

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 924**

51 Int. Cl.:

G01N 21/05 (2006.01)

G01N 21/19 (2006.01)

G01N 21/21 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6825 (2008.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2015 PCT/GB2015/051544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 15727049 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3149451**

54 Título: **Sistema de detección molecular mejorado**

30 Prioridad:

28.05.2014 GB 201409426

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

30.09.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM (100.0%)
Edgbaston
Birmingham B15 2TT, GB**

72 Inventor/es:

**DAFFORN, TIMOTHY y
HICKS, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 725 924 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

Sistema de detección molecular mejorado

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sensor molecular que utiliza el dicroísmo para identificar la presencia de moléculas específicas en una sustancia. La invención se refiere también a un elemento detector para su uso en el sensor.

10

Antecedentes de la invención

Debido a su naturaleza, los organismos contienen gran cantidad de moléculas y ensamblajes moleculares complejos. Algunas de las moléculas y ensamblajes más importantes son de gran tamaño y tienen altas relaciones de aspecto (es decir, un eje significativamente de longitud mayor que cualquier otro). Es conocido el uso de un aparato óptico para detectar de forma específica estas moléculas con altas relaciones de aspecto. Tal aparato se basa en el modo en el que interactúan estas moléculas largas con la luz polarizada (es decir, la luz con un campo eléctrico establecido en una única dirección).

15

20

El fenómeno que se usa en el aparato anterior es conocido como dicroísmo. La luz incidente puede estar polarizada linealmente dando lugar a un dicroísmo lineal (DL) o bien puede estar polarizada circularmente dando lugar a un dicroísmo circular (DC). El DL es la propiedad que exhiben algunas estructuras moleculares por medio de la cual la luz polarizada es absorbida de forma diferencial a lo largo de dos ejes ortogonales. El DC se refiere a la diferencia de absorción de la luz polarizada circularmente hacia la derecha o hacia la izquierda. Una molécula que es capaz de absorber la luz de forma selectiva se denomina cromóforo. Las moléculas dicroicas, es decir, aquellas que exhiben propiedades dicroicas, son un tipo particular de cromóforo. Ejemplos de materiales dicroicos son determinados cristales naturales, polímeros estirados y otras moléculas no isotrópicas. Las biomoléculas contienen una amplia variedad de cromóforos (que incluyen cadenas laterales aromáticas, nucleótidos y cadenas principales peptídicas).

25

30

Para que sea posible observar un efecto dicroico, es necesario que los cromóforos estén alineados, o al menos parcialmente alineados, con respecto a los haces de la luz polarizada incidente. Este requisito tiene la ventaja de que permite obtener datos solamente de las moléculas alineadas en un medio de moléculas sin alinear. Sin embargo, este requisito ha limitado también, hasta la fecha, la aplicación de la técnica anterior fundamentalmente al estudio de moléculas de gran tamaño con altas relaciones de aspecto, ya que estas son muy fáciles de alinear. Se considera que una molécula tiene una alta relación de aspecto si un eje es considerablemente más largo que el otro. Las moléculas adecuadas pueden tener forma de varilla, disco o forma cruciforme. Algunos ejemplos de fracciones de interés que se han alineado con éxito incluyen biomoléculas lineales en forma de ADN; proteínas fibrosas y membranas (que incluyen proteínas de la membrana) (Marrington R, Small E, Rodger A, Dafforn TR, Addinall SG, "FtsZ fiber bundling is triggered by a conformational change in bound GTP" *J Biol Chem* 2004; 279(47): 48821-48829; Dafforn TR, Rajendra J, Halsall DJ, Serpell LC, Rodger A, "Protein fiber linear dichroism for structure determination and kinetics in a low-volume, low-wavelength cuvette flow cell" *Biophys J* 2004; 86(1 Pt 1): 404-410; Dafforn TR, Rodger A, "Linear dichroism of biomolecules: which way is up?" *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14(5): 541-546; Halsall DJ, Rodger A, Dafforn TR, "Linear dichroism for the detection of single base pair mutations" *Chem Commun (Camb)* 2001(23): 2410-2411).

35

40

45

Un método particularmente conveniente para alinear tales moléculas consiste en preparar una solución que incluya las moléculas y hacer fluir después la solución. Debido a la naturaleza alargada de las moléculas, la alineación se produce como resultado de fuerzas de cizalla generadas por el flujo, haciendo que la muestra sea adecuada para exhibir el efecto de dicroísmo lineal.

50

En un aparato conocido, una vez que se han alineado las moléculas de interés, se dirige la luz polarizada linealmente a través de la solución desde una dirección esencialmente perpendicular a los ejes de las moléculas alineadas. La absorción de luz se produce dentro de una molécula ya que, a una determinada longitud de onda, el campo eléctrico de radiación impulsa a los electrones de la molécula en una dirección particular. Cuando se alinean varias moléculas de forma similar, los electrones de cada una de ellas se caracterizan todos por la misma dirección preferida de desplazamiento neto. El DL es una medida de la diferencia de absorbancia de la luz incidente entre dos polarizaciones ortogonales. La variación de la longitud de onda de la luz incidente y la detección de la luz que sale de la muestra permiten obtener un espectro que ilustra la absorbancia de la muestra con respecto a la longitud de onda.

55

60

Un espectro de DL de una molécula proporciona información de los cromóforos que están presentes incluyendo la orientación de los cromóforos (y, por tanto, la conformación molecular) y la orientación de los cromóforos con respecto a los ejes de polarización. Esta información es importante para comprender la estructura de la molécula. Se ha de tener en cuenta que el DL es una medida de una propiedad intensiva de la muestra. La intensidad de la absorbancia se puede usar para cuantificar el número de moléculas diana que están presentes en la muestra. Además, puesto que el DL es muy sensible a los cambios en la alineación, se puede detectar una anomalía en la

65

estructura de una molécula. Por ejemplo, el DL puede detectar la distorsión causada por un solo enlace de hidrógeno con apareamiento erróneo en un fragmento de ADN de 1300 pb (pares de bases).

Además, el DL es extremadamente sensible a la formación de un complejo ya que la unión de una molécula alineada a una segunda molécula presenta los dos efectos medibles siguientes:

- 1) Se modifica la forma de la porción alineada y esto da lugar a una modificación de la alineación, lo que lleva a un cambio en el espectro de DL observado.
- 2) La segunda molécula llega a alinearse ella misma debido a su unión con la molécula ya alineada. Esto conduce a la generación de una señal de DL para los cromóforos previamente sin alinear de la segunda molécula. Así, se puede obtener información de la estructura del complejo.

Ambos efectos previamente mencionados dan lugar a fenómenos detectables que se pueden usar para detectar la formación de complejos. No solo se puede mostrar la información estructural relativa a la naturaleza del complejo sino que se puede determinar también la afinidad de la interacción.

No obstante, la mayoría de las moléculas no presentan una alta relación de aspecto y tienen en cambio formas más estrechamente relacionadas con esferas, con unas relaciones de aspecto inferiores a aproximadamente 5:1. A fin de alinear estas moléculas es necesario unir la molécula diana a un receptor que, por sí mismo, presente una alta relación de aspecto. Este método de alineación se ha conseguido y se ha aplicado a estudios de ligandos (por ejemplo, cisplatino) que se unen a receptores alineables de forma natural (por ejemplo el ADN). Sin embargo, este método está limitado en su aplicación ya que solo se pueden estudiar aquellas moléculas que se unen a receptores alineables de forma natural.

El documento WO 2008/059280 abordaba el problema anterior proporcionando un sensor molecular en el que el elemento sensor comprendía una porción de soporte con una alta relación de aspecto que tenía una porción receptora unida al mismo. El uso de una porción de soporte alineable como sustrato para la unión de una porción receptora significaba que ni la propia porción receptora ni la molécula diana requerían propiedades de alineación inherentes. Además de para poder identificar las moléculas alineadas mediante el espectro de dicroísmo resultante, el sensor se puede usar para cuantificar las moléculas alineadas y para detectar la presencia de anomalías moleculares tales como apareamientos erróneos. Las propiedades de unión de la porción receptora y la molécula diana se pueden estudiar también usando el sensor. La naturaleza inherente de las moléculas dicroicas significa que el sensor es extremadamente sensible.

La presente invención representa un desarrollo adicional del sensor divulgado en el documento WO 2008/059280 y pretende ampliar la aplicación del análisis de dicroísmo.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un sensor molecular que comprende:

- un canal de flujo configurado para hacer fluir una solución que contiene potencialmente una molécula diana; una fuente de luz polarizada;
- un detector preparado para recibir luz de la fuente una vez que esta haya atravesado el canal de flujo; y
- una pluralidad de elementos sensores dispuestos durante su uso en el canal de flujo, comprendiendo cada elemento sensor (i) una porción de soporte y (ii) una o más moléculas receptoras para la molécula diana unidas a la porción de soporte a fin de formar un complejo soporte/receptor, en el que el complejo soporte/receptor se modifica para incorporar un cromóforo y el complejo soporte/receptor modificado tiene una alta relación de aspecto.

Se entenderá que lo que se quiere indicar con la expresión "el complejo soporte/receptor que se modifica" es que se incorpora un cromóforo específico para ajustar el dicroísmo exhibido del elemento sensor a una longitud de onda deseada.

Tal como se usa en el presente documento, una "alta relación de aspecto" se refiere a una relación de aspecto superior a 5:1, superior a 10:1, superior a 20:1, superior a 50:1, superior a 75:1 y, en algunas realizaciones, superior a 100:1.

La porción de soporte puede tener una alta relación de aspecto. Se entenderá que es crucial que el complejo soporte/receptor modificado se alinee y proporcione la absorbancia necesaria para el dicroísmo. Sin embargo, no es necesario que la porción de soporte, la porción receptora o, de hecho, el propio complejo soporte/receptor absorban o se alineen ellos mismos. El cromóforo podría ser él mismo la porción alineable (es decir, podría tener una alta relación de aspecto y alinearse en el flujo). De forma alternativa, la combinación de soporte y cromóforo podría crear una porción que es alineable, por ejemplo, cambiando la relación de aspecto y/o la rigidez del soporte.

Ejemplos de porciones de soporte adecuadas incluyen: -

- polímeros sintéticos,
 - nanotubos de carbono,
 - fibras biomoleculares,
 - cristales,
- 5
- partículas inorgánicas, por ejemplo, fragmentos metálicos,
 - estructuras biológicas sintéticas,
 - mezclas de líquidos de diferentes polaridades (a fin de crear una separación de fases y la alineación posterior de regiones de la fase menor).

10 Tal como se usa en el presente documento, una fibra biomolecular es cualquier biomolécula que tenga la alta relación de aspecto requerida y que sea alineable en condiciones de flujo. Ejemplos de fibras biomoleculares incluyen vesículas de lípidos, bacteriófagos filamentosos y polímeros tales como polímeros de aminoácidos (es decir, polipéptidos o proteínas) y polímeros de ácidos nucleicos (es decir, ARN o ADN).

15 En algunas realizaciones, el complejo soporte/receptor modificado exhibe dicroísmo en el espectro visible (es decir, de 400 a 700 nm).

En determinadas realizaciones, la fibra biomolecular es un bacteriófago filamentosos, tal como M13, F1, Fd, Ike y N1.

20 El cromóforo se une al complejo soporte/receptor de tal modo que no se puede intercambiar libremente con otro complejo soporte/receptor. En determinadas realizaciones, la unión es mediante uno o más enlaces covalentes (que puede ser a la porción de soporte o a la porción receptora).

Ejemplos de cromóforos adecuados incluyen los de la Tabla 1 siguiente.

25

Tabla 1	
Ejemplos (lista no exhaustiva)	
Clase de cromóforo	
AlexaFluor (AF)	<i>AF405, AF488, AF555, AF610, AF647, AF700.</i>
Compuestos espiró	Fluorescamina,
Xantonas	Por ejemplo, fluoresceínas (isotiocianato de fluoresceína), N-hidroxisuccinimida-fluoresceína), rodaminas (isotiocianato de rodamina, isotiocianato de tetra-metil-rodamina)
Benzopironas	Cumarina
Intercaladores de ADN	Bromuro de etidio
Otros	Eosina-5-maleimida, cloruro de NBD, éster succinimidilo de BHQ-10, complejos de lantánidos, puntos cuánticos, dansilo, pireno

30 Se entenderá que el receptor necesita tener suficiente especificidad por la diana de modo que pueda distinguir las moléculas diana de otras moléculas no diana. En algunas realizaciones, el receptor es un péptido o una proteína, por ejemplo un afímero.

En algunas realizaciones, el receptor comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula diana.

35 En una primera serie de realizaciones, cada elemento sensor comprende el mismo complejo soporte/receptor modificado con la misma molécula o moléculas receptoras.

40 En una segunda serie de realizaciones, el sensor comprende una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, teniendo los grupos las mismas porciones de soporte pero diferentes cromóforos y moléculas receptoras para diferentes moléculas diana, de modo que la absorbancia de dicroísmo de cada grupo de elementos sensores sea a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos y que cada grupo detecte una molécula diana diferente.

45 Se entenderá que esta segunda serie de realizaciones permite la multiplexación, es decir, una determinación de múltiples moléculas diana en un único ensayo, debido a que la absorbancia de dicroísmo para cada molécula diana específica será a una longitud de onda diferente.

El canal de flujo es proporcionado convenientemente por una celda de Couette.

50 La invención se basa también en un elemento sensor que comprende (i) una porción de soporte y (ii) una o más moléculas receptoras para la molécula diana unidas a la porción de soporte a fin de formar un complejo soporte/receptor, en el que el complejo soporte/receptor se modifica para incorporar un cromóforo y el complejo soporte/receptor modificado tiene una alta relación de aspecto.

55 La invención se basa adicionalmente en un kit de elementos sensores, comprendiendo el kit una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, comprendiendo cada elemento sensor una porción de soporte y un receptor para una molécula diana formando un complejo soporte/receptor, en el que los complejos soporte/receptor de cada

grupo se modifican con un diferente cromóforo y las moléculas receptoras son para diferentes moléculas diana, y en el que todos los complejos soporte/receptor modificados tienen una alta relación de aspecto y la absorbancia de dicroísmo de cada grupo de elementos sensores es a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos.

5 El kit puede comprender, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco grupos de elementos sensores.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para detectar una pluralidad de diferentes moléculas diana en una solución que fluye que comprende proporcionar en un canal de flujo una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, comprendiendo cada elemento sensor una porción de soporte y un receptor para una molécula diana formando un complejo soporte/receptor, en el que los complejos soporte/receptor de cada grupo se modifican con un diferente cromóforo y las moléculas receptoras de cada grupo son para diferentes moléculas diana, y en el que los complejos soporte/receptor modificados tienen una alta relación de aspecto y la absorbancia de dicroísmo de cada grupo de elementos sensores es a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos; hacer fluir una solución que contiene potencialmente una molécula diana a lo largo del canal de flujo; hacer pasar luz a través del canal de flujo; y detectar la luz una vez que esta haya atravesado el canal de flujo; a fin de producir un espectro de dicroísmo lineal de la solución.

Se entenderá que la luz incidente sobre el canal de flujo está polarizada linealmente, usando una fuente de luz polarizada o filtrando adecuadamente la luz antes de que esta llegue al canal de flujo. En realizaciones no de acuerdo con la invención, la luz incidente puede estar sin polarizar con el uso de un detector capaz de detectar la polarización de la luz en dos orientaciones ortogonales una vez que esta haya atravesado el canal de flujo.

Breve descripción de los dibujos

25 La invención se describirá adicionalmente a modo de ejemplo solamente con referencia a los dibujos adjuntos en los que

la Fig. 1 es un esquema de un sensor de acuerdo con la presente invención,
 la Fig. 2 es una representación del método de la presente invención que opera con diferentes moléculas diana presentes y los espectros de DL asociados,
 la Fig. 3 muestra los espectros de DL resultantes del M13 marcado con un colorante (BHQ10) y un anticuerpo para *E. coli* O157 en ausencia y presencia de *E. coli* O157 (la diana),
 la Fig. 4 demuestra la medición de múltiples elementos sensores M13-colorante en la misma muestra,
 la Fig. 5 muestra que el cambio de magnitud de múltiples señales de DL que proceden de múltiples elementos sensores se puede detectar de forma independiente,
 la Fig. 6 demuestra que el cambio de respuesta de una señal de DL resultante del cambio en la alineación de un elemento sensor en respuesta a la presencia de una molécula diana se puede detectar de forma independiente desde un elemento sensor separado que no tiene un receptor para la molécula diana, y
 la Fig. 7 demuestra que el cambio de la señal de DL producida por dos sensores, uno con un anticuerpo para *S. typhimurium* (una primera diana) y el otro con un anticuerpo para *E. coli* (una segunda diana), en ausencia de bacteria o en presencia de una o ambas especies.

Descripción detallada de determinadas realizaciones

45 Con referencia a la Figura 1, se ilustra un sensor molecular 8 de acuerdo con la presente invención. El sensor 8 comprende un canal de flujo en forma de tubo alargado 2 que está fabricado mayoritariamente en material plástico y que es opaco. La porción central del tubo 2 se configura como una ventana de observación 6 y está fabricada en un material que es transparente a la longitud de onda de la luz empleada. En este ejemplo particular, la ventana de observación 6 está fabricada en vidrio de sílice, que es transparente a la luz visible. Así, en este ejemplo la ventana de observación 6 se configura para permitir que pase a través de la misma luz con un intervalo de longitud de onda de aproximadamente 400 nm a 700 nm. Junto a un lado de la ventana de observación 6 está la fuente de luz 3. La fuente de luz 3 se configura para que emita dos haces ortogonales de luz polarizada linealmente a través de la ventana de observación 6 y, de este modo, a través del canal de flujo 5. En la parte opuesta a la fuente de luz 3, al otro lado de la ventana de observación 6 y el canal de flujo 5, se encuentra un detector 1. El detector 1 se configura para que detecte los haces de luz emitidos por la fuente de luz 3 una vez que hayan atravesado la ventana de observación 6 y el canal de flujo 5.

Durante el uso, una muestra que se va a analizar se mezcla con una solución líquida que contiene una pluralidad de elementos sensores que comprenden cada uno una porción de soporte unida a una o más moléculas receptoras para una molécula diana en forma de complejo soporte/receptor, complejo modificado con un cromóforo de tal modo que el complejo soporte/receptor modificado tenga una alta relación de aspecto. La solución, que puede incluir las moléculas diana de interés, se hace fluir a través del tubo 2 en la dirección indicada por la flecha 4 en la Figura 1. Los efectos de esto se muestran esquemáticamente en la Figura 2 para un sistema en el que hay dos grupos de elementos sensores que se distinguen entre sí por tener diferentes cromóforos y porciones receptoras para diferentes moléculas diana. Con referencia a la Figura 2, Cuadro A, un primer elemento sensor tiene una porción de soporte, unida covalentemente a un primer cromóforo y una primera porción receptora diseñada para unirse a una

primera molécula diana. Un segundo elemento sensor comprende la misma porción de soporte, unida covalentemente a un segundo cromóforo y una segunda porción receptora diseñada para unirse a una segunda molécula diana. Los cromóforos se seleccionan de modo que los espectros de DL que producen sean distinguibles.

- 5 En condiciones de flujo, los elementos sensores se alinean y en ausencia de moléculas diana se observan dos picos distintos en el espectro de DL (Cuadro B).

10 Cuando está presente la primera molécula diana (estando ausente la segunda molécula diana), los primeros receptores se unen a ella y la alineación de los primeros elementos sensores se altera, reduciendo de este modo el pico en el espectro de DL (Cuadro D). Se entenderá que las alturas relativas de los picos en los cuadros B y D es una medida cuantitativa de la cantidad de la primera molécula diana presente. La alineación de los segundos elementos sensores no se altera y, por tanto, el pico asociado del espectro de DL permanece invariable. Se entiende que se producirá una situación similar si la segunda molécula diana está presente y la primera molécula diana está ausente, excepto por que la alineación de los segundos elementos sensores se altera y el pico asociado en el espectro de DL se reduce (no mostrado).

20 Cuando están presentes tanto la primera como la segunda molécula diana, la alineación de los primeros y segundos elementos sensores está alterada (Cuadro E) lo que lleva a una reducción de ambos picos asociados en el espectro de DL (Cuadro F). Aunque se muestra una reducción de los picos de la misma magnitud, se entenderá naturalmente que las alturas de los picos variarán independientemente según las cantidades de la primera y la segunda molécula diana en la muestra sometida a ensayo.

25 A fin de conseguir una señal de DL de un cromóforo, este debe estar unido a un complejo soporte/receptor preferentemente mediante un enlace covalente o, de forma alternativa, mediante otro método que asegure que el cromóforo no se pueda intercambiar libremente con la solución u otros soportes. El cromóforo también debe estar dispuesto en el complejo soporte/receptor de modo que sea no isotrópico o esté ordenado con respecto al complejo soporte/receptor. El dichroísmo lineal resulta de la alineación de los cromóforos de una manera ordenada con respecto al haz de luz polarizada lineal. Este orden se podría introducir mediante:

- 30 1) Impedimento estérico entre el cromóforo y el complejo soporte/receptor y/u otros cromóforos.
2) Unión de un solo cromóforo al complejo soporte/receptor mediante enlaces múltiples (covalentes o no covalentes).

35 En el ejemplo que sigue a continuación los cromóforos están unidos covalentemente al bacteriófago (un soporte alineable) para inducir una señal de DL desde el cromóforo. Los cromóforos se unieron a los restos de lisina en la proteína de la cápside g8p del bacteriófago M13. Los cromóforos unidos incluyen los de la Tabla 1 anterior. Para cada colorante la eficacia del marcado variaba del 100 al 30 % y en cada caso se observó un espectro de DL para cada colorante a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de absorbancia del colorante.

40 Aunque en este ejemplo los grupos amino de los restos de lisina se usaron como sitio de acoplamiento para los cromóforos, se podrían usar una serie de métodos diferentes para tal soporte. Estos incluyen el acoplamiento a través de los grupos amino de los terminales amino de cualquier proteína, el sulfhidrilo de restos de cisteína y el carboxilato de restos de aspartato y glutamato, así como los terminales carboxilo de cualquier proteína, si bien se podría usar cualquier química de unión que una el cromóforo al soporte. Para otros soportes no proteínicos, por ejemplo, ADN, vesículas de membrana, nanotubos de carbono y conjuntos ordenados de moléculas pequeñas, se pueden emplear otras químicas de unión que podrían incluir también la incorporación del cromóforo a un precursor que se ensambla posteriormente en un soporte alineable.

50 Una vez que se ha producido un número de complejos soporte/receptor alineables que contienen diferentes cromóforos, estos reactivos se pueden combinar en un ensayo que permita detectar múltiples dianas de ensayo y/o integrar reacciones de control positivas y negativas en el ensayo.

Método

55 Conjugación de un anticuerpo de reconocimiento de patógenos y un cromóforo sobre el bacteriófago M13

Este método se lleva a cabo usando las siguientes etapas:

- 60 1) Derivatización del M13 con S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) para convertir grupos amino accesibles en grupos sulfhidrilo.
2) Derivatización del anticuerpo (Ab) con 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para convertir grupos amino accesibles en grupos maleimido.
3) Mezcla del M13 y el anticuerpo entre sí para conjugar las dos porciones a fin de dar M13-Ab.
65 4) Derivatización de la molécula de colorante (BHQ10-succinimida) con amino-etil-maleimida a fin de convertir el grupo succinimido en un grupo maleimido para dar BHQ10-maleimida.
5) Mezcla del M13-Ab con la BHQ10-maleimida para dar M13-Ab-BHQ10.

El elemento sensor resultante da lugar a una señal de DL correspondiente a la longitud de onda de absorbancia del BHQ10 (Fig. 3, línea fina). La adición del analito diana (en este caso *E. coli* O157) da como resultado la interacción del anticuerpo sobre el elemento sensor que interactúa con el O-antígeno de la *E. coli* con la consiguiente alteración de la alineación del elemento sensor y un cambio (disminución en este caso) de la señal de DL (Fig. 3, línea gruesa).

5 El colorante BHQ10 conjugado con el M13 es útil para la demostración de la utilidad pero tiene una anchura de banda amplia y, por tanto, no es adecuado para aplicaciones de multiplexación en las que la señal se solapará con otras señales.

10 Están disponibles colorantes con una anchura de banda mucho más estrecha y se han utilizado en este sistema. Por ejemplo los colorantes AlexaFluor (AF488, AF555 y AF647) conjugados con el M13 tal como se muestra en la Figura 4. El cambio en las señales de DL como resultado de las cantidades de estos elementos sensores se puede detectar independientemente de las otras señales de forma suficiente para ser útil. Una demostración de ello se presenta en la Figura 5, en la que la concentración de cada uno de los tres elementos sensores M13-AlexaFluor se ha reducido por separado en tres mediciones separadas.

15

Ejemplo

Se prepararon dos tipos de elementos sensores con las siguientes características:

20 Sensor 1: Bacteriófago M13 con las siguientes porciones unidas:

- a. Colorante AlexaFluor 555
- b. Un anticuerpo que se une a la bacteria *S. typhimurium*.

25 Sensor 2: Bacteriófago M13 con las siguientes porciones unidas:

- a. Colorante AlexaFluor 647
- b. Un anticuerpo que se une a la bacteria *E. coli*.

30 Con referencia a la Figura 7, la señal de DL se midió en ausencia de bacteria ("tampón"); en presencia de *E. coli* ("*E. coli* O157, 10^7 células/ml"); en presencia de *S. typhimurium* ("*S. typhimurium*, 10^7 células/ml"); y en presencia de *E. coli* y *S. typhimurium* ("*E. coli* O157, 10^7 y *S. typhimurium*, 10^7 ").

35 La señal a 558 nm se asocia a la detección de *S. typhimurium* (sombreada con líneas) y la señal a 660 nm se asocia a la detección de *E. coli* (sin relleno). En presencia de *S. typhimurium* la señal a 558 nm disminuye, en presencia de *E. coli* la señal a 660 nm disminuye, y en presencia de *S. typhimurium* y *E. coli* tanto la señal a 558 nm como la señal a 660 nm disminuyen. Este ensayo proporciona una prueba de la utilidad de la invención para detectar una diana que es la única presente en la solución o que forma parte de una mezcla de dianas.

40 Se entenderá que esto da la oportunidad de incorporar un patrón interno en las mediciones en las que la señal de DL de un elemento sensor disminuye como respuesta a la presencia de la molécula diana (en este caso *E. coli* O157) y en las que un elemento sensor con patrón interno que tiene una señal de DL a una longitud de onda diferente no varía. Esto sirve para ilustrar la utilidad de mediciones multiplexadas y también el uso de un patrón interno para corregir cualquier diferencia en la alineación debida a las diferencias del flujo de cizalla en un sistema de ensayo.

45

Se entenderá que la inclusión de otras moléculas diana se deduce a partir de esta metodología según la cual la molécula receptora y el cromóforo serán diferentes para diferentes moléculas diana, y que estas se pueden medir en la misma muestra al mismo tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un sensor molecular para detectar moléculas diana en una solución que fluye usando dicroísmo, comprendiendo el sensor molecular:
- 5 un canal de flujo (5) que contiene una solución que contiene potencialmente una molécula diana; una fuente de luz polarizada (3); un detector (1) dispuesto para recibir luz de la fuente una vez que haya atravesado el canal de flujo; y una pluralidad de elementos sensores dispuestos en la solución, comprendiendo cada elemento sensor (i) una porción de soporte y (ii) una o más moléculas receptoras para la molécula diana unidas a la porción de soporte a fin de formar un complejo soporte/receptor,
- 10 en donde el complejo soporte/receptor está modificado para incorporar un cromóforo y estando el cromóforo unido al complejo soporte/receptor de tal modo que no se puede intercambiar libremente con otro complejo soporte/receptor, y
- 15 en donde el complejo soporte/receptor modificado tiene una relación de aspecto superior a 5:1.
2. El sensor molecular de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el complejo soporte/receptor modificado tiene una relación de aspecto superior a 10:1.
- 20 3. El sensor molecular de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la porción de soporte tiene una relación de aspecto superior a 5:1.
4. El sensor molecular de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la porción de soporte se selecciona entre el grupo que consiste en polímeros sintéticos, nanotubos de carbono, fibras biomoleculares, cristales, partículas inorgánicas, estructuras biológicas sintéticas y mezclas de líquidos de diferentes polaridades.
- 25 5. El sensor molecular de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la fibra biomolecular se selecciona entre el grupo que consiste en vesículas de lípidos, bacteriófagos filamentosos, polipéptidos, proteínas y polímeros de ácidos nucleicos.
- 30 6. El sensor molecular de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el cromóforo se selecciona entre el grupo que consiste en colorantes AlexaFluor (AF), compuestos espiro, fluoresceínas, intercaladores de ADN, benzopironas, complejos de lantánidos, puntos cuánticos, extintores de agujero negro Bodipy y rodaminas.
- 35 7. El sensor molecular de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el cromóforo se selecciona entre el grupo que consiste en Alexafluor *AF405*, *AF488*, *AF555*, *AF610*, *AF647*, *AF700*, fluorescamina, isotiocianato de fluoresceína, N-hidroxisuccinimida-fluoresceína, isotiocianato de rodamina, isotiocianato de tetra-metil-rodamina, eosina-5-maleimida, cloruro de NBD, éster succinimidilo de BHQ-10 y bromuro de etidio.
- 40 8. El sensor molecular de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que cada elemento sensor comprende la misma porción de soporte, el cromóforo y la misma molécula o moléculas receptoras.
9. El sensor molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sensor comprende una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, teniendo los grupos las mismas porciones de soporte pero diferentes cromóforos y moléculas receptoras para diferentes moléculas diana, de modo que la absorbancia de dicroísmo de cada grupo de elementos sensores sea a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos y que cada grupo detecte una molécula diana diferente.
- 45 10. Un elemento sensor que comprende (i) una porción de soporte y (ii) una o más moléculas receptoras para la molécula diana unidas a la porción de soporte a fin de formar un complejo soporte/receptor, en donde el complejo soporte/receptor se modifica para incorporar un cromóforo y el complejo soporte/receptor modificado tiene una relación de aspecto superior a 5:1.
- 50 11. Un kit de elementos sensores que comprende una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, comprendiendo cada elemento sensor una porción de soporte y un receptor para una molécula diana formando un complejo soporte/receptor, en donde los complejos soporte/receptor de cada grupo se modifican con un cromóforo diferente y las moléculas receptoras son para diferentes moléculas diana, y en donde todos los complejos soporte/receptor modificados tienen una relación de aspecto superior a 5:1 y la absorbancia de dicroísmo de cada grupo de elementos sensores es a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos.
- 55 60 12. Un método para detectar una pluralidad de diferentes moléculas diana en una solución que fluye que comprende proporcionar en un canal de flujo (5) una pluralidad de distintos grupos de elementos sensores, comprendiendo cada elemento sensor una porción de soporte y un receptor para una molécula diana formando un complejo soporte/receptor, en donde los complejos soporte/receptor de cada grupo se modifican con un cromóforo diferente y las moléculas receptoras de cada grupo son para diferentes moléculas diana, y en donde los complejos soporte/receptor modificados tienen una relación de aspecto superior a 5:1 y la absorbancia de dicroísmo de cada
- 65

grupo de elementos sensores es a una longitud de onda diferente a la de los otros grupos; hacer fluir una solución que contiene potencialmente una molécula diana a lo largo del canal de flujo (5); hacer pasar luz polarizada a través del canal de flujo; y detectar la luz una vez que esta haya atravesado el canal de flujo; para producir un espectro de dicroísmo lineal de la solución.

5

13. El método de la reivindicación 12 en el que la luz que atraviesa el canal de flujo está polarizada linealmente.

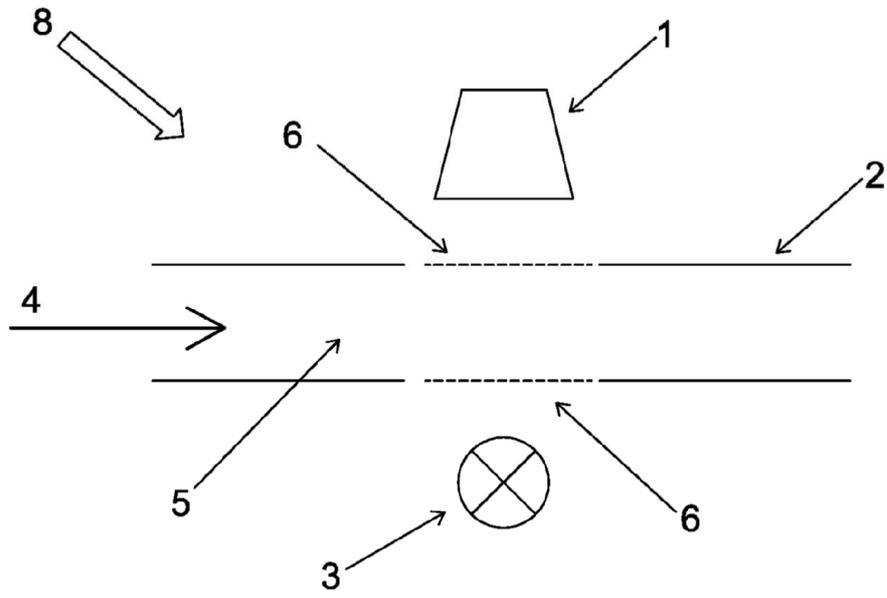


Figura 1

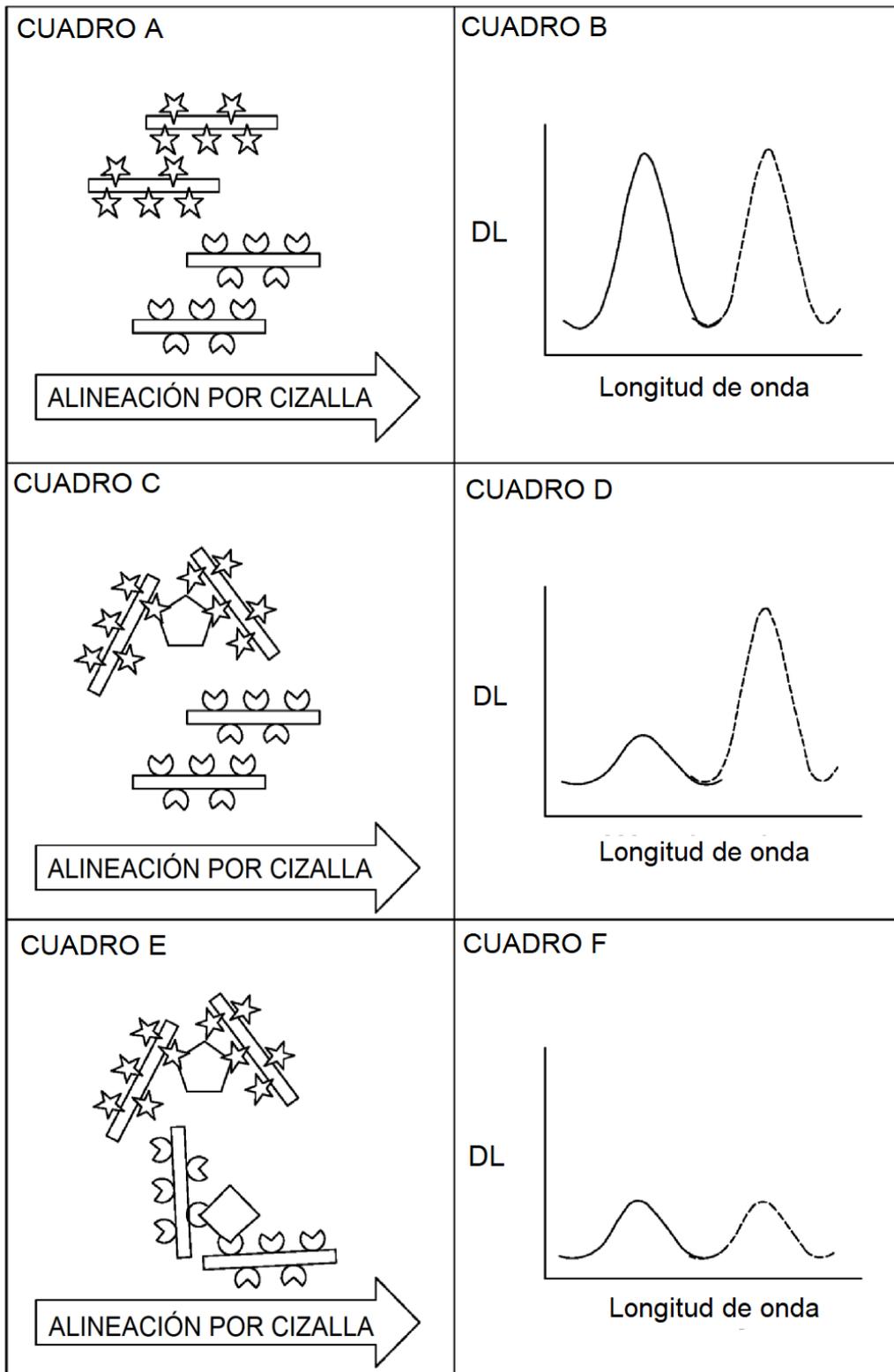


Figura 2

Señal del M13-BHQ10

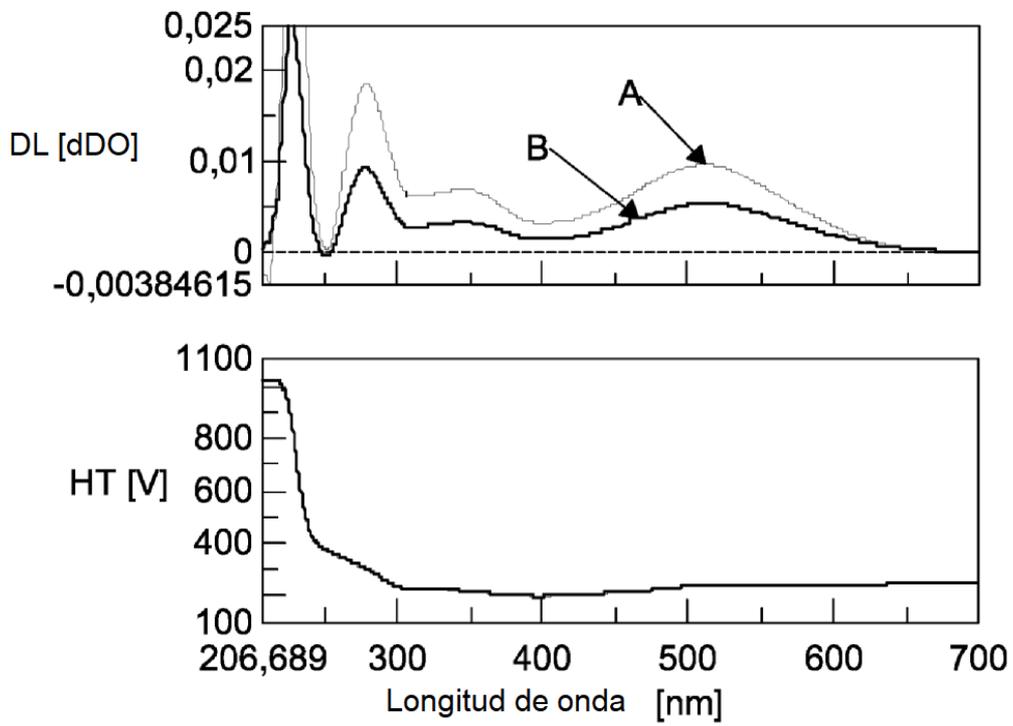


Figura 3

Múltiples colorantes AF

DL [dDO]

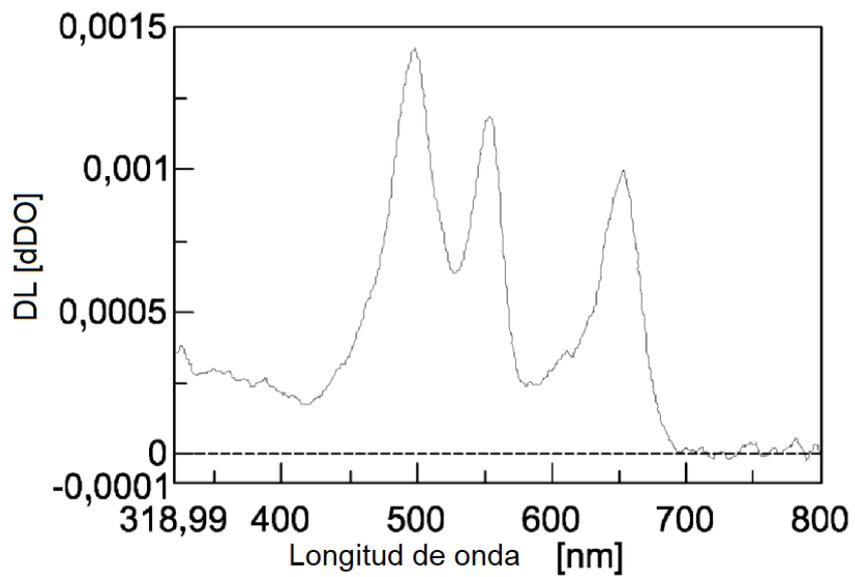


Figura 4

Detección selectiva de diferentes elementos sensores

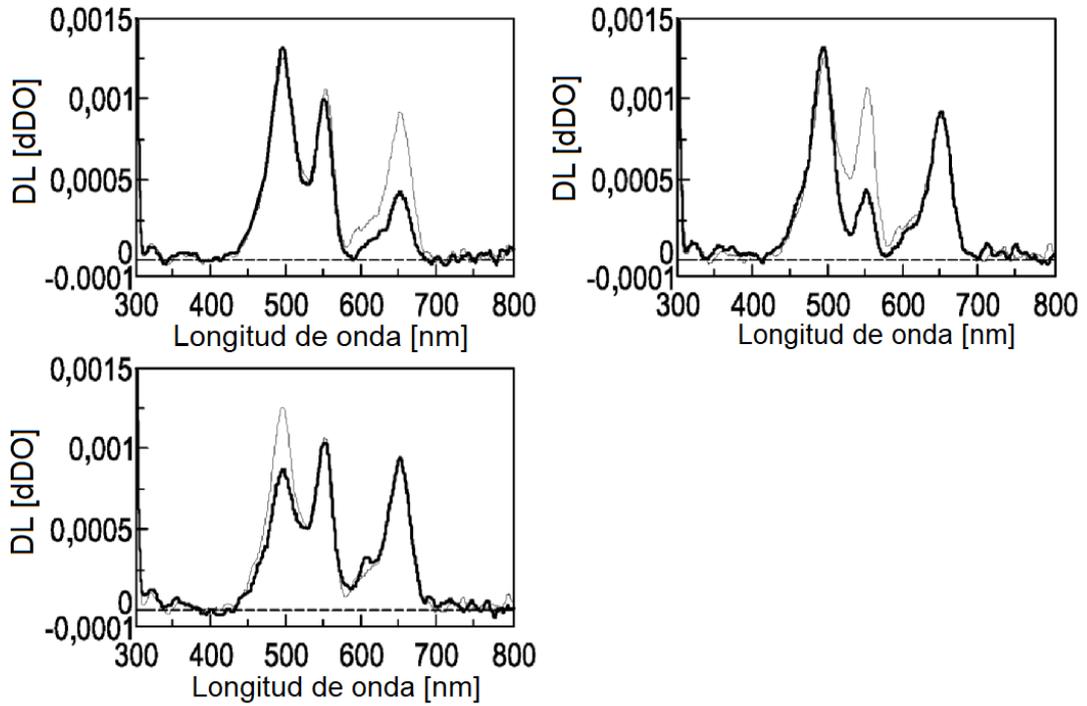


Figura 5

Patrón interno

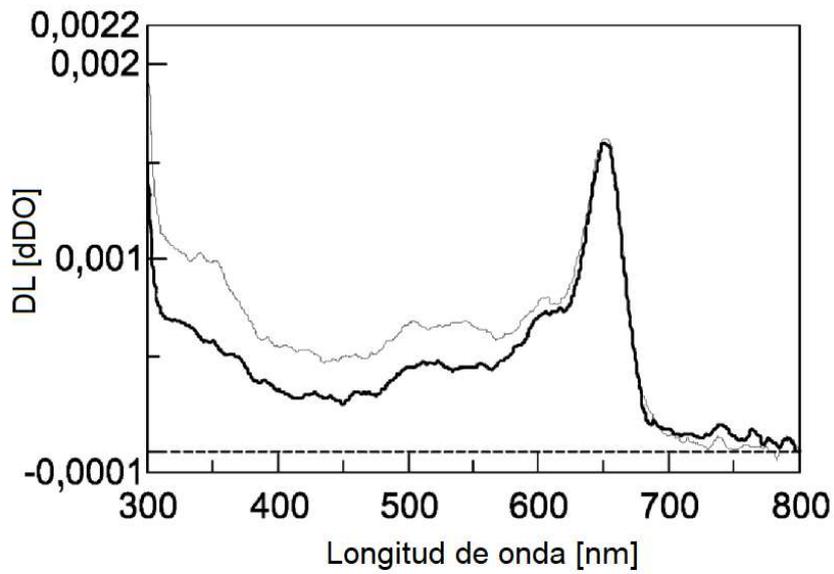


Figura 6

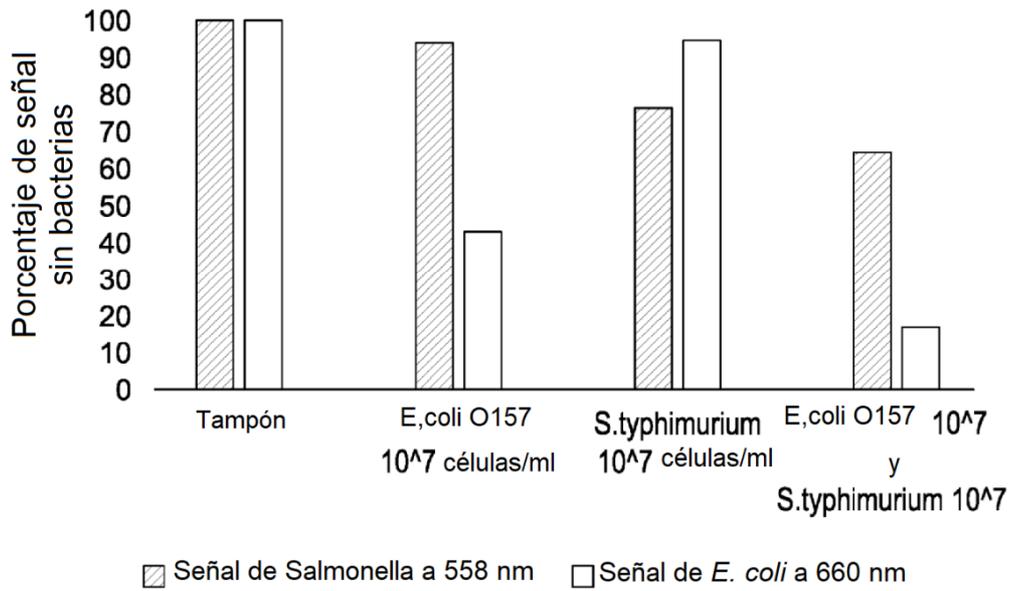


Figura 7