fijación de estreptoavidina equivalente a la fijación de estreptoavidina previamente efectuada en la posición 43.

En lo que sigue se explica el procedimiento de la invención en otro ejemplo de realización, utilizando un chip de ADN QCM (sistema Attana A200®).

En un primer paso se lava o se enjuaga el chip QCM, sobre el que están inmovilizadas como primera molécula cadenas sencillas A' de ADN, con un tampón de elución de pH 7,4 compuesto de HEPS (sustancia amortiguadora) 10 mM, NaCl 150 mM y 0,05% de TWEEN 20. A continuación se ponen en contacto cadenas sencillas A de ADN (complementarias), presentes en concentración 1 μ M en tampón de hibridación, que están conjugadas (unidas covalentemente) con moléculas orgánicas (ligandos tales como ciclosporina A), con la superficie del sustrato, es decir, con las cadenas simples A' de ADN. El tampón de hibridación utilizado para ello tiene un pH de 7,4 y puede contener, por ejemplo, HEPS 10 mM y NaCl 150 mM.

En la Figura 5a se puede apreciar, recurriendo a un diagrama de señal QCM, una hibridación de dos cadenas sencillas (A'; A) de ADN como se ha descrito anteriormente, en donde se hibridan cadenas sencillas A de ADN, que están presentes en una fase móvil (tampón de hibridación) y tienen una conjugación con ciclosporina A (CsA), a cadenas sencillas A' de ADN inmovilizadas. Para escindir la segunda molécula inmovilizada por la hibridación, es decir, el ADN A conjugado con CsA, se puede emplear HCl 2,5 mM con el cual se inunda o se incuba, durante 120 s, la superficie del chip sensor. Como se puede deducir asimismo del diagrama de la Figura 5a, los ciclos de hibridación, es decir, acoplamiento repetidos de ADN con las cadenas sencillas A' de ADN inmovilizadas, muestran señales de QCM 51, 52 y 53 correspondientes.

En las Figuras 5b a 5d se representan, recurriendo a diagramas de señal QCM, experimentos cinéticos para determinar los procesos de unión (asociación y disociación) entre las moléculas de CsA inmovilizadas descritas en la Figura 5a y ciclofilina A (CypA, Figura 5b), y también las variantes de ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 5c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 5d).

En primer lugar, el chip de QCM descrito en la Figura 5a, sobre el cual están inmovilizadas las moléculas de CsA acopladas a ADN A, se lava con tampón de unión a proteína (HEPS 10 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween 20, ASB (albúmina sérica de bovino) 1 μ M, pH 7,4), añadiéndose en este caso al tampón de unión a proteína, respectivamente, ciclofilina A (CypA, Figura 5b), ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 5c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 5d) en distintas concentraciones. Las correspondientes concentraciones de moléculas de ciclofilina se manifiestan en señales QCM más intensas, como se puede deducir de los diagramas de las Figuras 5b a 5d. Las inyecciones (contactos) de las distintas concentraciones de moléculas de ciclofilina A (CypA, Figura 5b), ciclofilina A mutante (CypA mutante, Figura 5c) y ciclofilina 40 (Cyp40, Figura 5d) se realizaron en cada caso con un flujo volumétrico de 25 μ l/minuto, a 22°C, durante un tiempo de inyección de 84 s.

La Figura 5b muestra la fijación y disociación de CypA al chip sensor QCM en el noveno ciclo de hibridación o, respectivamente, deshibridación. En este caso se utilizó CypA en las siguientes concentraciones: 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM y 200 nM. Después de medir la señal de QCM, se realizó en cada caso una limpieza del chip sensor, mediante inundación con tampón de laurilsulfato sódico (SDS) al 1% durante 120 s.

La Figura 5c muestra la fijación y disociación de CypA mutante al chip sensor QCM, aportándose la CypA mutante en concentraciones de 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM y 1.000 nM.

La Figura 5d muestra la fijación y disociación de Cyp40 al chip sensor QCM, aportándose la Cyp40 en concentraciones de 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM y 1.000 nM.

Durante la ejecución de los experimentos de fijación (5b a 5d), en ninguno de los chips sensores QCM según la invención utilizados en las Figuras 5b a 5d se pudo constatar una deshibridación de la doble hélice (A'; A) de ADN como consecuencia del proceso de lavado con la disolución tampón de SDS al 1%. La escisión o, respectivamente, deshibridación de la cadena A de ADN acoplada a CsA sólo se puede lograr mediante la reducción del pH.

La Figura 6 muestra una representación esquemática de otro principio de procedimiento según la invención para detectar eventos de unión de moléculas a una superficie bioactiva de un chip biosensor, en donde se indica con las flechas el progreso del procedimiento. En el estado inicial A, la superficie bioactiva 1 del chip biosensor está cubierta por completo con un tampón de unión, y presenta una inmovilización de al menos una primera molécula 3 que consiste en ADN monocatenario y que está unida químicamente de manera covalente al chip 1. Esta inmovilización química covalente se puede conseguir, por ejemplo, haciendo reaccionar un chip que tiene grupos carboxilo libres, con ADN monocatenario que tiene grupos amino libres (NH₂-ssDNA) en presencia de EDC/sNHS. Análogamente, se puede hacer reaccionar con un NH₂-ssDNA 4, 5, y EDC/sNHS, cualquier ligando 6a, 6b que tenga un grupo

carboxilo libre. De este modo se pueden generar segundas moléculas 4 y/o terceras moléculas 5 según la invención, que se han unido químicamente de forma covalente a un ligando 6a, 6b.

5 En un paso (I), primeramente se une (se hibrida) a la al menos una primera molécula 3 una segunda molécula 4, consistente ahora en ADN monocatenario, con formación de al menos una unión no covalente específica (uniones de puente de hidrógeno entre las bases nucleotídicas). La segunda molécula 4 presenta una unión (por ejemplo, químicamente covalente) a un ligando 6a. Además, en el paso (I) también se puede unir una tercera molécula 5 a la segunda molécula 4. La tercera molécula presenta un enlace (por ejemplo, químicamente covalente) a un ligando 6b (denominado segundo ligando), siendo diferentes en este ejemplo los dos ligandos 6a, 6b.

10 En el paso (II) del procedimiento, se ponen en contacto las moléculas con ligandos mediante inundación con una fase móvil, pudiéndose asociar las moléculas 9 presentes en la fase móvil (por ejemplo, una proteína específica en calidad de analito) a los ligandos 6a, 6b. Durante el paso (II) del procedimiento, la asociación y disociación entre los ligandos inmovilizados 6a, 6b y las estructuras 9 se pueden determinar analíticamente, por ejemplo mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial.

15 En el paso (II), se pone en contacto (no mostrado) la superficie bioactiva 1 con una disolución tampón que tiene un valor de pH inferior a tres, mediante inundación con un flujo volumétrico prefijable. Gracias al bajo valor de pH, se escinde la hibridación de los ADN monocatenarios (disociación) y la primera molécula 3 inmovilizada químicamente de forma covalente sobre la superficie 1 del biochip permanece en su lugar, es decir, se regenera el biochip y queda listo para un nuevo ensamblaje con segundas y opcionalmente terceras moléculas. Por consiguiente, todo el
20 procedimiento es reversible, de modo que el biochip se puede utilizar sucesivamente muchas veces para las mediciones.

Después del paso (II), se puede lavar la superficie bioactiva 1 con un tampón de elución (preferiblemente tampón de fosfato (PBS) de pH 7) para ajustar el valor de pH desde pH 3 a un valor de pH neutro.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar eventos de unión de moléculas a superficies bioactivas, en el cual
- en un paso (I),
- 5 a al menos una primera molécula (3), que está inmovilizada mediante un enlace covalente sobre una superficie bioactiva (1), estando la primera molécula (3) seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios,
- se une al menos una segunda molécula (4), con formación de al menos una unión no covalente específica, estando la al menos una segunda molécula (4) seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios, y estando unida o uniéndose la segunda molécula (4) químicamente de forma covalente a un
- 10 ligando (6a),
- se logra una fijación de al menos una tercera molécula (5) a la al menos una segunda molécula (4) a través de al menos una unión no covalente específica, estando la al menos una tercera molécula (5) seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios, y estando unida o uniéndose la al menos una
- 15 tercera molécula (5) covalentemente a un segundo ligando (6b),
- se pone en contacto una primera disolución tampón que contiene una molécula (9) de analito con la superficie (1) y se detectan por medio de un método de medida analítico eventos de unión entre la molécula (9) de analito y el ligando (6a) y segundo ligando (6b),
- en un paso (II),
- 20 se pone en contacto una segunda disolución tampón con la superficie (1) de manera que se escinde la unión no covalente específica entre la primera molécula (3) y la segunda molécula (4) y se eliminan de la superficie moléculas unidas de forma no covalente a la superficie, y
- a continuación de ello, se repiten al menos una vez los pasos (I) y (II).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el ligando (6a) se selecciona del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular
- 25 con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el segundo ligando (6b) se selecciona del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera
- 30 especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el ligando (6a) y el segundo ligando (6b) son iguales o diferentes.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los eventos de unión se detectan por medio de espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie (SPR), medida de interferencia luminosa (LIM) y/o microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la al menos una molécula de analito (9) se selecciona del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se pone en contacto en el paso (II) la superficie bioactiva (1) con la disolución tampón, teniendo la disolución tampón un valor pH inferior a 3.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se pone en contacto la superficie bioactiva (1), después de escindir la unión no covalente específica, con un tampón de neutralización que tiene un valor de pH en el intervalo de pH 6 a pH 8.
- 45 9. Disposición para detectar eventos de unión de moléculas, en la cual
- está inmovilizada al menos una primera molécula (3) sobre una superficie bioactiva (1) mediante una unión covalente, estando la primera molécula (3) seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios, y
- 50 está unida al menos una segunda molécula (4) mediante una unión no covalente específica a la al menos una primera molécula (3), estando la al menos una segunda molécula (4) seleccionada del grupo consistente en

ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios, y estando la segunda molécula (4) unida químicamente de forma covalente a un ligando (6a), en donde

5 está fijada al menos una tercera molécula (5) a la al menos una segunda molécula (4) mediante al menos una unión no covalente específica, estando la al menos una tercera molécula (5) seleccionada del grupo consistente en ADN, ARN, ANB y APN monocatenarios, y estando la al menos una tercera molécula (5) unida covalentemente a un segundo ligando (6b), en donde

la unión no covalente específica de la primera y segunda moléculas (3, 4) se puede escindir por contacto de la superficie (1) con una disolución tampón.

10 10. Disposición según la reivindicación 9, caracterizada por que el ligando (6a) se selecciona del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.

15 11. Disposición según una de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizada por que el segundo ligando (6b) se selecciona del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.

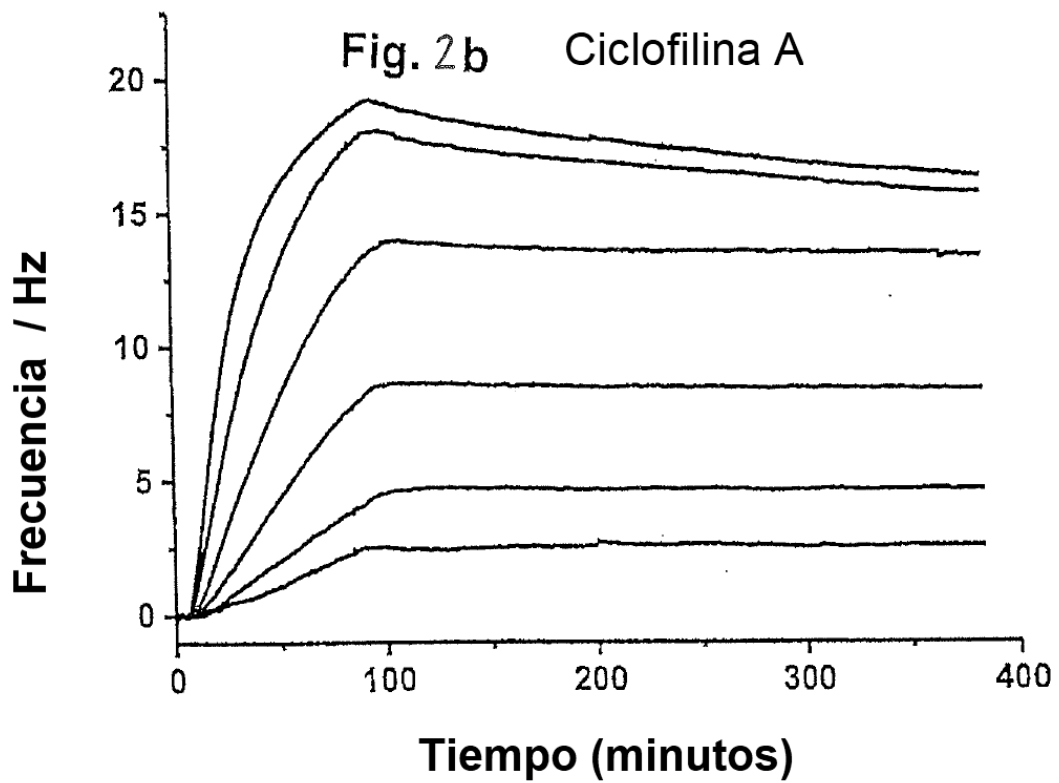
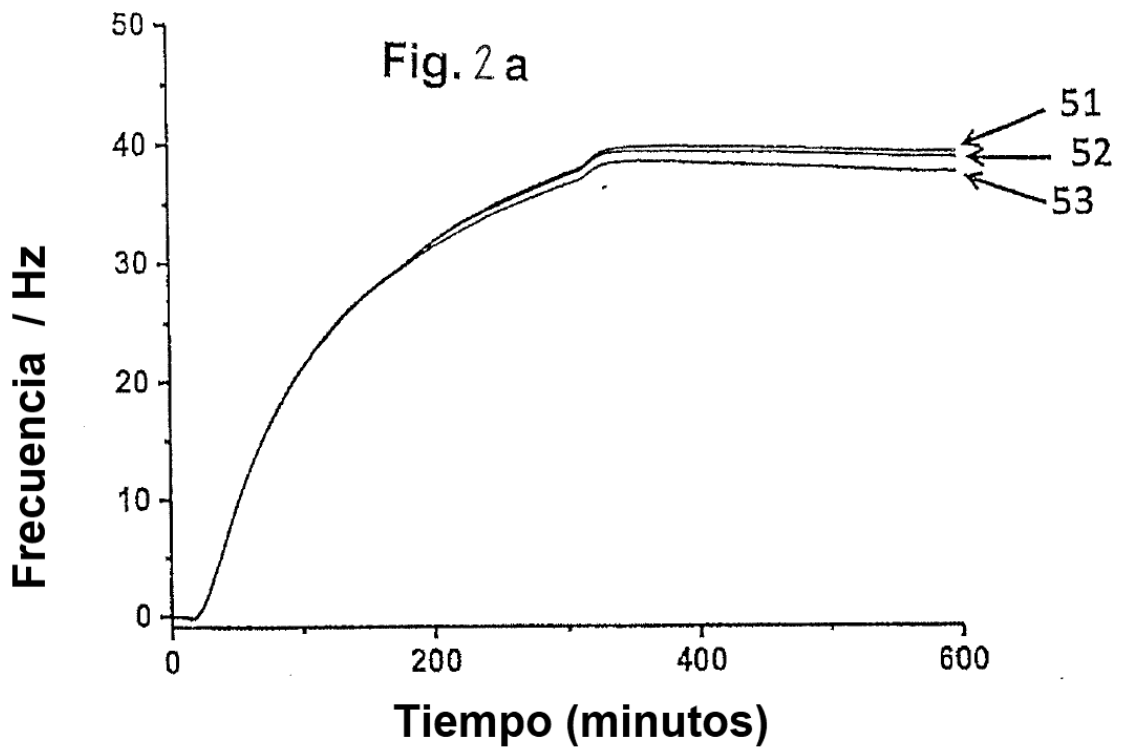
12. Disposición según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que el ligando (6a) y el segundo ligando (6b) son iguales o diferentes.

20 13. Disposición según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada por que la superficie bioactiva (1) es adecuada para una medición analítica de eventos de unión, preferiblemente para una medición analítica mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (SPR), medición de interferencia luminosa (LIM) y/o microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

25 14. Disposición según una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada por que al menos una molécula (9) de analito está unida a la superficie bioactiva (1), preferiblemente a través de un enlace no covalente, estando la molécula de analito seleccionada preferiblemente del grupo consistente en péptidos, proteínas, lípidos, ADN, ARN, APN, ANB, oligosacáridos y también compuestos de bajo peso molecular con una masa molecular ≤ 20.000 Da, preferiblemente ≤ 10.000 Da, de manera especialmente preferible ≤ 3.000 Da, en particular ≤ 900 Da.

15. Disposición según una de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada por que la unión no covalente específica se puede escindir por contacto con una disolución tampón que tiene un valor pH que es inferior a pH 3.

30 16. Disposición según una de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizada por que la superficie (1) es esencialmente seca.



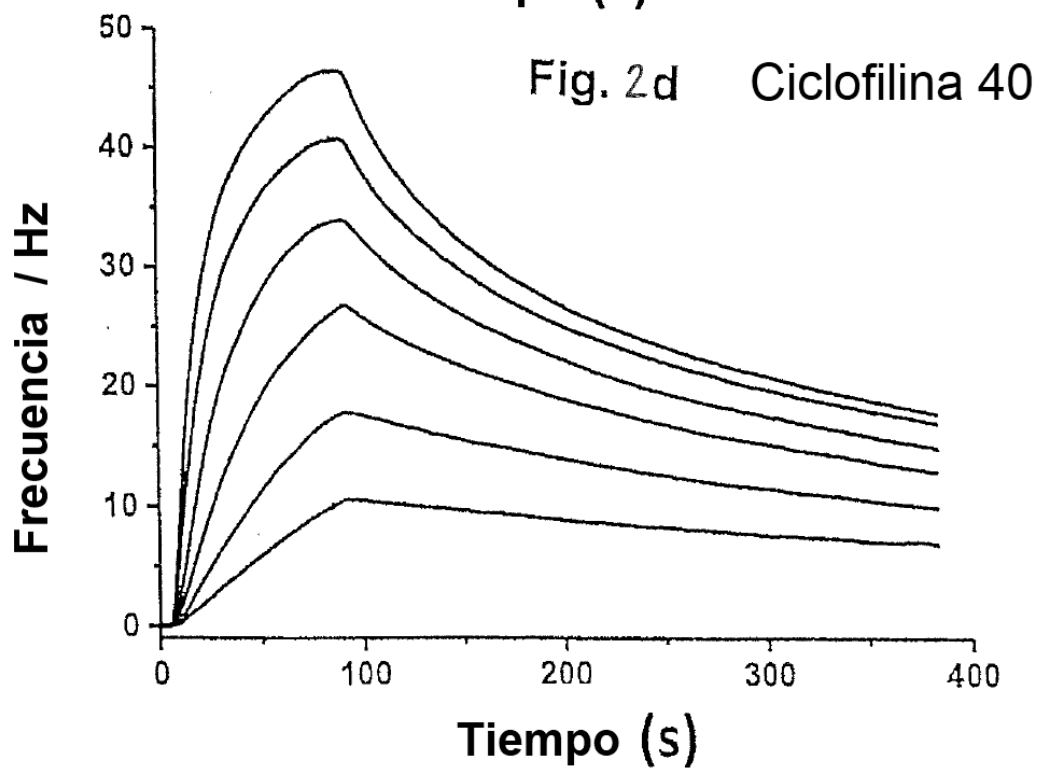
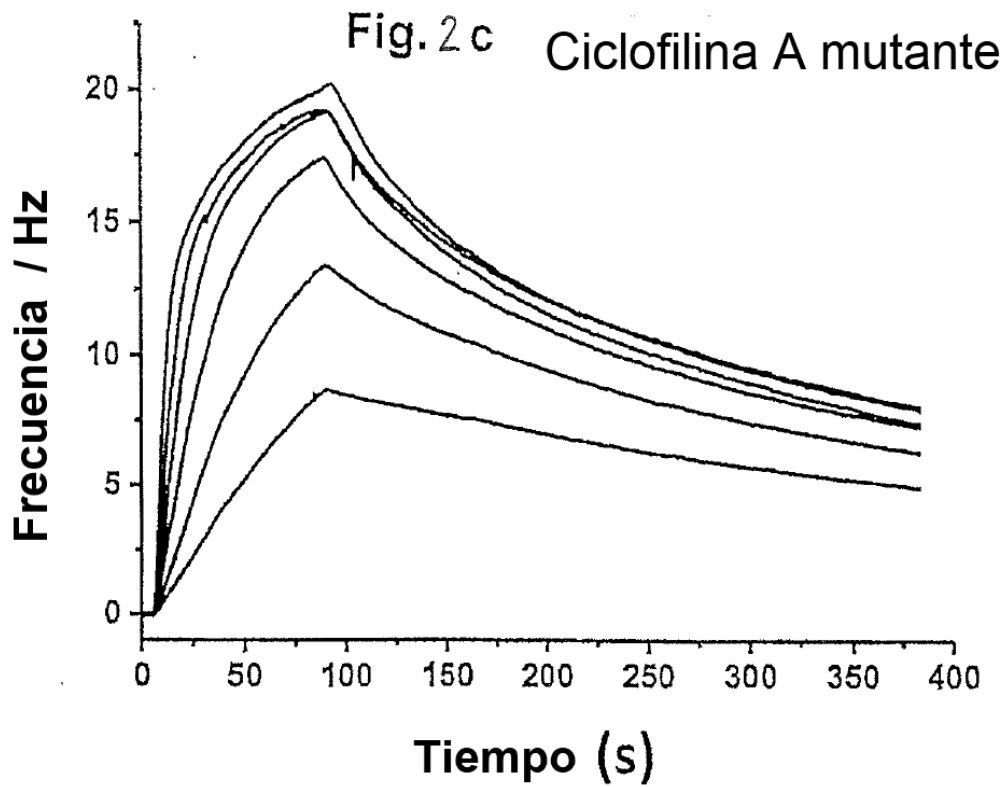


Figura 3

