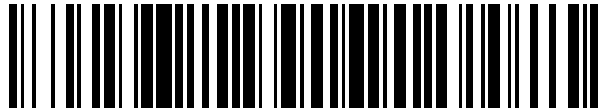


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 171**

51 Int. Cl.:

C08J 9/00 (2006.01)
B01D 15/00 (2006.01)
B01D 15/02 (2006.01)
B01D 24/00 (2006.01)
B01D 27/02 (2006.01)
B01D 29/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2008 E 08799593 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **16.12.2009 EP 2132256**

54 Título: **Partículas de hidrogel inteligentes para la recogida de biomarcadores**

30 Prioridad:

19.03.2007 US 895674 P
09.11.2007 US 986803 P
19.02.2008 US 33701

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2013

73 Titular/es:

**GEORGE MASON INTELLECTUAL PROPERTIES,
INC. (50.0%)**
MSN 5G5, 4400 University Drive
Fairfax, VA 22030, US y
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA (50.0%)

72 Inventor/es:

LUCHINI, ALESSANDRA;
LIOTTA, LANCE;
PETRICOIN, EMANUEL y
GEHO, DAVID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 171 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

Partículas de hidrogel inteligentes para la recogida de biomarcadores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para la recogida de biomarcadores a partir de una mezcla utilizando partículas. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos que utilizan partículas capaces de secuestrar un biomarcador a partir de una mezcla, permitiendo la separación del biomarcador a partir de la mezcla, así como a métodos para secuestrar biomarcadores.

Antecedentes de la invención

10 Los biomarcadores pueden proporcionar una detección en fase temprana de una amplia diversidad de enfermedades. Como tal, existe una urgente necesidad de descubrir nuevos biomarcadores que proporcionen una detección sensible y específica de la enfermedad (Aebersold et al., *Proteome Res* **2005**, 4, (4), 1104-9; Srinivas et al., *Clin Chem* **2002**, 48, (8), 1160-9). Los biomarcadores proporcionan un modo de diagnosticar una enfermedad antes de que aparezcan patologías clínicas, permitiendo un tratamiento en fase temprana de la enfermedad, lo cual, típicamente, proporciona resultados mejores.

15 Por ejemplo, el cáncer se está convirtiendo rápidamente en la causa principal de muerte para muchos grupos de población en los Estados Unidos de América, en gran parte debido al hecho de que diversos tipos de la enfermedad son habitualmente diagnosticados después de que el cáncer se haya metastatizado. En esta fase tardía de la enfermedad, el tratamiento es típicamente invasivo e ineficaz. Se piensa generalmente que la detección temprana del cáncer antes de la metástasis conducirá a una mejora drástica en el resultado del tratamiento.

20 Continuamente se están descubriendo también biomarcadores que son indicativos de otros diversos estados patológicos y afecciones tan variados como la enfermedad de Alzheimer y la diabetes. Para muchas de estas enfermedades, el diagnóstico temprano de la enfermedad permite opciones de tratamiento que tienen una mayor posibilidad de éxito que un tratamiento en fase tardía. Además, en algunos casos, el diagnóstico temprano de una enfermedad o predisposición a una enfermedad puede incluso permitir a la persona diagnosticada que realice cambios en su estilo de vida que puedan ayudar a prevenir e invertir el curso de la enfermedad sin la necesidad de un tratamiento médico más implicado.

25 Los biomarcadores son ácidos nucleicos, proteínas, fragmentos de proteínas o metabolitos indicativos de un estado biológico específico, que están asociados con el riesgo de contraer o presentar una enfermedad (Frank y Hargreaves; *Nature reviews* **2003**, 2, (7), 566-80). La investigación de biomarcadores ha revelado que proteínas y péptidos circulantes de baja abundancia presentan una fuente rica de información en relación con el estado del organismo en su conjunto (Espina et al. *Proteomics* **2003**, 3 (11), 2091-100). Dos obstáculos principales han evitado que estos descubrimientos alcancen un beneficio clínico: 1) biomarcadores relevantes de la enfermedad en la sangre o fluidos corporales pueden existir en concentraciones sumamente bajas dentro de una mezcla compleja de biomoléculas y podrían ser enmascarados por especies de alta abundancia tales como albúmina, y 2) la degradación de biomarcadores proteína puede producirse inmediatamente después de la recogida de sangre o del fluido corporal como resultado de proteinasas endógenas o exógenas.

30 La concentración de proteínas y péptidos que comprenden el proteoma circulatorio complejo oscila entre 10^{-12} mg/mL y 10^{-3} mg/mL, abarcando diez órdenes de magnitud, representando unas pocas proteínas de elevado peso molecular tales como albúmina e inmunoglobulinas el 90% del contenido total en proteínas (Anderson y Anderson, *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1, (11), 845-67). Sin embargo, las proteínas de baja abundancia y de bajo peso molecular y los metabolitos también presentes en la sangre proporcionan una riqueza de información y suponen una gran promesa como fuente de nuevos biomarcadores. Métodos convencionales tales como electroforesis en gel bidimensional, no tienen la sensibilidad ni la resolución para detectar y cuantificar proteínas de baja abundancia de bajo peso molecular y metabolitos. También, a pesar de la sensibilidad moderadamente elevada de los modernos espectrómetros de masas (concentración atomolar), su intervalo de funcionamiento abarca más de tres-cuatro órdenes de magnitud y, por lo tanto, las proteínas menos abundantes están enmascaradas por proteínas más abundantes. Por consiguiente, las etapas de preparación de muestras habituales para experimentos de espectrometría de masas (EM) comienzan con el agotamiento de proteínas muy abundantes utilizando columnas de agotamiento de inmutofinidad comercialmente disponibles (Agilent, Sigma y Beckman-Coulter). Después del agotamiento, se realiza el fraccionamiento por medio de cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio de iones y/o enfoque isoeléctrico. Sin embargo, la separación de proteínas de elevado peso molecular abundantes nativas puede reducir significativamente el rendimiento de biomarcadores candidatos, ya que recientemente se ha demostrado que la vasta mayoría de biomarcadores de baja abundancia están asociados de forma no covalente y endógena con las proteínas de soporte que están siendo separadas (Lopez et al., *Clinical chemistry* **2007**, 53, (6), 1067-74; Conrads et al., *Bio Techniques* **2006**, 40, (6), 799-805; Lowenthal et al., *Clin Chem*

2005, 51, (10), 1933-45); Lopez et al., *Clinical chemistry* 2005, 51 (10), 1946-54). Para resolver este problema se han propuesto métodos tales como la ultrafiltración de exclusión por tamaños bajo condiciones desnaturalizantes (Zolotarjova et al., *Proteomics* 2005, 5, (13), 3304-13), la electroforesis desnaturalizante por elución continua (Camerini et al., *Proteomics Clin. Appl.* 2007, 1, 176-184) o el fraccionamiento de suero por medio de sustratos no porosos (Geho et al., *Bioconjug Chem* 2006, 17, (3), 654-61). Además de ello, estos mismos hallazgos recientes apuntan a la región de bajo peso molecular del proteoma como una fuente rica y sin explotar de candidatos biomarcadores (Tirumalai et al., *Molecular & cellular proteomics* 2003, 2, (10), 1096-103; Merrell et al., *J of biomolecular techniques* 2004, 15, (4), 238-48; Orvisky et al. *Proteomics* 2006, 6, (9), 2895-902).

Además de las dificultades asociadas con la recogida y el enriquecimiento de biomarcadores candidatos a partir de mezclas de proteínas naturales complejas (tales como sangre), la estabilidad de estos biomarcadores potenciales plantea un reto. Inmediatamente después de la obtención de sangre (p. ej. por venipuntura), las proteínas en el suero se vuelven susceptibles a la degradación por parte de proteasas endógenas o proteasas exógenas del entorno tales como proteasas asociadas con el proceso de coagulación de la sangre, enzimas liberadas de hematíes o asociadas con contaminantes bacterianos. Por lo tanto, biomarcadores diagnósticos candidatos en la sangre se pueden someter a degradación durante el transporte y almacenamiento. Esto se convierte en un asunto incluso más importante para la fidelidad de biomarcadores dentro de grandes depósitos de suero y fluidos corporales que son recogidos de una amplia diversidad de instituciones y lugares en los que las muestras pueden ser transportadas sin congelación.

Como tal, existe una necesidad en la técnica de partículas que permitan el enriquecimiento y encapsulación de clases seleccionadas de proteínas y péptidos a partir de mezclas complejas de biomoléculas tales como plasma, y que las proteja de la degradación durante la subsiguiente manipulación de la muestra. Los analitos capturados podrían ser entonces fácilmente extraídos de las partículas mediante electroforesis, permitiendo un análisis cuantitativo subsiguiente. Partículas de este tipo proporcionarían una poderosa herramienta que es adecuada de forma exclusiva para el descubrimiento de nuevos biomarcadores para enfermedades en fase temprana tales como cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para inhibir o prevenir la degradación de analitos de proteínas en una muestra de material biológico que también contiene una proteasa, que comprende poner en contacto la muestra con partículas de captura para los analitos, en donde las partículas de captura comprenden una matriz polimérica que tiene un tamaño de poros que, bajo determinadas condiciones, permite que los analitos y la proteasa penetren en la matriz polimérica, al tiempo que excluyen que otros compuestos penetren en la matriz polimérica, permitiendo a la muestra y a las partículas de captura permanecer en contacto durante un período de tiempo para que las partículas de captura secuestren los analitos y proteasa y, con ello, inhiban o eviten la degradación de los analitos secuestrados.

El analito de proteína se puede seleccionar del grupo que consiste en: proteínas, glicoproteínas, proteolípidos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, biomarcadores, compuestos de fármacos, odorantes volátiles, productos tóxicos y contaminantes.

En determinadas realizaciones, la matriz polimérica es expandible y contráctil; opcionalmente, en los casos en los que la matriz polimérica se expande o contrae, el tamaño de los poros de la matriz de gel se expande o contrae, respectivamente.

En realizaciones preferidas, la matriz polimérica es expansible y contráctil en respuesta a un estímulo aplicado; preferiblemente, en donde el estímulo aplicado es un cambio térmico, eléctrico, magnético, de ultrasonidos, presión, radiante, láser, osmótico o de pH. Alternativamente, la matriz polimérica puede ser expansible o contráctil tras el tratamiento con una enzima.

En otras realizaciones, la matriz polimérica puede comprender, además, un agente atrayente; opcionalmente

- (a) en donde el agente atrayente es secuestrado con la partícula de captura; o
- (b) en donde el agente atrayente es unido de forma covalente a la partícula de captura; o
- (c) en donde el agente atrayente está integrado en la matriz polimérica.

En otras realizaciones preferidas, el agente atrayente es un ligando de afinidad; opcionalmente, en donde el ligando de afinidad comprende un anticuerpo o proteína, un aptámero, ácido nucleico, un fármaco, un producto químico, un metabolito, un lípido, un glicolípido, un fosfolípido, un polipéptido, un grupo de afinidad o un grupo metálico.

La matriz polimérica puede ser una matriz co-polimérica que comprende un monómero estructural y un monómero de

afinidad. El monómero estructural se puede seleccionar del grupo que consiste en: acrilamida y derivados de la misma, acrilamidas N-alkil-sustituídas; N,N-metilenbisacrilamida, N,N-cistaminbisacrilamida, N-vinilalquilamidas, ácido acrílico, ácido metacrílico, alilamina, estireno, glutamato de bencilo, ácido 2-etilacrilico, 4-vinilpiridina, silicona, metacrilato de hidroxietilo, óxido de etileno, tereftalato de butilenos, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, 5
vinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, lactida, glicolida, caprolactona, hidroxialcanoatos, quitosano, ácido hialurónico, almidón, celulosa y agarosa; más preferiblemente, en donde el monómero estructural es ácido N-isopropilacrilico.

El monómero de afinidad puede comprender un resto cargado positivamente; preferiblemente, en donde el resto cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en: grupos aminas y grupos amida.

10 Alternativamente, el monómero de afinidad puede comprender un resto cargado negativamente; preferiblemente, en donde el resto cargado negativamente se selecciona del grupo que consiste en: grupos ácidos carboxílico, grupos hidroxilo, grupos tiol y grupos fosfato. Como otra alternativa, el monómero de afinidad se puede seleccionar del grupo que consiste en: colorantes de afinidad, grupos ácido borónico, ácidos nucleicos, glicopéptidos, glicoproteínas, ciclodextrinas, calixarenos, grupos porfirina y grupos alifáticos.

15 El monómero de afinidad puede ser ácido acrílico.

En realizaciones preferidas, la partícula de captura tienen un núcleo que comprende una matriz co-polimérica que comprende un monómero estructural y un monómero de afinidad; y una envoltura que comprende una matriz polimérica que comprende un monómero de envoltura, en donde la matriz co-polimérica y la matriz polimérica tienen cada una un tamaño de poros que, bajo determinadas condiciones, permiten que el analito penetre en las matrices, 20
al tiempo que excluyen que otros compuestos de la muestra penetren en las matrices.

En determinadas realizaciones preferidas, la partícula de captura tiene un tamaño del corte del peso molecular de 5 a 100 kDa; más preferiblemente, 20 a 50 kDa.

Métodos de la invención pueden comprender, además, aislar las partículas de captura de la muestra; y liberar el analito de la partícula de captura; preferiblemente, en los que el aislamiento de las partículas de captura se realiza moviendo físicamente las partículas. Las partículas se pueden mover físicamente mediante exposición a un campo magnético, un campo eléctrico, un gradiente de pH, un gradiente de disolventes, un flujo de fluido, un flujo microfluídico o una fuerza física. 25

Alternativamente, las partículas se pueden mover físicamente uniendo las partículas a un sustrato; preferiblemente, en donde el sustrato es una perla o una superficie.

30 En determinadas realizaciones, la matriz polimérica tiene un tamaño de poros que, bajo una primera condición, permite que el analito atraviese el poro, y que tiene un tamaño de poros bajo una segunda condición, que no permite que el analito atraviese el poro; y en donde la muestra contactada y las partículas de captura se exponen a la primera condición durante el período de tiempo suficiente para que las partículas de captura secuestren el analito; seguido de exponer las partículas de captura a la segunda condición; aislar las partículas de captura de la mezcla; y re-exponer las partículas de captura a la primera condición para liberar el analito de la partícula de captura. 35

Descripción de los dibujos

Figura 1. Composición química de partículas. Estructura de (A) N-isopropilacrilamida (NIPAm) y su polímero, (B) metilenbisacrilamida y (C) NIPAm y ácido acrílico y sus polímeros.

Figura 2. Caracterización de las partículas. (A) Medición por dispersión de la luz del tamaño de partículas de NIPAm en función de la temperatura (el diámetro disminuye a medida que aumenta la temperatura). (B) Gráficas de correlación del tamaño de partículas de NIPAm/AAc con la temperatura (el diámetro disminuye a medida que aumenta la temperatura) y pH (el diámetro disminuye a medida que disminuye el pH). Imágenes AFM de (C) partículas de NIPAm y (D) partículas de NIPAm/AAc sobre mica. 40

Figura 3. Dibujo esquemático del tamizado molecular de partículas en disolución. Se recogen proteínas de bajo peso molecular; se excluyen proteínas de elevado peso molecular. 45

Figura 4. Análisis de citometría de flujo de partículas incubadas con FITC. (A) La absorción es dependiente de la dosis. (B) La absorción alcanza rápidamente la saturación con una concentración de FITC de 20 μ M. Partículas de NIPAm también se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) marcada con FITC, PM 66.000 Da, con una relación colorante:molécula de 1:1 (FITC-BSA, Sigma), insulina marcada con FITC, PM 3.500 Da, con una relación colorante:molécula de 1:7 (Invitrogen) o mioglobina marcada con FITC, PM 17.000 Da, con una relación colorante:molécula de 1,36. La mioglobina (Sigma) se marcó con FITC por medio del kit de marcaje con colorante HOOK (G Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del vendedor. Se ajustaron concentraciones de todas las 50

especies fluorescentes con el fin de igualar la señal de fluorescencia.

Figura 5. Partículas de NIPAm incubadas con FITC y proteínas marcadas con FITC: mediciones por citometría de flujo de (A) BSA e insulina, (B) mioglobina y FITC libre. (C) SDS-PAGE de partículas incubadas con insulina: pista 1) disolución de insulina (testigo), 2) sobrenadante de NIPAm (Fuera, sustancia excluida de las partículas), 3) lavado 1, 4) lavado 2, 5) partículas de NIPAm (Dentro, sustancia capturada por las partículas), (D) SDS-PAGE de partículas de NIPAm incubadas con BSA y mioglobina: 1) BSA y mioglobina (testigo), 2) sobrenadante de NIPAm (Fuera), 3) lavado 2, 4) partículas de NIPAm (Dentro). BSA está totalmente excluido.

Figura 6. Representación esquemática de secuestro basado en afinidad.

Figura 7. Secuestro de proteínas por parte de partículas de NIPAm/AAc (+ cebo) frente a partículas de NIPAm (- cebo), análisis mediante SDS-PAGE de (A) secuestro de mioglobina (disolución acuosa, pH 5,5) por parte de partículas + y - cebo. Pista 1) mioglobina, 2) sobrenadante de NIPAm (Fuera), 3) partícula de NIPAm (Dentro), 4) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), 5) partícula de NIPAm/AAc (Dentro), 6) partículas de NIPAm/AAc 1:64, 7) partículas de NIPAm/AAc 1:32, 8) partículas de NIPAm/AAc 1:128 y 9) partículas de NIPAm/AAc 1:256. (B) Secuestro de BSA y mioglobina por parte de partículas + cebo (NIPAm/AAc) a dos valores de pH. Pista 1) BSA y mioglobina, pH 5,5, 2) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), pH 5,5, 3) lavado 3, pH 5,5, 4) partículas de NIPAm/AAc (Dentro), pH 5,5, 5) lavado 2, pH 5,5, 6) lavado 1, pH 5,5, 7) BSA y mioglobina, pH 8,8) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera) pH 8 y 9) partículas de NIPAm/AAc (Dentro), pH 8.

Figura 8. (A) Análisis mediante SDS-PAGE de partículas - y + cebo incubadas con BSA y lisozima: pista 1) disolución de BSA y lisozima antes de la introducción de las partículas, 2) sobrenadante de NIPAm (- cebo) (Fuera), 3) lavado 3, 4) partículas de NIPAm (- cebo) (Dentro), 5) lavado 2, 6) lavado 1, 7) sobrenadante de NIPAm/AAc (+ cebo) (Fuera), 8) lavado 3 y 9) partículas de NIPAm/AAc (+ cebo) (Dentro). (B) Análisis mediante SDS-PAGE de partículas de NIPAm/AAc (+ cebo) incubadas con marcadores del peso molecular (PM): 1) marcadores del PM, 2) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera) y 3) partículas de NIPAm/AAc (Dentro).

Figura 9. Análisis mediante SDS-PAGE de partículas + cebo incubadas con PDGF B y BSA. Pista 1) BSA y PDGF B, 2) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), 3) partículas de NIPAm/AAc (Dentro).

Figura 10. Análisis por citometría de flujo de (A) partículas de NIPAm y (B) partículas de NIPAm/AAc incubadas con disolución acuosa de insulina marcada con FITC e insulina marcada con FITC esparcida en suero, respectivamente.

Figura 11. Estudios del curso en el tiempo de la citometría de flujo de (A) partículas de NIPAm y (B) partículas de NIPAm/AAc incubadas con insulina marcada con FITC.

Figura 12. Estudio del curso en el tiempo de la absorción (A) valores medios del porcentaje con relación a la cantidad inicial de lisozima incubada con dos cantidades de partículas de NIPAm/AAc, según se mide mediante RPPAs (se muestran análisis de tres réplicas y desviación estándar). (B) Análisis por SDS-PAGE de una disolución de lisozima y BSA incubada con partículas de NIPAm/AAc. Pista 1) disolución de BSA y lisozima. 2-11) sobrenadante (Fuera) y partículas (Dentro) alternantes para cada uno de los tiempos de incubación de 5, 10, 20, 30 y 60 minutos. La absorción de lisozimas es rápida y completa, mientras que la exclusión de BSA es total.

Figura 13. Dibujo esquemático que ilustra la capacidad de partículas de proteger proteínas frente a una degradación enzimática.

Figura 14. Partículas de NIPAm/AAc (+ cebo) protegen a proteínas ligadas de la degradación por parte de enzimas que puedan estar presentes. (A) Partículas de NIPAm/AAc incubadas con una disolución que contiene lisozima y tripsina durante 1 h: pista 1) lisozima, 2) lisozima incubada con tripsina, 3) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), 4) partículas de NIPAm/AAc (Dentro), 5) BSA y lisozima, 6) BSA y lisozima + proteasa, 7) sobrenadante de partículas de NIPAm/AAc (Fuera) y 8) partículas de NIPAm/AAc (Dentro). (B) Partículas de NIPAm/AAc incubadas durante una noche con BSA, lisozima y tripsina: pista 1) lisozima, 2) tripsina, 3) lisozima + tripsina, 4) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), 5) partículas de NIPAm/AAc (Dentro), 6) lisozima y BSA, 7) BSA y lisozima + proteasa, 8) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera) y 9) partículas de NIPAm/AAc (Dentro).

Figura 15. Análisis por SDS-PAGE de lisozima reducida y alquilada, expuesta a digestión triptica e incubada con partículas + cebo y - cebo. (A) Lisozima + tripsina reducida y alquilada, incubada con partículas de NIPAm/AAc: pista 1) lisozima, 2) lisozima reducida y alquilada, 3) + tripsina, 4) sobrenadante de NIPAm/AAc (Fuera), 5) partículas de NIPAm/AAc (Dentro). (B) Lisozima reducida y alquilada, incubada con partículas de NIPAm: pista 1) sobrenadante de partículas de NIPAm (Fuera), 2) partículas de NIPAm (Dentro), 3) + tripsina sobrenadante de NIPAm (Fuera), 4) + tripsina partículas de NIPAm (Dentro), 5) + tripsina, 6) BSA + disolución de proteína reducida y alquilada, incubada con partículas de NIPAm, sobrenadante (Fuera), 7) partículas de NIPAm (Dentro).

Figura 16. Partículas de la envoltura del núcleo tienen el mismo tamizado de peso molecular que partículas de

NIPAm/AAC. Disolución de proteínas testigo se incubó con NIPAm/AAC y partículas de la envoltura del núcleo. Pista 1) disolución de proteínas testigo, 2) sobrenadante de partículas NIPAm/AAC (Fuera), 3) partículas de NIPAm/AAC (Dentro), 4) sobrenadante de partículas de la envoltura del núcleo (Fuera), 5) partículas de la envoltura del núcleo (Dentro).

- 5 Figura 17. Las partículas de la envoltura del núcleo protegen a la lisozima de una proteólisis por quimotripsina. Pista 1) lisozima, 2) quimotripsina, 3) lisozima + quimotripsina, 4) lisozima + quimotripsina incubadas con partículas de la envoltura del núcleo, sobrenadante (Fuera), 5) lisozima + quimotripsina incubadas con partículas de la envoltura del núcleo, partículas (Dentro), 6) lisozima + BSA + quimotripsina, 7) lisozima + BSA + quimotripsina incubadas con partículas de la envoltura del núcleo, sobrenadante, 8) lisozima + BSA + quimotripsina incubadas con partículas de la envoltura del núcleo, partículas (Dentro), 9) lisozima + BSA.

Descripción detallada de la invención

Se describen en esta memoria métodos para recoger biomarcadores utilizando partículas de captura capaces de seleccionar selectivamente biomarcadores específicos a partir de una mezcla, después de lo cual las partículas de captura se separan de la mezcla y los biomarcadores se liberan de las partículas de captura.

- 15 Las partículas de captura pueden tener una o más de las siguientes características: a) una capacidad de seleccionar el tamaño y/o masa de la molécula a capturar, b) una capacidad de seleccionar las propiedades de afinidad de la molécula a ser capturada, y/o c) una capacidad de capturar y/o liberar la molécula deseada en respuesta a un tratamiento físico o químico. Las partículas utilizadas en el método de la presente invención pueden cumplir esta misión en microvolumen, eliminando la necesidad de procesos multi-etapa convencionales que requieren, p. ej.,
20 columnas de afinidad, columnas de fase inversa y etapas de tamiz molecular. Las características de las partículas de captura dependen de los materiales utilizados para construir las partículas de captura. Ejemplos de determinados tipos de partículas de captura preparadas a partir de determinados materiales se recogen en esta memoria, pero resultará obvio para un experto en la técnica que existen otras combinaciones y variaciones de partículas de captura no explícitamente recogidas en esta memoria descriptiva, que tengan características que puedan determinarse del modo en el que son construidas y que caen dentro del alcance de las reivindicaciones recogidas más abajo.

- A lo largo de esta descripción, se describirá la recogida de biomarcadores y otros analitos. Los métodos de la presente invención definidos en esta memoria se pueden adaptar para recoger cualquier tipo de molécula o compuesto de interés, tanto biomarcadores producidos por una fuente viva u otros analitos que es una proteína que se puede seleccionar de una glicoproteína, proteolípidos, hormona, citoquina, factor de crecimiento, biomarcador,
30 compuesto de fármaco, agente odorante volátil, agente tóxico o contaminante.

- Las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención pueden estar constituidas por un material de tamiz molecular. Con ello se pretende dar a entender que el material es poroso, similar al látex, aplanado, o que tiene otras propiedades que permiten penetrar a analitos de una masa o peso molecular definido. El tamaño de los poros del tamiz es un determinante de si el analito puede penetrar en la partícula de captura. La partícula, por sí misma, puede ser de cualquier tamaño adecuado, p. ej. de 1 nm o menor; de aproximadamente 1 nm - 100 µm; de aproximadamente 5 nm - 50 µm, de aproximadamente 10 nm - 20 µm; de aproximadamente 10 nm - 10 µm; incluidos cualquiera y todos los valores entremedias. Las partículas utilizadas en métodos de la presente invención pueden tener cualquier forma adecuada, que incluye, pero no se limita a esferas, tubos, estructuras ramificadas, poliedros y válvulas micro-fluídicas.

- 40 Los materiales de tamiz utilizados en la construcción de las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención se pueden diseñar con el fin de que permitan que sólo analitos de un determinado tamaño penetren dentro de las partículas de captura. El corte por tamaño de las partículas de captura dependerá de la manera en la que las partículas se hayan de utilizar. El tamaño de corte, tal como se utiliza en esta memoria, pretende describir el tamaño aproximado de un analito que es capaz de penetrar en la partícula de captura. Por ejemplo, un tamaño de corte del peso molecular (PM) de 50 kDa significa que moléculas de aproximadamente 50 kDa o de un tamaño menor serán capaces de penetrar en las partículas de captura, mientras que moléculas de aproximadamente más de 50 kDa quedarán excluidas de las partículas. Las partículas pueden tener un tamaño de corte del PM de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 100 kDa, a pesar de que también se contemplan partículas con otros tamaños de corte del PM fuera de este intervalo. Tal como se describe en esta memoria, las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención pueden estar hechas de materiales "inteligentes" capaces de cambiar de tamaño en respuesta a estímulos. En estos casos, el tamaño de corte del PM de la partícula puede cambiar a medida que cambia el tamaño de la partícula, p. ej. una partícula puede tener un tamaño de corte del PM específico bajo determinadas condiciones y un tamaño de corte del PM diferente bajo otras condiciones.

- 55 Una característica de las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención es su capacidad de "atrapar" o secuestrar un analito una vez que ha penetrado en la partícula. La captura se consigue utilizando

materiales de tamiz que son capaces de contraerse y/o expandirse en respuesta a un tratamiento físico o químico para producir las partículas. Por ejemplo, se pueden utilizar materiales que, cuando se someten a un tratamiento químico o físico, se contraen o encogen, atrapando con ello al analito en su interior. A materiales de este tipo se les puede aludir como “materiales inteligentes” que tienen la capacidad de cambiar la forma o el tamaño al ser sometidos a un tratamiento físico o químico.

Cualquier material que tenga estas propiedades se puede utilizar, sin restricción, para producir las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención. Estos materiales pueden ser polímeros hechos de: acrilamida y derivados de los mismos, N-isopropilacrilamida (p. ej. Jones y Lyon, *Macromolecules*, 36: 1988-1993, 2003; Jones y Lyon, *Macromolecules* 33: 8310-8306, 2000) y otras acrilamidas N-alkil-sustituidas; N,N-metilenbisacrilamida, N,N-cistaminbisacrilamida, N-vinilalquilamidas, ácido acrílico, ácido metacrílico, alilamina, estireno, glutamato de bencilo, ácido 2-etilacrílico, 4-vinilpiridina, silicona, metacrilato de hidroxietilo, óxido de etileno, tereftalato de butilenos, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, vinilpirrolidona y etileno-acetato de vinilo. Las de partículas de captura se pueden hacer de polímeros biodegradables constituidos por lactida, glicolida, caprolactona e hidroxialcanoato. Los polímeros se pueden constituir por quitosano, ácido hialurónico, almidón, celulosa y agarosa. Los polímeros utilizados para producir las partículas de captura pueden o pueden no estar constituidos por unidades reticulables. En el caso de polímeros reticulables, las reticulaciones se pueden formar de manera permanente o reversible. Los polímeros pueden ser polímeros con una sola unidad repetitiva o pueden ser co-polímeros que tengan dos o más unidades monómeras que están incluidas en el polímero.

Otros ejemplos de materiales utilizados pueden ser elastómeros cristalinos líquidos ferroeléctricos; polímeros piezoeléctricos, hidrogeles “inteligentes”, geles, materiales cerámicos, aleaciones y polímeros, etc. Otros ejemplos de materiales adecuados se pueden encontrar en Galaev et al., páginas 835-849; Zentel; páginas 850-860; Harrison y Ounaies, páginas 860-873; en *Encyclopedia of Small Materials*, volúmenes 1-2, editada por Schwartz, Mel © 2002 John Wiley & Sons. Ejemplos de otros materiales adecuados como materiales de tamizado son nanocables tejidos o reticulados, nanotubos de carbono, coloides de metales, claterinas, colágeno, polisacáridos modificados, silicio, sílice, péptidos enlazados constituidos por aminoácidos, polímeros constituidos por ácidos nucleicos (véase, p. ej. Chittimalla et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (32), 11436-41), polímeros de aminoácidos, lípidos (véase, p. ej., *Advanced Drug Delivery Reviews, Lipid Nanoparticles: Recent Advances*, **2007**, 59 (6), 375 - 530), virus auto-ensamblados y proteínas auto-ensambladas. Las partículas de captura se pueden preparar de forma rutinaria por métodos conocidos en la técnica o según se describen en cualquiera de las referencias arriba mencionadas.

Tratamientos físicos y/o químicos que se pueden utilizar para contraer y/o expandir el material del tamiz incluyen tratamientos térmicos, eléctricos, magnéticos, por ultrasonidos, de presión, radiantes, por láser, osmóticos, de pH, de sal, enzimáticos, oxidación/reducción, deshidratación/rehidratación, ultravioleta, radiación, luz roja de alta intensidad y tratamientos similares, tal como se conocen en la técnica.

El material del tamiz puede contraerse o encoger de forma reversible o no reversible. Por ejemplo, las partículas de captura se pueden disponer en una mezcla en la que se permite que penetren los analitos y luego se encogen de manera no reversible para capturar al analito. Esto podría ser útil en los casos en los que el objetivo consiste en separar un contaminante de una disolución, y no es necesario analizar o evaluar adicionalmente la naturaleza del analito capturado, no requiriendo así que sea expandido. Alternativamente, partículas de captura no reversibles se pueden desmantelar mediante tratamiento con sonidos u otras fuerzas perturbadoras que destruyen la integridad de la partícula.

Las partículas de captura pueden comprender, además, un agente atrayente capaz de atraer e interactuar con un biomarcador. Los agentes atrayentes pueden ser cualquier sustancia que sea capaz de interactuar específicamente con un analito de interés. El agente atrayente puede ser un ligando de afinidad y puede ser: anticuerpos y derivados de los mismos (p. ej. fragmentos Fab y anticuerpos de cadena sencilla); proteínas de unión y péptidos (p. ej. receptores o fragmentos de los mismos para ligandos específicos y péptidos de polihistidina), incluidas proteínas modificadas; pares de unión (tales como estreptavidina/biotina); sustratos; metales; agentes quelantes; ácidos nucleicos; aptámeros; bolsillos de unión de enzimas; lectinas; calixarenos para la absorción de moléculas pequeñas; metales o sales de metales (p. ej. Fe para grupos heme, TiO₂ para péptidos fosforilados y proteínas); colorantes de afinidad; compuestos farmacéuticamente activos; péptidos y fullerenos, compuestos lipofílicos, compuestos aromáticos y/o un grupo de afinidad que es específico para un analito de interés. Las partículas de captura también se pueden formar utilizando técnicas de impresión molecular tal como son bien conocidas en la técnica. Las partículas de captura se pueden marcar para unir moléculas o familias de moléculas específicas.

El agente atrayente puede ser un resto químico capaz de interactuar química o electrostáticamente con el analito. Agentes atrayentes de este tipo pueden incluir un grupo carboxilo, grupo amina, lípido, grupo fosfato, grupo amida, grupo hidroxilo, grupo éster, grupo acrílico, grupo tiol, ácido acrílico, superficie hidrófoba, superficie hidrófila o cualquier otro resto capaz de interactuar química o electrostáticamente con el analito.

Los agentes atrayentes se pueden asociar con una partícula de captura de cualquier modo adecuado. Por ejemplo,

se pueden utilizar como un núcleo o centro alrededor del cual se reviste o deposita/nuclea el material del tamiz con el fin de formar la partícula de captura; se pueden incorporar directamente al material de tamiz antes de formar la partícula (es decir, en los casos en los que el agente atrayente sea un componente del material de tamiz); se pueden acoplar convencionalmente (de forma covalente o no covalente) a las superficies de los poros del material de tamiz; etc. Los agentes atrayentes también se pueden cargar en la partícula de captura expandiendo el material de tamiz a través de un tratamiento físico o químico apropiado para alcanzar una porosidad que sea lo suficientemente grande como para admitir al ligando, y luego poner en contacto el material de tamiz con el agente atrayente bajo condiciones eficaces para que penetre la partícula. Una vez que la partícula se ha cargado con el agente atrayente, se puede encoger mediante tratamiento físico o químico apropiado, reduciendo con ello la porosidad del material de tamiz de modo que analitos diana siguen siendo capaces de penetrar en la partícula, pero se excluyen los analitos mayores. La porosidad del tamiz se puede reducir después de la etapa de carga del agente atrayente a un tamaño de poros que sea lo suficientemente pequeño para bloquear que se difunda el ligando de afinidad, haciendo innecesario enlazar al agente atrayente al material del tamiz. Sin embargo, si se desea, se pueden utilizar procesos de acoplamiento para enlazar el agente atrayente al material del tamiz.

Partículas de captura cebadas con ligandos de afinidad proporcionan una etapa de selección del analito, además de la selección para el tamaño o masa del analito. Por ejemplo, se puede expandir una partícula de captura para permitir que los analitos penetren en ella y, luego los analitos se pueden seleccionar adicionalmente en cuanto a su capacidad para unirse específicamente a un ligando de afinidad asociado con la partícula de captura. Después de haber conseguido la etapa de unión (p. ej. después de haber alcanzado el equilibrio), las partículas se pueden separar y someter a etapas de lavado para separar analitos no diana no unidos y, luego, se pueden encoger opcionalmente mediante un tratamiento químico o físico.

El agente atrayente puede ser opcionalmente un componente de un material de tamiz. Por ejemplo, el material de tamiz puede ser un co-polímero con unidades monoméricas que tienen una carga electrostática. El co-polímero puede estar constituido por unidades monómeras estructurales y unidades monómeras de afinidad no cargadas, de modo que el material de tamiz propiamente dicho es capaz de atraer un analito a capturar. Las unidades monómeras de afinidad pueden ser cargadas positiva o negativamente, de modo que el material de tamiz tiene una carga electrostática global. Se contempla también que las unidades monoméricas cargadas puedan ser tales que su carga puede ser cambiada variando el entorno del material de tamiz, p. ej. cambiando el pH o la temperatura de los medios que rodean a las partículas de captura. Las partículas de captura pueden permitir una selección, tanto del tamaño como de la afinidad de analitos.

En los casos en los que el material de tamiz es un co-polímero cargado, las unidades monoméricas cargadas pueden tener restos que las permitan ser cargadas bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, monómeros negativamente cargados pueden tener grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos fosfato u otros grupos capaces de portar una carga negativa. El monómero cargado negativamente puede ser opcionalmente ácido acrílico u otro monómero con un grupo ácido carboxílico. Monómeros cargados positivamente pueden tener grupos amina, amida u otros grupos capaces de portar una carga positiva. Los monómeros cargados positivamente pueden ser opcionalmente alilamina o quitosano.

En los casos en los que el material de tamiz es un co-polímero, unidades monómeras de afinidad pueden integrarse en el material de tamiz que permite la atracción de diversos tipos de analitos. Por ejemplo, co-polímeros se pueden integrar con monómeros que tienen: colorantes de afinidad que tienen afinidad por proteínas y péptidos; grupos ácido borónico que tienen afinidad por hidratos de carbono, ácidos nucleicos y glicopéptidos o glicoproteínas; ciclodextrinas que tienen afinidad por pequeñas moléculas; calixarenos que tienen afinidad por moléculas pequeñas; grupos porfirina que tienen afinidad por iones de metales; y grupos alifáticos que tienen afinidad por lípidos.

El material de tamiz puede ser una N-isopropilacrilamida (NIPAm), copolímero de ácido acrílico (AAc), cuyos grupos ácido carboxílico (CO_2H) colgantes están funcionalizados con una amplia gama de moléculas terminadas en amino o en alcohol. Estas moléculas pueden incluir alcanos, otros restos grasos para capturar el contenido en lípidos de la disolución, o colorantes. Las partículas pueden tener opcionalmente un núcleo hecho de copolímero de NIPAm/AAc que está rodeado por una capa polimérica de la envoltura constituida solamente por NIPAm.

Las partículas de captura pueden comprender también, además, marcadores detectables. Marcadores detectables puede ser cualquier resto o sustancia que pueda ser detectado por cualquier medio. Estos incluyen puntos cuánticos, marcadores fluorescentes, enzimas, partículas magnéticas, etc. El marcador detectable puede estar asociado con cualquier región de la partícula de captura, incluidos sus poros y superficie exterior.

Marcadores detectables son útiles en un cierto número de modos, incluido para clasificar diferentes clases de partículas de captura. Por ejemplo, se pueden producir diferentes clases de partículas de captura, en que cada una de las clases posee una característica diferente (p. ej. un tamaño de poros diferente y/o un agente atrayente diferente), y cada una porta un marcador detectable diferente asociado con cada una de las clases de partículas. Esto permite que se identifique la propiedad de la clase de partícula (p. ej. capacidad de unirse a un agente atrayente

específico) determinando qué marcador detectable porta. Por ejemplo, una partícula con un anticuerpo de una sola cadena para PSA se puede marcar con FITC, y una partícula que contiene un anticuerpo para α -metilacil-CoA racemasa (AMACR) se puede marcar con TRITC. Después de realizar la etapa de captura, las partículas pueden clasificarse mediante citometría de flujo utilizando la clasificación por celda activada por fluorescencia, separando las partículas con contenido en PSA de las partículas con contenido en AMACR. En otras realizaciones, las partículas de captura se pueden funcionalizar con colorantes de carbocianina lipófilos y luego se puede separar su contenido en lípidos utilizando cromatografía en capa fina.

Partículas de captura se pueden mover en disolución u otros medios mediante la aplicación de campos eléctricos, campos magnéticos, a través del uso de pinzas láser o por su afinidad con el disolvente. Si las partículas de captura tienen una carga eléctrica global, éstas se pueden mover mediante la aplicación de un campo eléctrico. Esto puede ser especialmente aplicable cuando el material de tamiz ha sido modificado con el fin de que tenga una carga electrostática. Por ejemplo, se puede aplicar un campo eléctrico a través de un medio que contiene partículas de captura negativamente cargadas, y las partículas de captura se moverían hacia el electrodo positivo del dispositivo aplicando el campo eléctrico.

Las partículas de captura también se pueden modificar de modo que tengan restos magnéticos que son atraídos por un imán. Esto se puede hacer conformando el material de tamiz en torno a un núcleo magnético tal como un núcleo de Fe_3O_4 . Alternativamente, la superficie de las partículas de captura puede ser total o parcialmente revestida con nanopartículas magnéticas (véase, p. ej., Wong et al., *J. Magnetism and Magnetic Materials*, **2007**, 311 (1), 219-23). Se contempla, además, que se puedan formar co-polímeros con elementos magnéticos directamente incorporados en los polímeros.

También se contempla que las partículas de captura se puedan modificar de modo que tengan marcadores en superficie que puedan ser fácilmente unidos mediante dianas específicas, p. ej. las partículas pueden tener etiquetas de biotina, glutatión-S-transferasa o 6-histidina que se pueden unir mediante sustratos de estreptavidina, glutatión y níquel, respectivamente. Las partículas también se pueden formar utilizando reticulantes reversibles tales como los formados a partir de enlaces disulfuro que se pueden invertir mediante DTT. En estas realizaciones de la invención, una disolución que contiene partículas de captura se puede mezclar con perlas que tienen un sustrato adecuado, por ejemplo partículas marcadas con biotina se pueden mezclar con perlas marcadas con estreptavidina. Después de haber dejado que se unan una con otra, las perlas podrían ser separadas de la disolución utilizando centrifugación u otras técnicas conocidas en la técnica, contactando las partículas de captura con ellas.

Determinadas realizaciones de la invención se refieren a partículas de captura en fase de disolución y a métodos de utilizarlas para aislar analitos a partir de una muestra que tiene una o más de las siguientes etapas, p. ej. poner en contacto una muestra que comprende analitos con partículas de captura en fase de disolución bajo condiciones eficaces para que las partículas de captura atrapen de forma reversible y selectiva analitos de una masa molecular o tamaño de partícula definido, en que las partículas de captura están hechas con un material de tamiz molecular que es capaz de atrapar de forma reversible y liberar un analito de un tamaño de partícula o masa molecular definido.

Las partículas de captura utilizadas en los métodos de la invención permiten proteger a los analitos frente a la degradación por parte de proteasas y otros factores. Las partículas de captura pueden evitar que las proteasas degraden a analitos, debido a que los analitos y las proteasas están tan estrechamente unidos que evitan el alineamiento estérico necesario para que la proteasa escinda al analito. En estos casos, incluso a pesar de que la proteasa es capaz de penetrar en la partícula de captura, el analito permanece intacto.

Las partículas de captura utilizadas en los métodos de la presente invención pueden concentrar analitos de baja abundancia procedentes de un fluido. Si un analito está presente en un fluido a una baja concentración, las partículas de captura pueden utilizarse para recoger el analito del fluido original. Después de haber recogido el analito, éste se puede luego liberar a un segundo fluido que tenga un menor volumen. De este modo, analitos con concentraciones por debajo de los límites de detección de diversos métodos analíticos en sus fluidos originales se pueden concentrar de modo que tengan una concentración que pueda ser detectada y analizada fácilmente.

Las partículas de captura descritas pueden ser parte de kits que pueden utilizarse para aislar y/o identificar un analito. Los kits pueden tener cualquier tipo de dispositivo recolector para recoger la disolución u otro tipo de mezcla que contenga el analito. El dispositivo recolector puede ser un recipiente tal como un vacu-tainer (tubos con vacío), tubo, cartucho o dispositivo microfluídico. Se contempla que las partículas de captura puedan estar presentes en el recipiente o, alternativamente, sobre el recipiente se puede formar una capa de partículas de captura. Alternativamente, los dispositivos recolectores pueden ser láminas de tejido o material polimérico capaz de contener una capa de partículas de captura. Como tal, la partícula de captura puede transformarse en un tipo de parche, el cual puede ser aplicado a una superficie de la que se puede aislar un analito de interés o sobre la que pasa un analito de interés. El parche puede ser un parche que se puede aplicar a la piel, permitiendo aislar analitos de la superficie de la piel.

También se describe en esta memoria un sistema en el que partículas pueden ser movidas de forma continua entre diferentes etapas. En general:

Etapa 1: partículas de captura se mezclan con una muestra que comprende analitos;

Etapa 2: partículas de captura se separan de los restos en fase de disolución que no han sido capturados; y

5 Etapa 3: los analitos se eluyen de las partículas y se analizan.

El sistema está totalmente auto-contenido y automatizado, de modo que una muestra se introduce en el sistema y se obtiene un resultado sin requerir ninguna otra manipulación por parte del usuario. Un sistema de este tipo puede estar contenido en un sistema microfluídico o puede ser un sistema mayor de tipo de sobremesa.

10 En general, una muestra se añade a una cámara que contiene partículas de captura y se secuestra el analito de interés. Las condiciones medioambientales de la cámara pueden luego cambiarse de modo que las partículas de captura se reducen de tamaño según se describe en esta memoria, atrapando a los analitos en su interior. Las partículas de captura se pueden luego mover a una nueva cámara utilizando los métodos descritos en esta memoria, separando los analitos del resto de la muestra.

15 El análisis se puede realizar luego utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja, inmunoensayo en fase sólida, (p. ej. ELISA y similares), inmunoprecipitación, ensayo colorimétrico, ensayo radiométrico, ensayo fluorescente, lecho fluido / citometría de flujo, transferencia Western, secuenciación de proteínas y cualquier método analítico de la química para análisis de metabolitos, fármacos, moléculas pequeñas o proteínas.

20 Más allá del proceso de captura en fase de disolución, las partículas también se pueden utilizar para revestir superficies de soporte, para impregnar capas y para rellenar placas. Otros ejemplos incluyen revestir un parche con partículas retenidas por una malla y aplicar el parche a la piel de un paciente para capturar analitos presentes sobre y dentro de la piel.

25 Se puede utilizar cualquier muestra sin restricción, incluidos fluidos biológicos tales como sangre, componentes de la sangre, fluido cerebroespinal, linfa, lisados de células, lisados de tejidos, heces, orina, linfa, ascites, semen, etc.; muestras del entorno tales como muestras del suelo o extractos, aguas del mar, estanques o ríos; muestras de depósitos de agua y de agua potable; muestras procedentes de reacciones sintéticas químicas; muestras de alimentos; etc. Por ejemplo, los métodos comentados en esta memoria se pueden utilizar para detectar contaminantes en muestras de alimentos, de agua potable y del medio ambiente. Se puede recoger cualquier molécula de interés utilizando la presente invención, incluidas moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, fármacos, anticuerpos, ligandos, lipoproteínas, glicoproteínas, ácidos grasos, glicanos, derivados de los mismos y combinaciones de los mismos. Analitos incluyen biomoléculas que son derramadas de las superficies de las células, liberadas de células (p. ej. mediante exocitosis, lisis, etc.), metabolitos, productos de degradación, productos de digestión con proteasas y similares, sin limitación. En determinadas realizaciones de la invención, los métodos se pueden utilizar para atrapar moléculas en un fluido biológico de un bajo peso molecular, especialmente aquellos que serían excluidos del cuerpo mediante filtración glomerular normal (riñón) (p. ej. moléculas de menos de 30.000 Dalton) que son solubles y que flotan libremente en el fluido o que están asociadas con proteínas de soporte. En general, la presente invención se puede utilizar para capturar cualquier analito de interés, cuya detección se desee. Las partículas se pueden utilizar en disolución durante cualquier reacción química para capturar selectivamente los productos de reacción y, por lo tanto, productos de menor concentración en disolución. Esto puede permitir que la reacción química se complete o se impulse a que la reacción química se complete secuestrando una o más especies de la reacción a medida que se acumulan a lo largo del tiempo. Con respecto a fluidos corporales, las partículas de captura de la presente invención también se pueden utilizar para detectar moléculas exógenas, es decir, una molécula que se introdujo en el cuerpo del sujeto del que se obtuvo la muestra. Moléculas exógenas se pueden introducir de forma activa o pasiva en el sujeto. Ejemplos de moléculas exógenas incluyen moléculas presentes en o en forma de fármacos, alimentos, tabaco, productos del medio ambiente y contaminantes (p. ej. plaguicidas, monóxido de carbono, etc.) y esencialmente cualquier molécula que penetre en el cuerpo del sujeto a través de cualquier vía. Moléculas exógenas incluyen también sus metabolitos, subproductos y productos de degradación según se procesan o transforman en el cuerpo. Las partículas también se pueden utilizar como una herramienta para eliminar toxinas de la sangre. Las partículas se pueden aplicar para la diálisis de sangre, eliminando urea o para eliminar el colesterol en exceso para evitar ataques al corazón.

30

35

40

45

50

También se contempla que se puedan utilizar diferentes poblaciones de partículas de captura al mismo tiempo, teniendo cada una diferentes características con respecto a la especie de molécula que son capaces de capturar. Las diferentes poblaciones pueden estar marcadas unívocamente p. ej. con colorantes fluorescentes, y luego pueden separarse, p. ej., con citometría de flujo. Esta estrategia permite que una extracción total y separación de múltiples especies sea realizada en una sola etapa.

55

Tecnología de nanopartícula para el enriquecimiento y la preservación de biomarcadores

- Con el fin de acometer directamente los retos de baja abundancia y preservación, se pueden utilizar nanopartículas “inteligentes” para recolectar (acumular) clases seleccionadas de proteínas en disolución cuando se añaden a mezclas complejas de proteínas tales como plasma. La tecnología suministrable será partículas de recogida porosas originales que tengan una estructura única capaz de clasificar moléculas en disolución en base al tamaño y/o afinidad. Además de ello, la porosidad de las partículas puede ser térmicamente modificable, de modo que el analito capturado (p. ej. proteínas) puede ser liberado posteriormente para el análisis. Además, las proteínas o entidades químicas capturadas dentro de las partículas se pueden proteger frente a la degradación por parte de enzimas o el desarrollo microbiano.
- Esta tecnología propuesta puede evaluar la necesidad de medios para enriquecer, aislar y preservar proteínas y péptidos de baja abundancia en sangre, orina y tejidos. Es de esperar que moléculas de baja abundancia de este tipo contengan la información más específica sobre el estado de una pequeña lesión patológica. Nanopartículas inteligentes se pueden pre-dispensar a un tubo de recogida. Una vez que las partículas se suspenden dentro del fluido corporal, o el lisado de tejido, por ejemplo, las partículas realizan automáticamente (en una etapa) una cromatografía de afinidad y/o cromatografía por exclusión de tamaños en disolución. Las proteínas y otros metabolitos (biomarcadores candidatos) capturados dentro de las partículas inteligentes pueden, por lo tanto, ser unidos y/o secuestrados y protegidos frente a una degradación sustancial. Al sintonizar el tamaño de los poros y las propiedades de afinidad de las poblaciones de partículas inteligentes, se pueden capturar y enriquecer subconjuntos altamente específicos de biomarcadores a partir del volumen completo del fluido conseguido. Esto permitirá una preservación a la temperatura ambiente y un enriquecimiento de biomarcadores proteómicos de bajo peso molecular. Después del transporte del tubo de recogida al laboratorio de análisis, las nanopartículas se pueden aislar fácilmente, de modo que la carga de biomarcador unido/secuestrado se puede liberar para la caracterización utilizando cualquier técnica analítica. En un método alternativo, a los biomarcadores se puede acceder a través de un tratamiento destructivo de las nanopartículas.
- Esta tecnología puede ser de un bajo coste y aplicable en las estipulaciones clínicas rutinarias para la recogida continua y la conservación inmediata de biomarcadores de la sangre. Esto trasciende al entorno del hospital de amplia investigación y se extiende lo más plenamente a la práctica privada en donde la mayoría de los pacientes reciben una terapia. La fabricación de grandes cantidades de nanopartículas del tamaño de una micra “inteligentes” uniformes es ciertamente factible, mientras que también son posibles e igualmente aplicables otros tamaños mayores o menores. Tal como se describe más abajo, las partículas pueden capturar, acumular y purificar subconjuntos marcados de moléculas a partir de mezclas complejas de moléculas tales como el suero.

Fundamento para Elegir Partículas Inteligentes para la Recolección de Biomarcadores

- A geles polímeros termo-receptivos se les alude comúnmente como “geles inteligentes” y exhiben una respuesta controlable y no lineal a cambios en la temperatura de la disolución local, pH o aplicación de energía externa (Saunders, et al., 1999 *Advances in Colloid and Interface Science* 80, 1; Pelton, 2000, *Advances in Colloid and Interface Science* 85, 1). Polímeros de este tipo están constituidos por cadenas reticuladas que sufren una separación de fases termodinámicamente favorecida que conduce a un cambio en el volumen del gel (Tanaka et al., 1979, *Phys. Rev. Lett.* 42, 1556; Tanaka, et al., 1978, *Phys. Rev. Lett.* 40, 820). Los geles se pueden sintetizar a granel para adoptar la forma del recipiente o se pueden sintetizar en un intervalo de diámetros de partículas de 4 nm-100 μm (Tanaka, et al., 1980, *Phys. Rev. Lett.* 45, 1636; Tanaka, et al., 1985, *Phys. Rev. Lett.* 55, 2455). En cada caso, la estructura interna del material está constituida por cadenas flexibles que crean una estructura blanda y porosa que puede expandirse o contraerse de forma reversible de acuerdo con las condiciones locales de la disolución. Un ejemplo de un polímero “inteligente” es poli-(N-isopropilacrilamida) (NIPAm) que tiene una baja temperatura crítica de disolución (LCST) de 31°C en agua (Jones, 2003, *School of Chemistry and Biochemistry*, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, pág. 193). Por debajo de esta temperatura, la matriz polímera se expande con moléculas de disolvente, en que la unión del hidrógeno se produce entre el agua y los grupos amida a lo largo de la cadena principal del polímero (Jones, 2003, *School of Chemistry and Biochemistry*, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, pág. 193). A medida que la temperatura aumenta por encima de la LCST, los enlaces hidrógeno se rompen y se excluye el agua de la matriz interna, al tiempo que comienzan a dominar interacciones hidrófobas entre los grupos isopropilo que conducen a una disminución en el volumen global. Esta tecnología se puede aplicar para separar biomarcadores para la identificación.

- Un aspecto de la presente invención describe una parte de tamiz molecular de las partículas de captura, mientras que otro aspecto pertenece a una parte de unión del analito (captura con cebo). Es factible combinar la captura con cebo con el tamizado molecular en una sola partícula. Medios comunes para fraccionar mezclas complejas de proteínas consisten en utilizar dos clases de etapas cromatográficas secuenciales basadas en el dimensionado por afinidad y molecular (Adkins, et al., 2002, *Mol Cell Proteomics* 1, 947). El análisis de una mezcla compleja y altamente concentrada tal como plasma comienza habitualmente con la dilución de la muestra y la separación de

proteínas de alta abundancia tales como albúmina antes de la cromatografía y la electroforesis en gel. La tecnología de partícula inteligente descrita en esta memoria consigue las dos etapas de la separación sin el uso de cromatografía ni dilución. Más específicamente, se permite una selectividad añadida a través de la adición de moléculas de cebo en la partícula que unen/secuestran una población restringida de biomarcadores. Ácido acrílico (AAc), por ejemplo, se puede integrar en la partícula y puede funcionar como una resina de afinidad sintonizable. Por ejemplo, a pH bajo (3,5), el AAc dentro de la partícula estará predominantemente protonado, portando una carga positiva a ese pH. A condiciones de pH más elevado, los restos de AAc serán parcial o predominantemente desprotonados, lo cual creará un elemento de afinidad intrínseco y basado en la carga para proteínas positivamente cargadas. Al integrar AAc en el microgel, tanto las propiedades de carga como el tamaño de los poros de las partículas proporcionan medios para fraccionar doblemente proteínas a partir de mezclas complejas tales como suero.

La preservación mediante secuestro/unión de analitos permite estabilizar analitos (p. ej. biomarcadores candidatos) en disolución a la temperatura ambiente. Esto se puede conseguir mediante su secuestro dentro de las nanopartículas porosas. Se expone la hipótesis de que proteínas o moléculas secuestradas dentro de las nanopartículas no estarán disponibles para su acceso mediante enzimas degradativas en fase de disolución. Enzimas de este tipo pueden no ser capaces de penetrar en los poros de las partículas debido a su gran tamaño.

Además de ello, la captura e inmovilización por afinidad de la molécula de biomarcador candidata impedirá la disponibilidad tridimensional de la molécula de biomarcador, de modo que el complejo enzima-sustrato no puede formarse funcionalmente dentro de la partícula. Este concepto es en cierta medida análogo a la estabilización de proteínas mediante precipitación o filtración por precipitación. Aplicando la electroforesis capilar y la secuenciación por espectrometría de masas, los autores de la invención pueden estudiar la degradación inducida por parte de serina exógena o metaloproteinasas, y pueden comparar la tasa de fragmentación de las proteínas secuestradas en partículas frente a las libres en disolución. Partiendo de mezclas definidas de proteínas conocidas y pre-caracterizadas o pre-marcadas, los autores de la invención pueden progresar hacia la captura y estabilización de proteínas dentro de muestras de referencia de suero humano y plasma.

Partículas de captura

En determinadas realizaciones, los métodos de la presente invención separan y capturan especies moleculares a partir de muestras. En una realización de la invención se utilizan partículas inteligentes que tienen la capacidad de capturar específicamente especies moleculares con un tamaño molecular, masa y/o afinidad definidos característicos para aislar moléculas de interés a partir de una muestra que contiene típicamente una pluralidad de diferentes especies moleculares con tamaños variables. Las partículas se pueden añadir a la muestra y luego utilizar para capturar la especie molecular de interés.

Las partículas pueden tener una o más de las siguientes funcionalidades: a) una capacidad para seleccionar el tamaño, masa y/o propiedad de afinidad de la molécula a capturar y/o b) una capacidad para capturar y/o liberar la molécula deseada en respuesta a un tratamiento físico o químico. Las partículas pueden conseguir esta misión en microvolúmenes, eliminando la necesidad de procesos multietapa convencionales que utilizan columnas de afinidad, columnas de fase inversa y otros reactivos y dispositivos de purificación convencionales. Además de ello, se pueden utilizar diferentes clases de partículas de captura, cada una de ellas con diferentes características con respecto a la especie de molécula que son capaces de capturar, permitiendo así realizar en una sola etapa un perfil de extracción total de múltiples especies.

Métodos de la invención definidos en esta memoria utilizan partículas de captura en fase de disolución y las utilizan para aislar analitos a partir de una muestra, comprendiendo dicho método una o más de las siguientes etapas, que incluyen poner en contacto una muestra que comprende analitos con partículas de captura en fase de disolución bajo condiciones eficaces para que dichas partículas de captura atrapen de forma selectiva y opcionalmente reversible analitos de una masa molecular o tamaño de partícula definido, en donde dichas partículas de captura comprenden un material de tamiz molecular que es capaz de atrapar y, opcionalmente, liberar un analito de un tamaño o masa molecular de partícula definido. Otros aspectos de la presente invención tal como se describen con mayor detalle más abajo, también emplean partículas de captura específicas que atrapan de forma no reversible a analitos.

Muestras

Se puede utilizar cualquier muestra sin restricción, incluidos fluidos biológicos tales como sangre, componentes de la sangre, fluido cerebroespinal, linfa, lisados de células, lisados de tejidos, heces, orina, linfa, ascites, semen, vítreo ocular, etc.; muestras del entorno tales como muestras del suelo o extractos, aguas del mar, estanques o ríos; muestras de depósitos de agua y de agua potable; muestras procedentes de reacciones sintéticas químicas; muestras de alimentos, muestras del procesamiento de alimentos (p. ej. plantas del procesamiento de aves de corral); etc. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar para detectar contaminantes en muestras de alimentos, de agua potable y del medio ambiente.

Analitos

El término “analito” se refiere a cualquier molécula de interés, que incluye moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, derivados de los mismos y combinaciones de los mismos. Analitos incluyen biomoléculas que son derramadas de las superficies de las células, liberadas de células (p. ej. mediante exocitosis, lisis, etc.), metabolitos, productos de degradación, productos de digestión con proteasas y similares, etc., sin limitación. Métodos de la invención se pueden utilizar para atrapar moléculas en un fluido biológico de un bajo peso molecular, especialmente aquellos que serían excluidos del cuerpo mediante filtración glomerular normal (riñón) (p. ej. moléculas de menos de 30.000 Dalton) que son solubles y que flotan libremente en el fluido o que están asociadas con proteínas de soporte. En general, la presente invención se puede utilizar para capturar cualquier analito de interés, cuya detección se desee, que incluyen pero no se limitan a tamaños menores que aproximadamente 60.000 Dalton, menores que aproximadamente 50.000 Da, menores que aproximadamente 40.000 Da, menores que aproximadamente 30.000 Da, menores que aproximadamente 20.000 Da, menores que aproximadamente 10.000 Da, menores que aproximadamente 8.000 Da, menores que aproximadamente 6.000 Da, menores que aproximadamente 4.000 Da, menores que aproximadamente 2.000 Da, menores que aproximadamente 1.000 Da, incluidos todos los valores individuales dentro de cada intervalo establecido.

Con respecto a fluidos corporales, las partículas de captura también se pueden utilizar para detectar moléculas exógenas, es decir, una molécula que se introdujo en el cuerpo del sujeto del que se obtuvo la muestra. Moléculas exógenas se pueden introducir de forma activa o pasiva en el sujeto. Ejemplos de moléculas exógenas incluyen moléculas presentes en o en forma de fármacos, alimentos, tabaco, productos del medio ambiente y contaminantes (p. ej. plaguicidas, monóxido de carbono, etc.) y esencialmente cualquier molécula que penetre en el cuerpo del sujeto a través de cualquier vía. Moléculas exógenas incluyen también sus metabolitos, subproductos y productos de degradación según se procesan o transforman en el cuerpo.

Las partículas de captura se pueden utilizar en cualquier entorno, incluido in vivo, ex vivo e in vitro. Por ejemplo, las partículas también se pueden utilizar como una herramienta para eliminar toxinas de la sangre en un contexto in vivo o ex vivo. Por ejemplo, las partículas se pueden utilizar para separar residuos tóxicos de la sangre tales como creatinina y urea, reemplazando la necesidad de una diálisis convencional.

Material de Tamiz Molecular

Las partículas de captura utilizadas en métodos de la presente invención pueden estar constituidas por un material de tamiz molecular (o porción de tamiz molecular). Con ello, se quiere dar a entender que el material es poroso, similar a látex, apanalado o que tiene otras propiedades que permiten el paso de analitos de una masa o peso molecular definido, al tiempo que excluye a otros. El tamaño de los poros del tamiz es un determinante de si el analito puede penetrar en la partícula de captura. La partícula, propiamente dicha, puede ser de cualquier tamaño adecuado, p. ej. menor que aproximadamente 10 μm , entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 1 μm , entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 100 nm, entre aproximadamente 1 nm y 100 nm, entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm; entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 20 nm; entre aproximadamente 10 nm y 1 nm; incluidos todos los valores individuales dentro de cada uno de los intervalos señalados.

Poros en el material del tamiz se pueden diseñar en base a los métodos proporcionados a diámetros necesarios para la exclusión de moléculas indeseadas. Se prevén tamaños de poro medios entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 nm, 1 nm a 1 μm , 1 nm a 10 nm, 1 nm a 50 nm, 10 nm a 50 nm, 50 nm a 100 nm, 10 nm a 200 nm, 50 nm a 500 nm, 1 nm a 10 nm, 1 nm a 5 nm, y otros intervalos.

Una característica opcional de las partículas de captura es su capacidad de “atrapar” un analito una vez que ha penetrado en el material de tamiz. La captura se puede conseguir utilizando materiales de tamiz que son capaces de contraerse y/o de expandirse en respuesta a un tratamiento físico o químico. Por ejemplo, se pueden utilizar materiales que, cuando se someten a un tratamiento químico o físico, se contraen o encogen, atrapando con ello al analito en su interior. A materiales de este tipo también se les puede aludir como “materiales inteligentes”, los cuales tienen la capacidad de cambiar la forma o el tamaño sometidos a un tratamiento físico o químico. Se puede utilizar, sin restricción, cualquier material que tenga esta propiedad que incluye, pero no se limita, p. ej., a poli(acrilamida) y derivados de la misma; N-isopropilacrilamida (p. ej. Jones y Lyon, *Macromolecules*, 36: 1988-1993, 2003; Jones y Lyon, *Macromolecules* 33: 8310-8306, 2000) y otras acrilamidas N-alkil-sustituidas; poli(N-vinilalquilamidas); poli(ácido metacrílico), poli(glutamato de bencilo); poli(ácido 2-etilacrílico); poli(4-vinilpiridina); elastómeros cristalinos líquidos ferroeléctricos; polímeros piezoeléctricos, geles “inteligentes”, materiales cerámicos, aleaciones y polímeros, etc. Véase, también, p. ej., Galaev et al., páginas 835-849; Zentel; páginas 850-860; Harrison y Ounaies, páginas 860-873; en *Encyclopedia of Small Materials*, volúmenes 1-2, editada por Schwartz, Mel © 2002 John Wiley & Sons. Las partículas de captura se pueden preparar rutinariamente tal como se conoce en la técnica o se describe en cualquiera de las referencias antes mencionadas.

Las partículas de captura pueden no contener constituyentes de poli(N-isopropilacrilamida) alguno. Además, dichas partículas de captura pueden también excluir poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico).

Tratamiento Físico o Químico del Material de Tamiz

5 Tratamientos físicos y/o químicos que se pueden utilizar para contraer y/o expandir el material de tamiz pueden comprender tratamientos térmico, eléctrico, magnético, por ultrasonidos, presión, radiante, láser, osmótico, pH, sal, enzimático, oxidación/reducción, deshidratación/rehidratación, ultravioleta, radiación, luz roja de alta intensidad.

10 El material de tamiz se puede contraer o encoger de forma reversible o no reversible. Por ejemplo, las partículas de captura se pueden disponer en una disolución en donde se permite a los analitos penetrar y luego se encogen de manera no reversible para capturar al analito. Esto podría ser útil en los casos en que el objetivo consiste en separar un contaminante de una disolución, y no es necesario analizar ni evaluar adicionalmente la naturaleza del analito capturado, no requiriendo así ser expandido. Alternativamente, partículas de captura no reversibles pueden desmantelarse mediante tratamiento por ultrasonidos u otras fuerzas perturbadoras que destruyen la integridad de la partícula.

15 La partícula de captura puede ser una capa de expandirse y contraerse para permitir la captura y/o el secuestro de un analito.

20 La partícula de captura puede ser alternativamente una que no se expanda ni contraiga en un ningún grado significativo para permitir la absorción incrementada o reducida de un analito. Es decir, el volumen de la partícula es esencialmente fijo. Ejemplos de partículas de captura de este tipo incluyen partículas que comprenden proteínas virales, claterina, nanotubos de carbono o especies que no permiten la expansión/contracción descrita previamente. Un ejemplo que ilustra la preparación de una estructura poligonal a partir de claterina se describe en Jaarsveld et al., *Biochemistry*, 1981, 20, 4129-4135.

Porción de Unión al Analito (Afinidad)

Las partículas de captura pueden comprender propiedades de la proteína de superficie para la unión selectiva del analito y/o se pueden modificar mediante la fijación de restos que confieren propiedades de unión de este tipo.

25 Las partículas de captura pueden comprender, además, un ligando de afinidad o "cebo" de unión al analito. Términos y expresiones de este tipo pueden referirse a sustancias que son capaces de fijarse específicamente a un analito de interés. Ejemplos típicos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos y derivados de los mismos (p. ej. fragmentos Fab y anticuerpos de cadena sencilla); proteínas de unión (p. ej. receptores o fragmentos de los mismos para ligandos específicos); pares de unión (tales como estreptavidina/biotina); sustratos; metales; agentes quelantes, ácidos nucleicos; aptámeros; bolsillos de unión a enzimas; lectinas; y/o un grupo de afinidad que es específico para un analito de interés. El término "específico" tiene un significado funcional en el sentido de que el ligando de afinidad se puede utilizar para unirse selectivamente a un analito de interés en una muestra y distinguirlo de analitos no diana. Es específico, en el sentido de que se puede utilizar para detectar analitos por encima del ruido de fondo ("unión no específica"). El ligando de afinidad puede seleccionarse de modo que tenga una mayor afinidad por el analito de interés que otros componentes en la muestra, permitiendo descartar a cualesquiera proteínas de unión nativas para el analito.

40 Los ligandos de afinidad se pueden asociar con la partícula de captura de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se pueden utilizar como un núcleo alrededor del cual el material de tamiz se recubre o deposita/nuclea con el fin de formar la partícula de captura; se pueden incorporar directamente en el material de tamiz antes de formar la partícula (es decir, en los casos en los que el ligando es un componente del material de tamiz); se pueden acoplar convencionalmente (de forma covalente o no covalente) a las superficies de los poros del material de tamiz; etc. Los ligandos de afinidad también se pueden cargar en la partícula de captura expandiendo el material de tamiz a través de un tratamiento físico o químico apropiado para alcanzar una porosidad que es lo suficientemente grande como para admitir al ligando, y luego poner en contacto el material de tamiz con el ligando bajo condiciones eficaces para que penetre en la partícula. Una vez que la partícula se ha cargado con el ligando de afinidad, se puede encoger mediante tratamiento físico o químico apropiado, reduciendo con ello la porosidad del material de tamiz, de modo que analitos diana siguen siendo capaces de penetrar en la partícula, pero se excluyen analitos mayores. La porosidad del tamiz se puede reducir después de la etapa de carga del ligando de afinidad a un tamaño de poros que sea lo suficientemente pequeño para impedir que el ligando de afinidad se separe por difusión haciendo innecesario enlazar el ligando de afinidad al material de tamiz. Sin embargo, si se desea, se pueden utilizar procesos de acoplamiento para enlazarlo al material de tamiz.

Partículas de captura cebadas con ligandos de afinidad proporcionan una etapa de selección del analito, además de la selección por el tamaño o masa del analito. Por ejemplo, una partícula de captura se puede expandir para permitir que el analito penetre en ella, y luego los analitos se pueden seleccionar adicionalmente en cuanto a su capacidad

para unirse específicamente a un ligando de afinidad asociado con la partícula de captura. Después de haber conseguido la etapa de unión (p. ej. después de haber alcanzado el equilibrio), las partículas se pueden separar y someter a etapas de lavado para separar analitos no diana no ligados y luego se pueden encoger opcionalmente mediante un tratamiento químico o físico.

- 5 Las partículas de captura también pueden comprender, además, anticuerpos en calidad de una porción de afinidad. Otras porciones de afinidad candidatas incluyen, pero no se limitan a receptores solubles, análogos de poliamina, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos de ARNi, ribozimas, y similares. Anticuerpos y receptores solubles son de particular interés como porciones de afinidad en los casos en los que fijan como objetivo analitos de interés.

Anticuerpos

- 10 Porciones de afinidad incluyen anticuerpos y equivalentes funcionales de los mismos que se unen específicamente a analitos. "Inmunoglobulina" y "anticuerpo" se utilizan de forma indistinta y su sentido más amplio en esta memoria. Así, abarcan anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej. anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.
- 15 Los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo reconocen o se unen a un epítipo particular de un antígeno semejante. El término "epítipo" se utiliza para aludir a los sitios de unión específicos o el determinante antigénico en un antígeno al que se une el extremo variable de la inmunoglobulina. Los epítopos pueden ser lineales, es decir, pueden estar compuestos de una secuencia de residuos aminoácidos, conformacionales, de modo que una inmunoglobulina reconoce una estructura tridimensional, o una combinación de ambos.
- 20

Anticuerpos Monoclonales y Policlonales

Inmunoglobulinas de la invención pueden ser policlonales o monoclonales y pueden producirse por cualquiera de los métodos bien conocidos en esta técnica.

- 25 Anticuerpos policlonales se consiguen preferiblemente en animales mediante inyección subcutánea (sc), intraperitoneal (ip) o intramuscular (im) múltiple del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar. Además, adecuadamente se utilizan agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

- 30 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos. Anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además de ello, en contraposición a preparados de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada uno de los anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en el antígeno.

- 35 Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos debido a que se pueden sintetizar mientras no estén contaminados por otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales se pueden producir por el método del hibridoma o por métodos de ADN recombinante. Anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bancos de anticuerpos de fagos.

Fragmentos de Anticuerpos

- 40 "Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')², Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

- 45 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En la técnica se conocen bien dos metodologías de digestión que incluyen la digestión con papaína y el tratamiento con pepsina. Fragmentos de anticuerpos se pueden ahora producir adicionalmente de forma directa mediante células hospedantes recombinantes.

Anticuerpos Biespecíficos

5 Anticuerpos biespecíficos de la invención son pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos. Cada uno de los fragmentos comprende un dominio variable de cadena pesada conectado a un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica. Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígenos.

Métodos para producir anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulinas, en que las dos cadenas tienen diferentes especificidades. Sin embargo, anticuerpos biespecíficos también se pueden producir utilizando cremalleras de leucina.

10 Las partículas de captura también pueden comprender, adicionalmente, marcadores detectables. Por la expresión "marcador detectable!" se quiere dar a entender cualquier resto o sustancia que pueda ser detectado por cualquier medio. Estos incluyen puntos cuánticos, marcadores fluorescentes, enzimas, partículas magnéticas, etc. El marcador detectable puede estar asociado con cualquier región de la partícula de captura, incluidos sus poros y superficie exterior. Marcadores detectables son útiles en un cierto número de modos, incluido para clasificar diferentes clases de partículas de captura. Por ejemplo, se pueden producir diferentes clases de partículas de captura, en que cada una de las clases posee una característica diferente (p. ej. un tamaño de poros diferente y/o un ligando de afinidad diferente), y cada una porta un marcador detectable diferente asociado con cada una de las clases de partículas. Esto permite que se identifique la propiedad de la clase de partícula (p. ej. capacidad de unirse a un antígeno específico) determinando qué marcador detectable porta. Por ejemplo, una partícula con un anticuerpo de una sola cadena para PSA se puede marcar con FITC, y una partícula que contiene un anticuerpo para {alfa}-metilacil-CoA racemasa (AMACR) se puede marcar con TRITC. Después de realizar la etapa de captura, las partículas pueden clasificarse mediante citometría de flujo utilizando la clasificación por celda activada por fluorescencia, separando las partículas con contenido en HA de las partículas con contenido en AMACR.

Métodos de Purificación

25 Las partículas de captura de la presente invención se pueden utilizar en protocolos de purificación para aislar analitos de interés a partir de muestras. Tal como se describe arriba, las partículas de captura permiten la purificación de analitos en base al tamaño y la afinidad, y esta invención permite un aislamiento rápido de los analitos de interés a partir de muestras con el fin de preservar y estudiar a los analitos de interés. Estos analitos están preservados en las partículas de captura con el fin de evitar la degradación a partir de enzimas o de otras moléculas en la muestra.

Métodos de Diagnóstico

35 La presente invención incluye también un método para diagnosticar una enfermedad, poniendo en contacto una muestra que comprende analitos con partículas de captura en fase de disolución bajo condiciones eficaces para que las partículas de captura unan de manera selectiva analitos de una masa molecular definida, tamaño de partícula o afinidad definida y luego identificar los analitos selectivamente unidos a las partículas de captura. La presencia de analitos en la muestra a las concentraciones identificadas sería característica de un estado patológico. La detección de la presencia de un analito podría realizarse utilizando métodos bien conocidos por un experto en la técnica tal como análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA), espectrometría de masas, radioinmunoensayo (RIA), métodos de micromatrices, inmunofluorescencia, borrones Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ*.

Kits

45 En kits, las partículas de captura se pueden proporcionar en una forma adecuada para ser utilizadas en métodos de purificación o diagnóstico. Los kits proporcionan generalmente las partículas de captura así como reactivos, instrucciones y los productos necesarios para realizar el método de purificación o diagnóstico. Estos kits están previstos para ser utilizados por parte de doctores en un ámbito médico para almacenar muestras o por parte de otros para comenzar con la purificación y el aislamiento de analitos en el suero.

Las partículas de captura pueden comprender una porción de tamiz molecular y una porción de unión al analito, en donde la porción de tamiz molecular, la porción de unión al analito o ambas comprenden, además, una región reticulada con una porosidad modificada.

50 Las partículas de captura pueden comprender una porción de tamiz molecular y una porción de unión al analito, en donde la porción de tamiz molecular, la porción de unión al analito o ambas comprenden dimensiones de los poros suficientes para excluir moléculas mayores que aproximadamente 60 kDa.

5 La porción de unión al analito puede comprender al menos un tipo de resto capaz de unirse química o electrostáticamente o de secuestrar un analito. Por consiguiente, el analito queda retenido eficazmente en una región dentro de la partícula de captura. Fuerzas entre el analito y la región de unión al analito pueden ser la de unión covalente, fuerzas de Van der Waals, atracción hidrófoba-hidrófoba, unión por hidrógenos, atracción hidrófila, atracción iónica o cualquier combinación de las mismas.

Las partículas de captura pueden comprender tamaños de poros entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 nanómetros con todos los valores individuales entremedias.

Las partículas de captura pueden comprender tamaños de poros menores que aproximadamente 100 nm, incluidos todos los valores individuales dentro de este intervalo.

10 La partícula de captura puede comprender tamaños de poros dimensionados para excluir moléculas con tamaños mayores que aproximadamente 60 kDa.

La partícula de captura puede comprender tamaños de poros dimensionados para excluir a la albúmina.

15 La partícula de captura puede comprender tamaños de poros lo suficientemente grandes para permitir el paso de moléculas de un tamaño de 1404 Da, al tiempo que excluye albúmina, moléculas con tamaños mayores que aproximadamente 60 kDa o ambos.

Determinadas realizaciones de la invención se recogen en los ejemplos no limitantes que figuran más abajo. Resultará evidente para un experto en la técnica que existen otras realizaciones no explícitamente recogidas en esta memoria descriptiva.

20 Los ejemplos descritos en esta memoria son ilustrativos de la presente invención y no pretenden ser limitaciones de la misma. Se han descrito diferentes realizaciones de la presente invención de acuerdo con la presente invención. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones a las técnicas descritas e ilustradas en esta memoria. Por consiguiente, debe entenderse que los ejemplos son sólo ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención

Ejemplos

Ejemplo 1 – Partículas de captura que incorporan N-isopropilacrilamida (NIPAm)

25 Se crearon partículas de captura que incorporan N-isopropilacrilamida (NIPAm) y N,N-metilenbisacrilamida (BIS) mediante polimerización por precipitación exenta de tensioactivo. En calidad del reticulante se utilizó BIS, y la relación de monómeros BIS:NIPAm determinó la densidad de red resultante y, así, el tamaño de poros medio. Además, se fabricó un preparado de partículas que contenía ácido acrílico (AAc) con el fin de incorporar un cebo de afinidad basado en la carga en las partículas. N-isopropilacrilamina (NIPAm), N,N'-metilenbisacrilamida (BIS), persulfato de amonio (APS), ácido acrílico (AAc) se adquirieron de Sigma-Aldrich de St. Louis, MO. El agua para las reacciones, el lavado y la carga será purificada con un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore a una resistencia de 18 M Ω y se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 μ m.

35 La concentración total de monómeros (NIPAm y BIS) era 0,3 M. Se prepararon partículas utilizando diversas cantidades de reticulante durante la polimerización, incluida una concentración total de 2% y 5% de agente reticulante con el fin de variar los tamaños de poros de las partículas. Los monómeros se disolvieron por completo en 190 mL de agua dentro de un matraz de tres bocas de 250 mL y de fondo redondo, equipado con un condensador y un termómetro a una velocidad de agitación media (agitador magnético). La disolución se calentó hasta 70°C a lo largo de período de 1 hora bajo una corriente de nitrógeno. Cuando se alcanzó una velocidad de agitación máxima estable, se inició la polimerización con 1,0 mL de una disolución de APS 6 mM. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 3 horas bajo nitrógeno. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente durante una noche, partes alícuotas de 0,5 mL de la disolución de microgel se dispusieron en tubos de centrifuga individuales de una capacidad de 1,5 mL y se diluyeron con 1,0 mL de agua. Después, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 23°C y 16.100 rpm con una centrifuga Eppendorf 541 SR. El sobrenadante se decantó y los microgeles se redispersaron en agua, de nuevo hasta un volumen de 1,5 mL. Este proceso se repitió durante un total de cinco etapas de concentración/redispersión. La uniformidad del intervalo de tamaños se evaluó utilizando la espectroscopía de correlación de fotones (analyzer de partículas inferiores a la micra PCS, Beckman Coulter), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía óptica, así como la absorción de colorantes fluorescentes con visualización mediante microscopía de fluorescencia. La citometría de flujo permitió también asignar un tamaño relativo mediante el uso de partículas dimensionantes marcadas de modo fluorescente y comercialmente disponibles como patrones.

50 Con el fin de investigar las propiedades de exclusión molecular de las partículas, partículas fabricadas utilizando una concentración de reticulantes del 2%, se incubaron con cinco especies moleculares: FITC (PM 389), fluoresceína enlazada a un péptido pequeño angiotensina II (PM 1404), FITC enlazada a insulina (PM 3500), a estreptavidina (PM 53.000) y a albúmina (PM 66.000). Se realizó la separación en disolución de cinco tipos de moléculas. Para cada una

de las cinco moléculas fluorescentes, 0,1 mL de microgeles purificados se dispusieron en un tubo de centrifuga de 1,5 mL. A esto se añadieron 0,1 mL de disolución de moléculas y se mezcló suavemente en un vórtice. La absorción de fluorescencia por parte de las partículas se midió utilizando un dispositivo FACScan (Becton Dickinson). Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos de incubación y a diferentes concentraciones de moléculas fluorescentes. Estos experimentos indicaban que pequeñas moléculas de FITC, migraban fácilmente a las partículas, en tan poco tiempo como 10 minutos, y que la respuesta es dependiente de la dosis. El péptido marcado con fluoresceína también migraba a la partícula, pero con un desplazamiento de señal menos intenso cuando se compara con FITC, indicando que las partículas tienen una selectividad mediada por el tamaño. Para los dos, péptido marcado con FITC y péptido marcado con fluoresceína, el nivel de internalización era mayor en la población de partículas de reticulante del 2% que en la población de reticulante del 5%. Esto es consistente con un tamaño de nanoporos menor dentro de la población de partículas más altamente reticuladas, que haría más difícil la internalización del péptido. Tanto en la población del 2% como en la del 5% se excluyó albúmina. Estreptavidina y BSA se excluyeron de las partículas, ya que no hubo desplazamiento en la señal de fluorescencia. Insulina marcada con FITC se investigó tanto en forma de una disolución acuosa como esparcida en suero humano. Partículas incubadas con suero tenían un desplazamiento en la señal fluorescente que demostró que la insulina se recogía de una disolución biológica compleja. Partículas incubadas con una disolución acuosa de insulina marcada con FITC proporcionaban un desplazamiento fluorescente más intenso cuando se comparaba con el suero.

Se llevaron a cabo experimentos de SDS-PAGE en partículas con una concentración de reticulante del 2% y absorción demostrada de insulina (PM 3.500) y mioglobina (PM 17.000), exclusión de BSA (PM 66.000). Partículas funcionalizadas con ácido acrílico se incubaron con una disolución 20 mM de mioglobina y capturaron toda la proteína en disolución, dando un rendimiento de absorción más elevado cuando se compara con partículas planas.

Ejemplo 2 – Electro-Transporte de las partículas

Partículas incubadas en suero con reticulante al 2% se cargaron en un tubo de muestra de centrífuga microelectroluter (Millipore) en que se había previamente polimerizado una rodaja de gel de acrilamida/bis al 30%, de 5 mm de longitud. Cuando se creó un campo eléctrico, las partículas migraron hacia el electrodo positivo a través de la rodaja de gel sin perder su contenido en proteínas.

Ejemplo 3 – Partículas de Hidrogel

La capacidad de partículas de hidrogel de trabajar directamente, en una etapa y en disolución, el reparto, la separación por afinidad, concentración y estabilización de proteínas de bajo peso molecular en el suero se analizó como un nuevo método rápido para el aislamiento y análisis de biomarcadores derivados de la sangre. Los hidrogeles, por definición, son redes poliméricas reticuladas tridimensionales que pueden inhibir grandes cantidades de agua (Pelton, R. *Adv Colloid Interface Sci* **2000**, 85, (1), 1-33). Habitualmente, se forman a través de polimerización de monómeros en presencia de un agente reticulante que es típicamente un monómero con al menos dos restos funcionales polimerizables. Los geles se pueden categorizar como geles no receptivos (simples redes poliméricas que se expanden drásticamente tras exposición al agua) o geles receptivos (que tienen una funcionalidad añadida y que exhiben cambios en la solvatación en respuesta a determinados estímulos tales como temperatura (Li y Tanaka, *The Journal of Chemical Physics* **1990**, 92, (2), 1365-1371), pH (Jones y Lyon, *Macromolecules* **2000**, 33, (22), 8301-8306; Moselhy et al., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, 11, (2), 123-147), resistencia iónica (Duracher et al., *Colloid & Polymer Science* **1998**, 276, (3), 219-231; Duracher et al., *Colloid & Polymer Science* **1998**, 276, (10), 920-929), luz (Sershen et al., *Temperature-sensitive polymer nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery*, In 2000; Vol. 51, págs.. 293-298; Suzuki y Tanaka, *Nature* **1990**, 346, (6282), 345-347) y campo eléctrico (Tanaka et al., *Science* **1982**, 218, 467-9).

Poli(N-alquil-acrilamidas) se han estudiado ampliamente con respecto a su capacidad de termorreceptiva (Pelton, R. *Adv Colloid Interface Sci* **2000**, 85, (1), 1-33; Inomata et al., *Macromolecules*, **1990**, 23, 4887-8), siendo poli(N-isopropilacrilamida) (NIPAm) uno de los hidrogeles sensibles a la temperatura más intensamente explorado dentro de este grupo. Partículas con contenido en NIPAm son altamente atractivas debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas, debido a su estabilidad, uniformidad y versatilidad con respecto a la facilidad de producir modificaciones físico-químicas en las partículas. Partículas de NIPAm han sido investigadas en cuanto a la liberación lenta y liberación dirigida de suministro de fármacos, en cuanto a la desorción de soluto (Kawaguchi et al., *Colloid & Polymer Science* **1992**, 270, (1), 53-57; Achiha et al., *Polym. Adv. Technol*, **1995**, 6, (7), 534-540; Delair et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, 153, (1-3), 341-353; Mattiasson et al., *Nat Protocols* **2007**, 2, (1), 213-220; Sparnacci et al., *J. Biomater Sci Polym Ed* **2005**, 16, (12), 1557-74; Haruyuki Hiratani, *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, (8), 728-733; Nahar et al., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **2006**, 23, (4), 259-318; Wu et al., *Journal of Controlled Release* **2005**, 102, (2), 361-372; Zhang et al., *Biomaterials* **2005**, 25, (16), 3299-309; Woo et al., *Pharm Res* **2001**, 18, (11), 1600-6; Basinska, *Macromol Biosci* **2005**, 5, (12), 1145-68), interacción con células (Achiha et al., *Polym. Adv. Technol*, **1995**, 6, (7), 534-540) y acoplamiento con oligodesoxirribonucleótidos (OND) como una fase sólida para la hibridación (Delair et al., *Colloids and Surfaces A:*

Physicochemical and Engineering Aspects **1999**, 153, (1-3), 341-353). Dado que el tamaño y la porosidad pueden controlarse mediante la temperatura, el uso de tratamiento a temperatura para controlar la absorción y liberación de productos químicos ha sido una de las aplicaciones más ampliamente caracterizadas de partículas de NIPAm como vectores para el suministro controlado de fármacos (Sparnacci et al., *J Biomater Sci Polym Ed* **2005**, 16, (12), 1557-74; Haruyuki Hiratani, *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, (8), 728-733; Nahar et al., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **2006**, 23, (4), 259-318); Wu et al., *Journal of Controlled Release* **2005**, 102, (2), 361-372; Zhang et al., *Biomaterials* **2005**, 26, (16), 3299-309); Woo et al., *Pharm Res* **2001**, 18, (11), 1600-6; Basiniska, *Macromol Biosci* **2005**, 5, (12), 1145-68).

En el presente estudio se han desarrollado partículas de hidrogel que contienen un cebo de afinidad y una porosidad definida, y demostraron que a) de forma rápida y en una etapa secuestran a la fracción de bajo peso molecular de las proteínas, péptidos y metabolitos del suero, b) separan y concentran las moléculas diana de la disolución y c) protegen proteínas capturadas frente a una degradación enzimática.

Se han elegido partículas basadas en NIPAm debido a su elevado contenido en agua, amplio intervalo de porosidades sintonizables, consistencia y uniformidad después de la síntesis, reconstitución funcional después de la liofilización y biocompatibilidad potencial. Al modificar el porcentaje de agente reticulante y temperatura, es posible controlar el tamaño y la porosidad eficaz de las partículas. Una ventaja significativa para la aplicación estudiada en este caso es la capacidad de que estas partículas absorban rápidamente moléculas debido a su estructura abierta, elevado contenido en agua, restos químicos hidrófobos e hidrófilos duales que pueden ser sustituidos en el polímero y gran superficie específica. Este es un requisito crítico para el objetivo de recolectar rápidamente proteínas pequeñas lábiles en disolución y proteger a las proteínas frente a la degradación. El tamaño pequeño, la uniformidad de la dimensión de las partículas y la reproducibilidad de una tanda a otra de NIPAm proporcionan ventajas especiales para aplicaciones en la citometría de flujo.

Ejemplo 4 – Síntesis y Caracterización de las Partículas de Hidrogel

Partículas de gel que incorporan N-isopropilacrilamida (NIPAm) se crearon y evaluaron en cuanto a sus propiedades de tamizado molecular. Se fabricó una segunda clase de partículas que contenían tanto NIPAm como ácido acrílico (AAc), NIPAm/AAc, para incorporar un cebo de afinidad basado en la carga en las partículas tal como se muestra en la Figura 1 (Pelton, *Adv Colloid Interface Sci* **2000**, 85, (1), 1-33; Jones y Lyon, *Macromolecules* **2000**, 33, (22), 8301-8306; Saunders y Vincent, *Advances in Colloid and Interface Science* **1999**, 80, (1), 1-25).

Para obtener partículas de N-isopropilacrilamida (NIPAm), NIPAm (1,4 g) y BIS (0,04 g) se disolvieron en 150 ml de agua y luego se filtraron dos veces a través de un filtro de membrana (Pall Gelman Metricel). La disolución se desgasificó bajo vacío durante al menos 20 minutos. Después, SDS (0,057 g) se disolvió en la disolución monómera que se filtró de nuevo. Durante la filtración, se utilizaron 40 ml de agua para la transferencia y el lavado. La disolución se colocó en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 250 ml, equipado con un condensador y un termómetro a una velocidad de agitación media (agitador magnético Coning). La disolución se calentó hasta 70°C durante 1 hora bajo una atmósfera de nitrógeno. Se alcanzó una velocidad de agitación máxima estable y la polimerización se inició a través de adición de APS (0,069 g) disuelto en 10 ml de agua desgasificada. Se dejó que la reacción prosiguiera a una temperatura de 70°C durante 6 horas bajo nitrógeno. Se fabricaron partículas de NIPAm/ácido acrílico (AAc) utilizando la misma condición de reacción que las partículas de NIPAm anteriores. La disolución inicial de monómeros se obtuvo disolviendo NIPAm (1,3 g), BIS (0,10 g) y AAc (0,072 g) en 150 ml de agua. Todas las partículas se purificaron a través de diálisis (membranas de diálisis Spectra/Por 7, MWCO 10.000, VWR) frente a cambios frecuentes de agua agitada durante 2 semanas a 4°C.

Ejemplo 5 – Dependencia del Tamaño de las Partículas sobre la Temperatura y el pH

La dependencia del tamaño de las partículas sobre la temperatura y el pH se determinó a través de espectroscopía de correlación fotónica (PCS, analizador del tamaño de partículas inferiores a la micra, Beckman Coulter). Los valores medios se calcularon para 3 mediciones utilizando un tiempo de integración de 200 segundos, y se dejó que las disoluciones se equilibraran térmicamente durante 10 minutos antes de cada conjunto de mediciones. Los valores medidos se convirtieron luego en tamaños de partículas a través de la relación de Stokes-Einstein (Pecora, *Dynamic Light Scattering: Applications of Photo Correlation Spectroscopy*. Springer: 1985, pág. 436). El tamaño de las partículas de NIPAm disminuyó con la temperatura creciente (Figura 2A), que es una característica distintiva de los hidrogeles termorreceptivos (Sparnacci et al., *J. Biomater Sci Polym Ed* **2005**, 16, (12), 1557-74; Haruyuki Hiratani, *Macromolecular Bioscience* **2005**, 5, (8), 728-733; Nahar et al., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **2006**, 23, (4), 259-318; Wu et al., *Journal of Controlled Release* **2005**, 102, (2), 361-372; Zhang et al., *Biomaterials* **2005**, 26, (16), 3299-309; Woo et al., *Pharm Res* **2001**, 18, (11), 1600-6). Las partículas de NIPAm/AAc mostraron una dependencia similar de la temperatura con respecto al tamaño de partícula, pero también demostraron un comportamiento dependiente del pH (Figura 2B). A pH bajo (3,5), los grupos AAc se protonaron y la dependencia del tamaño de partículas de NIPAm/AAc de la temperatura es similar a partículas no derivatizadas. A un pH más alto (4,5 y 6,5), los

grupos AAC se desprotonan parcialmente y aumenta el tamaño medio de partículas, posiblemente debido a una interacción de Coulomb entre la cadena polimérica y la presión osmótica que resulta del ingreso de iones antagonistas en las partículas (Fernandez-Nieves et al., *Macromolecules* **2000**, 33, 2114-2118; Ito et al., *Langmuir* **1999**, 15, (12), 4289-4294).

- 5 Las partículas se caracterizaron adicionalmente mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando un sistema NSCRIPTOR™ DPN® (Nanolink). Las imágenes se adquirieron bajo un modo AC utilizando una punta de silicio con una frecuencia de resonancia típica de 300 kHz y un radio menor que 10 nm. Partes alícuotas de partículas al 1% p/v (50 µL) se depositaron sobre mica recientemente escindida; las muestras se incubaron durante diez minutos en una atmósfera húmeda a la temperatura ambiente para permitir la deposición y luego se secaron bajo un flujo de nitrógeno. Imágenes por AFM de estas partículas (Figuras 2C y 2D) demuestran que son de un tamaño homogéneo y con diámetros de partículas consistentes con los medidos con la dispersión de la luz.

Ejemplo 6 – Tamizado Molecular por parte de Partículas de Hidrogel

- 15 Partículas de NIPAm se sometieron a ensayo en cuanto a su comportamiento en el tamiz molecular en disolución tal como se representa esquemáticamente en la Figura 3; siendo el objetivo crear partículas que pudieran capturar proteínas y pequeñas moléculas con pesos moleculares menores que 20.000 Da, ya que se piensa que el peptidoma contiene una fuente rica de biomarcadores (Tirumalai et al., *Molecular & cellular proteomics* **2003**, 2, (10), 1096-103; Merrell et al., *Journal of biomolecular techniques* **2004**, 15, (4), 238-48; Orvisky et al., *Proteomics* **2006**, 6, (9), 2895-902).

- 20 Este intervalo de tamaños contiene proteínas informativas, péptidos y metabolitos que son difíciles, si no imposibles, de separar de mezclas de proteínas complejas (tales como suero o plasma) con un rendimiento adecuado utilizando la electroforesis en gel en 2D o la cromatografía en columna. El grado de reticulación dentro de la partícula permitía la exclusión de albúmina y otras moléculas de alta abundancia, al tiempo que capturaba moléculas con tamaños menores que el tamaño de poros de corte de las partículas. Se investigaron partículas con varios grados de reticulación hasta que se identificó una que demostraba un tamaño de poros exclusivo de 20.000 Da eficaz. Estas partículas se estudiaron adicionalmente con el fin de evaluar su eficacia de tamizado y la unión no específica de moléculas excluidas a la superficie de las partículas. Dado que albúmina de suero está presente en un gran exceso (106-109 veces) con relación a las proteínas y péptidos de interés, fue necesario examinar la eficacia y la compleción de la exclusión de albúmina.

- 30 Se utilizaron dos métodos independientes para medir el comportamiento de tamizado: citometría de flujo y electroforesis en gel. Partes alícuotas de partículas de NIPAm (50 µL, 10 mg/mL) se incubaron con especies moleculares diana y se centrifugaron para recoger las partículas (7 minutos, 25°C, 16.100 rpm). El sobrenadante se separó y las partículas se re-suspendieron en 1 mL de agua. La centrifugación y el lavado se repitieron tres veces, y la intensidad fluorescente de las partículas se midió utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La señal fluorescente de fondo de partículas no tratadas en agua se utilizó como una referencia para todas las mediciones. Se utilizó isotiocianato de fluoresceína (FITC, PM 389 Da) como modelo para estudiar la absorción de moléculas pequeñas y la dependencia de la absorción del tiempo de incubación y de la concentración. Partículas incubadas con diversas concentraciones de FITC (5 µM, 20 µM y 100 µM) mostraron una tasa de absorción dependiente de la dosis (Figura 4A) en dirección a la saturación. Estudios del curso temporal demostraron que la absorción de FITC podía aparecer rápidamente (5 minutos, Figura 4B) a una concentración de partículas de 10% v/v.

- 40 Tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B, partículas incubadas con FITC-BSA (PM 66.000 Da) no tienen desplazamiento detectable alguno en la señal de fluorescencia con relación a la fluorescencia de fondo de las partículas, lo que indica ninguna absorción detectable de BSA o ninguna unión específica por parte de las partículas. Por otra parte, la incubación con FITC-insulina (PM 3.500 Da) resulta en un desplazamiento hacia la derecha en la fluorescencia con relación al testigo, confirmando la absorción de insulina por parte de las partículas. FITC solo (PM 389 Da), una molécula en un intervalo de tamaños de muchos metabolitos, y FITC-mioglobina (PM 17.000 Da), otra proteína por debajo del corte por tamaño eficaz de las partículas, fueron ambos rápidamente capturados.

Estos hallazgos fueron confirmados mediante análisis SDS-PAGE. Las partículas se cargaron directamente sobre el gel después de la incubación con disolución de proteínas y lavado. Insulina (Figura 5C) y mioglobina (Figura 5D) fueron atrapadas por las partículas, mientras que BSA quedó totalmente excluido (Figura 5D).

- 50 Ejemplo 7 – La Incorporación de un Cebo Cargado en las Partículas de Tamizado Molecular Potencia Significativamente la Absorción

- Un tamizado molecular pasivo no puede recoger y concentrar eficazmente la totalidad de las proteínas diana en disolución, debido a que la concentración de la proteína diana capturada en las partículas depende del equilibrio entre las tasas de proteínas que salen y entran en las partículas y la concentración de la proteína diana en la disolución a granel. Por consiguiente, se construyeron partículas que incorporaban un cebo de afinidad para facilitar

la recogida de proteínas diana y prevenir que las proteínas capturadas saliesen de la partícula.

Se seleccionó un resto cargado negativamente como un cebo para proteínas y moléculas que tienen una carga neta positiva. La incorporación de un cebo negativamente cargado dentro de las partículas permitiría que éstas secuestraran y concentraran preferentemente proteínas positivamente cargadas, péptidos y otras biomoléculas. Por lo tanto, se prepararon partículas basadas en un copolímero de NIPAm/AAC que porta una gran carga negativa neta a valores de pH mayores que 3,5. Tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 6, la presencia de cebo cargado, en principio debería potenciar sustancialmente el K_{eq} y, con ello, conseguir una concentración significativamente mayor de la proteína diana dentro de la partícula en comparación con la disolución fuera de la partícula.

Tal como se muestra en la Figura 7A, partículas de NIPAm/AAC concentraban analitos a partir de disolución con una eficacia sustancialmente mayor con relación a partículas de NIPAm no derivatizadas. Suspensiones de NIPAm y partículas de NIPAm/AAC (10 mg/mL) se incubaron durante 1 hora con mioglobina (PM 17.000 Da, 20 μ M en agua). Después de la incubación con partículas de NIPAm, quedaban en la disolución a granel niveles importantes de mioglobina con alguna proteína unida por las partículas, que carecen del cebo de afinidad aniónico (Figura 7A). Después de la incubación con partículas de NIPAm/AAC, que contienen el cebo de afinidad aniónico, toda la mioglobina había sido capturada por parte de las partículas de NIPAm/AAC sin ninguna mioglobina detectable remanente en la disolución a granel. La correlación de la intensidad de banda de mioglobina para diluciones en serie de partículas de NIPAm/AAC con la de partículas de NIPAm sugiere que partículas de NIPAm/AAC secuestraban mioglobina con una eficacia más de 128 veces mayor en comparación con partículas que carecían del cebo de afinidad.

Con el fin de demostrar que la superior absorción de proteínas asociada con partículas de NIPAm/AAC era impulsada por la carga, partes alícuotas de una disolución que contenía mioglobina (20 μ M) y BSA (20 μ M) se incubaron con partículas de NIPAm/AAC en tampón fosfato titulado a pH 5,5 o pH 8 (Figura 7B). Las partículas se separaron mediante centrifugación y se lavaron tres veces con agua MilliQ. A pH 5,5, es de esperar que mioglobina (pI 7) esté cargada positivamente y que sean atractivas interacciones electrostáticas entre la proteína y los grupos carboxilo negativamente cargados de partículas de NIPAm/AAC. Sin embargo, a pH 8, la mioglobina estaría cargada negativamente y cualquier interacción electrostática con las partículas aniónicas sería posiblemente repulsiva por naturaleza. De manera consistente con estas expectativas, la mioglobina se secuestró eficazmente por parte de partículas de NIPAm/AAC a pH 5,5 en que la proteína y las partículas tienen cargas netas opuestas y no se podía detectar mioglobina alguna en partículas que habían sido incubadas con mioglobina a pH 8 (Figura 7B).

En la Figura 8A se ilustra la eficacia de partículas cebadas por afinidad de NIPAm/AAC de unirse y concentrar proteínas y péptidos con un PM menor que aprox. 20.000 Da. Partículas de NIPAm/AAC y NIPAm se incubaron cada una durante 1 hora con lisozima (20 μ M) y BSA (20 μ M) en Tris (pH 7, 50 mM). Las partículas se lavaron luego con tres volúmenes de 1 mL de agua y las proteínas capturadas se electro-eluyeron sobre un gel de SDS-poliacrilamida.

Aunque las partículas de NIPAm/AAC parecían haber capturado la totalidad de la lisozima presente en la disolución, no había indicio de que BSA hubiese sido unida de manera no específica por parte de las partículas. Tal como se observó con mioglobina, partículas de NIPAm que carecen del cebo de afinidad no parecían concentrar lisozima de manera significativa.

Se utilizó una disolución de marcadores del peso molecular de proteínas para evaluar adicionalmente el corte del peso molecular (MWCO – siglas en inglés) de las proteínas secuestradas por las partículas (Figura 8B). La disolución consistía en 0,5 mg/mL de cada una de las siguientes proteínas: aprotinina (PM 6.500 Da, Sigma-Aldrich), lisozima (PM 14.400 Da, Sigma-Aldrich), inhibidor de tripsina (PM 21.500 Da, Invitrogen), anhidrasa carbónica (PM 31.000 Da, Sigma-Aldrich), ovoalbúmina (PM 45.000 Da, Sigma-Aldrich) y BSA (PM 66.000 Da, Fisher Scientific) disueltas en Tris (pH 7, 50 mM). Se encontró que partículas cebadas con NIPAm/AAC, incubadas con la disolución de proteínas, capturaban y concentraban eficazmente todas las moléculas de proteínas con un PM menor que aprox. 21.500 Da y que no unía proteína alguna con un PM mayor que 21.500 Da. Partículas de NIPAm mostraron un MWCO similar con un PM \leq 14.400 Da o menor y que no unían proteínas con un PM \geq 14.400 Da. La resolución del MWCO conseguida con partículas de NIPAm/AAC y NIPAm compara favorablemente o supera la asociada con la cromatografía de tamizado molecular estándar. Con el fin de determinar adicionalmente las propiedades del tamizado molecular de las perlas, partículas de NIPAm/AAC se incubaron con factor de crecimiento derivado de plaquetas B (0,003 mg/mL, 14.500 Da, Cell Signaling) y BSA (0,067 mg/mL) en Tris (100 mM, pH 7) durante una hora. El proceso de lavado era el mismo que el descrito anteriormente. SDS-PAGE en la Figura 9 muestra una absorción completa de PDGF y una exclusión de BSA. PDGF es un modelo representativo de proteína de bajo peso molecular de baja abundancia presente en la sangre, y la concentración de PDGF-B en sangre es 3,3 ng/mL (Eppley et al., *Pastic and reconstruction surgery* 2004, 114, (6), 1502-842).

Debido al cambio drástico de tamaño que sufren las partículas cuando se altera la temperatura de la disolución, se investigaron los efectos de la temperatura sobre el MWCO. La disolución de marcadores del peso molecular

descritos anteriormente se incubó con partículas de NIPAm/AAC a 25, 37 y 45°C, y la temperatura era un factor que no afectaba al MWCO (datos no mostrados).

Ejemplo 8 – Secuestro a partir de suero

5 Basado en los resultados anteriores, se sometió luego a ensayo la capacidad de las partículas de capturar pequeñas moléculas esparcidas en disoluciones complejas tales como suero para mimetizar experimentos de tipo de descubrimiento y análisis de biomarcadores del mundo real. Partes alícuotas de insulina marcada con FITC (concentración final 40 μ M) en suero diluido a 1:10 se incubaron con partículas de NIPAm y NIPAm/AAC. El análisis por citometría de flujo demostró que partículas de NIPAm incubadas en suero que contenían FITC-insulina proporcionaban un desplazamiento hacia la derecha en la intensidad de fluorescencia con relación a partículas testigo y partículas incubadas con suero solo (Figura 10A).

10 Este resultado demostró claramente la capacidad de partículas de NIPAm de capturar insulina a partir de una matriz compleja tal como suero. Sin embargo, la eficacia de captura de las partículas de NIPAm incubadas con una disolución acuosa simple que sólo contenía insulina era menor que la lograda con partículas de NIPAm incubadas en el suero. Mientras que las dos clases de partículas exhibían una absorción similar de insulina en una disolución acuosa, las partículas con el cebo cargado eran más eficaces para capturar insulina esparcida en suero en comparación con partículas no derivatizadas (Figura 10B).

15 Se realizaron estudios de absorción en cursos temporales para partículas de NIPAm y NIPAm/AAC incubadas con insulina marcada con FITC (pl 5,3) con el fin de confirmar y extender los datos obtenidos para la molécula pequeña, FITC. En la Figura 11 se reseñan histogramas de la intensidad de fluorescencia asociada con análisis de citometría de flujo de partículas de NIPAm y NIPAm/AAC incubadas con insulina marcada con FITC recogidas a diferentes intervalos de tiempo. Estos datos indican que el secuestro se produce rápidamente (5 minutos) y es constante a lo largo del tiempo.

Ejemplo 9 – Curso temporal rápido de la absorción de proteínas diana por parte de partículas con contenido en cebo

25 Con el fin de demostrar que la cinética de absorción de proteínas es muy rápida, se midió la cantidad de proteína que quedaba en disolución a granel después de incubación con partículas de NIPAm/AAC mediante disposiciones de proteínas en fase inversa (RPPA) (Gulmann et al., *The Journal of pathology* **2006**, 208, (5), 595-606). RPPA se eligió como medio para determinar la concentración de proteínas en sobrenadante de partículas, dado que otros métodos tales como los ensayos de Bradford no tienen una sensibilidad suficiente, y el objetivo de los autores de esta invención era demostrar lo completa que era la separación de proteínas a partir de la disolución a granel. Diferentes cantidades de partículas de NIPAm/AAC (1,15 y 11,5 millones) se incubaron con lisozima (20 μ M) en Tris (pH 7, 50 mM) en un volumen total de 100 μ L durante períodos de 1 y 10 minutos. Después de la centrifugación de las partículas, partes alícuotas de sobrenadante se esparcieron sobre un portaobjetos revestido con nitrocelulosa (FAST slide, Whatman) utilizando un dispositivo de impresión (“arrayer”) robótico Aushon 2470 (Aushon Biosystems). Las matrices se tiñeron con una disolución de oro coloidal, AuroDye Forte Kit (Amersham), las imágenes se adquirieron utilizando un escáner PowerLook 1120 (Umax) y los valores numéricos se obtuvieron de imágenes con ImageQuant (GE Healthcare) y se procesaron con SigmaPlot (Systat). La disolución a granel después de un minuto de incubación con 1,15 millones de partículas contenía 28% de la cantidad inicial de proteínas y 15% al cabo de diez minutos. Además de ello, la disolución recuperada de la incubación con 11,5 millones de partículas después de 1 hora y 10 minutos contenía 5% y 9% de la cantidad inicial, respectivamente (Figura 12A). Debe señalarse que dado que en todos los experimentos de curso temporal la separación de partículas a partir de la disolución se obtenía mediante centrifugación, los valores de tiempos reseñados se refieren a intervalos de tiempo de incubación solamente. Más allá de ello, las partículas estaban en contacto con la disolución durante 7 minutos adicionales, requeridos para la centrifugación.

35 La cinética de la absorción de proteínas por parte de partículas de NIPAm/AAC se investigó adicionalmente incubando con BSA (20 μ M) y lisozima (20 μ M) en Tris (pH 7, 50 mM) a la temperatura ambiente y utilizando SDS-PAGE para vigilar la absorción de lisozima en los instantes de 1, 10, 20, 30 y 60 minutos (Figura 12B). Los resultados de este experimento demostraron que el secuestro de lisozima se había casi completado al cabo de 1 minuto y se había completado hacia los 60 minutos, confirmando que el proceso se produce muy rápidamente tal como se indica en el estudio en el curso temporal de citometría de flujo descrito anteriormente. Como era de esperar, BSA quedó excluido por parte de las partículas y nada del BSA fue recogido por las NIPAm/AAC a lo largo de la duración del experimento (60 minutos).

Ejemplo 10 – Demostración de Aislamiento y Enriquecimiento de Analitos de Bajo Peso Molecular y Baja Abundancia a partir del Suero

55 Se evaluó la capacidad de partículas de NIPAm y NIPAm/AAC de secuestrar y concentrar biomarcadores de proteínas candidatos a baja concentración para el análisis proteómico, incubando las partículas con una dilución 1:10

v/v de suero en agua durante 1 hora. Las proteínas atrapadas se eluyeron electroforéticamente a partir de las partículas bajo condiciones desnaturalizantes y luego se digirieron con tripsina. Las partículas se calentaron en tampón de muestra de SDS durante 5 minutos a 100°C y se cargaron sobre un gel Tris-Glicine al 4-20% (Invitrogen). Se cortaron bandas por debajo de 30 kDa y se realizó la digestión con tripsina en gel (Camerini et al., *Proteomics Clin. Appl.* **2007**, 1, 176-184). Los fragmentos de péptidos resultantes se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida/ionización por electroproyección en línea (LC/ESI MS) utilizando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher). La columna de fase inversa se empaquetó en suspensión en la casa con una resina C18 de 5 µm, tamaño de poros de 20 Å (Michrom BioResources, CA) en capilares de sílice fundida de 100 mm d.i. x 10 cm de longitud (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) con una punta estirada por láser. Después de la inyección de la muestra, la columna se lavó durante 5 minutos con una fase móvil A (ácido fórmico al 0,1%) y los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente lineal de fase móvil B al 0% (ácido fórmico al 0,1%, 80% de acetonitrilo) a una fase móvil B al 50% en 50 minutos a razón de 200 nl/min, y luego hasta 100% de B en 5 minutos adicionales. El espectrómetro de masas LTQ se hizo funcionar de un modo dependiente de los datos, en que cada barrido de MS completo fue seguido por cinco barridos de MS/MS, en donde se seleccionaron dinámicamente los cinco iones moleculares más abundantes y se fragmentaron mediante disociación inducida por colisión (CID) utilizando una energía de colisión de 35%. Los datos MS/MS se confrontaron con la base de datos de proteínas humanas de NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el programa SEQUEST (Bioworks Software, Thermo) utilizando restricciones de escisión triptica completas. Se obtuvieron identificaciones de péptidos de elevada confianza aplicando los siguientes filtros para la búsqueda de resultados: puntuación de correlación cruzada (XCorr) >= 1,9 para 1+, 2,2 para 2+, 3,5 para 3+, y una probabilidad máxima para identificación aleatoria de 0,01. La lista de proteínas identificadas en la Tabla 1 y la Tabla 2 demostró que la albúmina y otras proteínas del suero de elevada abundancia no estaban presentes en las partículas. Por otra parte, la lista de proteínas identificada indica que las partículas secuestraban proteínas y péptidos del suero raros y de pequeño tamaño.

Tabla 1

Referencia	Acceso	P (pep)	Sf	Puntuación	PM
componente 1 del complemento, subcomponente q, polipéptido gamma [Homo sapiens]	56786155.0	4,83E-12	3,43E+00	40,28	25757,13
componente 1 del complemento, subcomponente r, [Homo sapiens]	66347875.0	5,65E-12	2,72E+00	30,24	80147,95
proteína relacionada con haptoglobina [Homo sapiens]	45580723.0	1,12E-11	9,76E-01	10,22	39004,70
PREDICHO: similar al pseudogen A11 putativo de la proteína de unión a calcio S 100 [Homo sapiens]	113419208.0	1,12E-11	9,80E-01	10,22	11254,79
preproteína del componente 4A del complemento [Homo sapiens]	67190748.0	1,12E-11	3,58E+00	40,234	192663,60
Precursor del orosomucoide 1 [Homo sapiens]	9257232,0	1,12E-11	8,17E-01	10,13	23496,77
(familia rica en cisteína del receptor de depuración similar a antígeno CD5 [Homo sapiens]	5174411.0	1,12E-11	3,80E+00	40,25	38062,96
precursor del componente P amiloide sérico [Homo sapiens]	4502133.0	1,12E-11	4,15E+00	50,20	25371,13
componente 1 del complemento, subcomponente q, precursor de la cadena B [Homo sapiens]	87298828.0	1,12E-11	9,82E-01	10,26	26704,49
preproteína de la apolipoproteína A-I [Homo sapiens]	4557321.0	1,12E-11	6,86E-01	10,12	25371,13
haptoglobina [Homo sapiens]	4826762.0	1,12E-11	3,70E+00	40,21	45176,59
componente 1 del complemento, subcomponente q, precursor de la cadena A [Homo sapiens]	7705753.0	1,12E-11	8,24E-01	10,15	26000,19
factor de plaquetas 4 (ligando 4 de quimioquina (motivo C-X-C) [Homo sapiens]	4505733.0	1,12E-11	1,80E+00	20,16	10837,89

Referencia	Acceso	P (pep)	Sf	Puntuación	PM
cadena J de la inmunoglobulina [Homo sapiens]	21489959.0	1,12E-11	9,45E-01	10,15	18087,00
precursor de lisozima [Homo sapiens]	4557894.0	1,12E-11	9,03E-01	10,15	16526,29
transtiretina [Homo sapiens]	4507725.0	1,12E-11	6,77E-01	10,13	15877,05
preproteína dermcidina [Homo sapiens]	16751921.0	1,12E-11	8,66E-01	10,13	11276,83
preproteína mesotripsina [Homo sapiens]	21536452.0	1,12E-11	9,37E-01	10,17	26680,18
globina alfa 1 [Homo sapiens]	4504347.0	1,12E-11	9,62E-01	10,16	15247,92
globina beta [Homo sapiens]	4504349.0	1,12E-1	9,36E-01	10,17	15988,29
proteína LOC649897 hipotética [Homo sapiens]	91206438.0	1,12E-11	8,68E-01	10,18	22058,92
componente 1 del complemento, subcomponente s, [Homo sapiens]	41393602.0	1,12E-11	9,25E-01	10,15	76634,85
sustrato de proteína quinasa C y caseína quinasa en neuronas 2 [Homo sapiens]	6005826.0	1,12E-11	8,23E-01	10,15	55870,13
PREDICHO: similar a queratina, citoesqueleto 2 oral tipo II (citoqueratina 2P) (K2P) (CK 2P) [Homo sapiens]	89036176.0	1,12E-1	8,89E-01	10,14	36406,56
factor de plaquetas 4 variante 1 [Homo sapiens]	4505735.0	1,12E-11	8,70E-01	10,19	11545,28
bromodominio que contiene 7 [Homo sapiens]	41350212.0	1,12E-11	8,63E-01	10,18	74092,27
proteína 2 de unión al dominio SH3 [Homo sapiens]	19923155.0	1,12E-1	2,64E-01	10,13	62220,29
dedo de zinc, dominio CCHC que contiene 11 isoformas c [Homo sapiens]	57863250.0	1,12E-11	8,14E-01	10,17	184587,10
preproteína de apolipoproteína A-II [Homo sapiens]	4502149.0	1,12E-1	8,90E-01	10,14	11167,90
ribonucleoproteína D nuclear heterogénea, isoforma d [Homo sapiens]	51477708.0	1,12E-11	6,31E-01	10,18	30653,14
quinasa 4 similar a polo [Homo sapiens]	21361433.0	1,12E-11	6,16E-01	10,13	109016,40
precursor de apolipoproteína L1 isoforma a [Homo sapiens]	21735614.0	1,12E-11	6,63E-01	10,12	43946,95
coronina, proteína de unión a actina, 2A [Homo sapiens]	16554583.0	1,12E-11	9,33E-01	20,14	59697,38

Tabla 1. Análisis por espectroscopia de masas de proteínas electroeluidas a partir de partículas de NIPAm después de incubación durante 1 h con suero en la dilución 1:10 (v/v), P(pep) muestra el valor de probabilidad para el péptido, Sf muestra la puntuación final que indicaba lo bueno que es una confrontación con la proteína, Puntuación muestra un valor que se basa en la probabilidad de que el péptido sea una confrontación aleatoria con los datos espectrales, Acceso muestra un único número de identificación de la proteína para la secuencia

5

Tabla 2

Referencia	Acceso	P (pep)	Sf	Puntuación	PM
componente 1 del complemento, subcomponente q, polipéptido gamma [Homo sapiens]	56786155.0	3,55E-14	1,86E+00	20,30	25757,13
proteína LOC649897 hipotética [Homo sapiens]	91206438.0	3,55E-14	2,90E+00	30,26	22058,92
PREDICHO: similar al pseudogen A11 putativo de la proteína de unión a calcio S 100 [Homo sapiens]	113419208.0	3,55E-14	1,46E+00	20,25	11254,79

Referencia	Acceso	P (pep)	Sf	Puntuación	PM
precursor de la apolipoproteína C-III [Homo sapiens]	4557323.0	3,55E-14	9,79E-01	10,24	10845,50
precursor de la proteína básica pro-plaquetas [Homo sapiens]	4505981.0	3,55E-14	5,61E+00	60,25	13885,42
precursor del componente 3 del complemento [Homo sapiens]	4557385.0	3,55E-14	9,80E-01	10,20	187045,30
polipéptido E de la ribonucleoproteína nuclear pequeña [Homo sapiens]	4507129.0	3,55E-14	9,15E-01	10,19	10796,64
Queratina 2 [Homo sapiens]	47132620.0	3,55E-14	5,75E+00	70,21	65393,19
precursor de albúmina [Homo sapiens]	4502027.0	3,55E-14	9,28E+00	100,22	69321,63
proteína ribosomal L37a [Homo sapiens]	4506643.0	3,55E-14	9,73E-01	10,21	10268,48
preproteína del componente 4A del complemento [Homo sapiens]	67190748.0	3,55E-14	1,91E+00	20,17	192663,60
globina A-gamma [Homo sapiens]	28302131.0	3,55E-14	9,44E-01	10,14	16118,27
factor de plaquetas 4 (ligando 4 de quimioquina (motivo C-X-C) [Homo sapiens]	4505733.0	3,55E-14	3,44E+00	40,18	10837,89
PREDICHO: proteína hipotética [Homo sapiens]	113418327.0	3,55E-14	8,55E-01	10,19	31688,42
familia de histonas H4, miembro J [Homo sapiens]	4504315.0	3,55E-14	1,51E+00	20,13	11360,38
precursor de lisozima [Homo sapiens]	4557894.0	3,55E-14	9,66E-01	10,20	16526,29
preproteína mesotripsina [Homo sapiens]	21536452.0	3,55E-14	8,35E-01	10,12	26680,18
Globina alfa 1 [Homo sapiens]	4504347.0	3,55E-14	9,15E-01	10,14	15247,92
fibrinógeno, polipéptido alfa preproteína isoforma alfa-E [Homo sapiens]	4503689.0	3,55E-14	8,35E-01	10,12	94914,27
proteína LOC55683 hipotética [Homo sapiens]	21361734.0	3,55E-14	6,53E-01	10,12	83244,77
precursor de homólogo de crumbs 1 [Homo sapiens]	41327708.0	3,55E-14	6,87E-01	10,15	154080,40
PREDICHO: similar al receptor de glutamato, ionotrópico, isoforma 1 isoforma I similar a D-aspartato de N-metilo 1A [Homo sapiens]	41146739.0	3,55E-14	6,26E-01	10,15	41686,95
PREDICHO: similar al precursor de defensina I de neutrófilos (HNP-1) (HP-1) (HP1) (defensina, alfa 1) [Homo sapiens]	113419903.0	3,55E-14	7,75E-01	10,12	10194,18
proteína 1, isoforma b asociada a la subunidad reguladora de CDK5 [Homo sapiens]	28872784.0	3,55E-14	9,05E-01	10,12	56187,84
componente 1 del complemento, subcomponente q, precursor de la cadena B [Homo sapiens]	87298828.0	3,55E-14	8,90E-01	10,15	26704,49
proteína inducida mediante interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3 [Homo sapiens]	31542980.0	3,55E-14	9,40E-01	10,22	55949,57
precursor de la isoforma I de lamina A/C [Homo sapiens]	27436946.0	3,55E-14	8,73E-01	10,14	74094,81
dominios similares a C2 dobles, beta [Homo sapiens]	6005997.0	3,55E-14	5,53E-01	10,13	45920,53
desmogleína 4 [Homo sapiens]	29789445.0	3,55E-14	9,06E-01	10,13	113751,30
receptor 1 tipo G de siete pasos de	7656967.0	3,55E-14	1,56E+00	20,14	329276,70

Referencia	Acceso	P (pep)	Sf	Puntuación	PM
cadherina EGF LAG [Homo sapiens]					
procolágeno, tipo III, alfa I [Homo sapiens]	4502951.0	3,55E-14	9,12E-01	10,15	138470,20
ATPasa, subunidad F de V1 transportadora de H ⁺ , lisosomal 14 kD [Homo sapiens]	20357547.0	3,55E-14	8,61E-01	10,16	13361,95

Tabla 2. Análisis por espectroscopia de masas de proteínas electroeluidas a partir de partículas de NIPAm después de incubación durante 1 h con suero en la dilución 1:10 (v/v), P(pep) muestra el valor de probabilidad para el péptido, Sf muestra la puntuación final que indicaba lo bueno que es una confrontación con la proteína, Puntuación muestra un valor que se basa en la probabilidad de que el péptido sea una confrontación aleatoria con los datos espectrales, Acceso muestra un único número de identificación de la proteína para la secuencia

Ejemplo 11 – Secuestro de Proteínas por parte de la Degradación con Proteasa de Bloques de Partículas

Uno de los principales problemas asociados con los fluidos biológicos es el potencial de la degradación de la muestra durante la recogida, transporte, almacenamiento y análisis. Enzimas en cascada de la coagulación, endógenas, enzimas liberadas de células dañadas o enzimas exógenas (procedentes de bacterias contaminantes) pueden contribuir a la degradación de proteínas diagnósticamente importantes, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 13.

La falta de métodos de preservación estandarizados podría resultar en una tendencia a un análisis de alto rendimiento de suero y plasma (Ayache et al., *American journal of clinical pathology* **2006**, 126, (2), 174-84). Mientras que se esperaba que las proteasas con un PM mayor que el MWCO de las partículas (~ 20.000 Da) serían excluidas del espacio interior de las partículas y, con ello, tendrían el acceso denegado a las proteínas capturadas, es más probable que proteasas más pequeñas tales como tripsina (23.800 Da) sean capaces de penetrar en las partículas. Adicionalmente, no se conocía si las proteasas que penetraban en partículas cebadas con carga conservarían su potencia enzimática cuando tanto las proteínas del sustrato como la enzima eran secuestradas por las partículas (Figura 12). Por lo tanto, partículas de NIPAm/AAc se incubaron a 37°C en una disolución de NH₄HCO₃ (100 mM) pH 7, que contenía lisozima (0,5 mg/mL) y tripsina (0,05 mg/mL, Promega). La tripsina se seleccionó para estos estudios en base a su pequeño tamaño y al hecho de que la digestión triptica de lisozima produciría productos de escisión muy característicos. Las condiciones utilizadas en este experimento permitirían que tanto la lisozima como la tripsina penetraran en la partícula. El análisis de las proteínas capturadas mediante SDS-PAGE después de incubación durante 1 hora y durante una noche mostró solamente dos bandas – correspondiendo una a tripsina y la otra a la lisozima de longitud completa, indicando que no se había producido degradación alguna de la proteína (Figura 14A). La incubación de lisozima (0,5 mg/mL) con tripsina (0,05 mg/mL) a 37°C en una disolución NH₄HCO₃ (100 mM) pH 7, en ausencia de partículas de NIPAm/AAc dio como resultado la degradación de la lisozima. El análisis SDS-PAGE de la reacción después de incubación durante 1 hora y durante una noche indicó claramente la presencia de fragmentos de péptidos de bajo peso molecular que demostraban que la lisozima se había proteolizado por parte de tripsina en ausencia de partículas de NIPAm/AAc. Estos resultados indican claramente que el secuestro de pequeñas proteínas por parte de partículas cebadas por afinidad puede ocultar eficazmente proteínas unidas de proteasas que incluyen las que son capaces de penetrar en el interior de las partículas.

Con el fin de comprender mejor los beneficios asociados con el secuestro de proteínas por parte de partículas de NIPAm/AAc cebadas por afinidad, las partículas de NIPAm/AAc se incubaron a 37°C con una combinación de BSA (0,5 mg/mL), lisozima (0,5 mg/mL) y tripsina (0,05 mg/mL) en NH₄HCO₃ 100 mM (pH 7). Al igual que con el estudio de protección previo, la reacción se analizó utilizando SDS-PAGE después de incubar durante 1 h y durante una noche. En ausencia de partículas de NIPAm/AAc, la mayor parte de BSA se había digerido al cabo de 1 h, y la banda correspondiente a BSA de longitud completa había desaparecido después de incubar durante una noche (Figura 14B). Tal como se señaló anteriormente, las partículas de NIPAm/AAc secuestraban eficazmente tanto lisozima como tripsina y protegían a la lisozima frente a la proteólisis por parte de tripsina. Sin embargo, las partículas no unían BSA, y la presencia de bandas de bajo peso molecular en el sobrenadante después de 1 hora e incubación durante una noche, acompañada por la disminución en la intensidad de la banda correspondiente al BSA de longitud completa, indica que BSA no estaba protegido frente a la degradación por parte de tripsina. La supresión de la actividad proteolítica por parte de enzimas lo suficientemente pequeñas para penetrar en las partículas, tales como tripsina, puede producirse debido a que la inmovilización de las enzimas por parte de la partícula cebada con carga previene que se unan a proteínas del sustrato o pueden ser el resultado de un impedimento estérico asociado con la captura del sustrato por parte de los grupos de cebo de afinidad en la partícula, previniendo así que enzimas se unan productivamente a proteínas diana dentro de la partícula. Así, el estado funcional de las proteínas secuestradas por el cebo de carga puede ser similar al de proteínas detenidas utilizando un tratamiento de fijación precipitante.

Incluso si se mostraban claramente productos de degradación enzimática en los resultados antes presentados, se sabe que el estado no plegado de lisozima contiene una región resistente a la proteólisis por tripsina (Noda et al.,

Biopolymers, **1994**, 34, (2), 217-226). Por lo tanto, la incubación con partículas se repitió con lisozima reducida y alquilada con el fin de excluir cualquier tendencia. La lisozima se redujo mediante incubación con ditioneitol (DTT) (10 mM) en tampón NH_4HCO_3 (50 mM pH 8) que contenía urea (2 M) durante una hora a la temperatura ambiente. A la disolución se añadió yodoacetamida hasta una concentración final de 50 mM y se dejó que reaccionara en la oscuridad durante 30 minutos. El tampón se cambió y la proteína se lavó con agua MilliQ por medio unidades de filtro centrífugos Centricon (Millipore) con un MWCO de 3.000 Da. La lisozima se resuspendió en NH_4HCO_3 (pH 8, 100 mM) hasta una concentración final estimada de 0,5 mg/mL; se añadieron tripsina (0,05 mg/mL) y partículas de NIPAm/AAC, y la disolución se incubó durante 1 hora a 37°C. Las partículas se lavaron como se ha descrito previamente y se cargaron sobre SDS-PAGE. En la Figura 15A se demuestra que las partículas son capaces de proteger a la lisozima frente a la degradación, incluso en su forma reducida y alquilada.

Con el fin de comprender mejor el mecanismo de protección frente a la proteólisis, se realizó un experimento con partículas planas. Partículas de NIPAm se incubaron a 37°C en una disolución NH_4HCO_3 pH 7 (100 mM) que contenía lisozima reducida y alquilada (0,05 mg/mL) y tripsina (0,05 mg/mL) durante una hora. Los resultados se reseñan en la Figura 15B y muestran productos de la degradación de lisozima en el interior de las partículas. Esto sugiere que el cebo de AAC juega un papel fundamental en la protección de proteínas frente a la degradación.

Se ha descrito el desarrollo y aplicación de partículas con contenido en cebo de hidrogel como una nueva herramienta para recoger y concentrar analitos de moléculas pequeñas y candidatos biomarcadores a partir de fluidos biológicos, permitiendo un análisis de alto rendimiento de componentes de baja abundancia y bajo peso molecular. Estas nanopartículas presentan un flujo de trabajo rápido y directo para la utilidad directa en fluidos corporales en bruto, mientras que el trabajo en esta memoria describía a las partículas con una carga negativa que preferentemente unían especies catiónicas, partículas positivamente cargadas tales como un copolímero de NIPAm/alilamina podía ser utilizado para recoger y concentrar selectivamente especies aniónicas de fluidos biológicos. De manera similar, se podían capturar metabolitos hidrófobos para estudios metabolómicos exhaustivos utilizando partículas más hidrófobas tales como copolímeros de NIPAm/estireno. Se pueden incorporar cebos químicos específicos para analitos o proteínas de afinidad por ácidos nucleicos. Por ejemplo, partículas con contenido en boronato, que se sabe unen a sacáridos, serían utilizadas para secuestrar glicoproteínas de la solución (Ivanov et al., *Journal of molecular recognition* **2006**, 19, (4), 322-31). Por consiguiente, actualmente se están sintetizando copolímeros de NIPAm-alilamina que contienen un cebo para proteínas aniónicas. Además de ello, ácido p-vinilfenilborónico (VPBA) se encuentra bajo consideración como un copolímero para recoger azúcares y ácidos nucleicos. Cebos de afinidad adicionales tales como colorantes reactivos basados en triazinilo (que tienen afinidad por proteínas), hexadecilamina (para la absorción de lípidos) y ciclodextrinas (capaces de asociar pequeñas moléculas) están siendo inmovilizados de forma no covalente o covalente dentro de las partículas. En particular, la química del cebo arriba descrita ha sido utilizada para recoger los siguientes metabolitos pequeños L-dopa, ácido homogentísico, dopamina, dopac y ácido 5-hidroxiindolacético. Esto amplía la utilidad de la tecnología al mundo de los metabolómicos.

La combinación de una diversidad de químicas de afinidad con una herramienta para el tamizado por tamaños en un proceso de una etapa podría tener una enorme utilidad para el descubrimiento de marcadores de enfermedades y flujos de trabajo y análisis.

En el flujo de trabajo presentado en este estudio, las proteínas se desnaturalizan cuando se eluyen fuera de las partículas y luego se analizan en espectrometría de masas para el descubrimiento de biomarcadores. No obstante, es importante señalar que las condiciones de recogida se realizan con mezclas de proteínas nativas. Esto permite futuras aplicaciones que requieren que los analitos de interés se encuentren en su estado nativo (immulite, radioinmunoensayo). Para estas aplicaciones, sería importante que las proteínas no se desnaturalizaran cuando se liberaban de las partículas. Ahmad y colegas han demostrado, utilizando difracción circular, que moléculas para el suministro de fármacos liberados a partir de partículas de NIPAm mediante cambios de temperatura conservaban su estado conformacional nativo (Ahmad et al., *Colloid & Polymer Science* **2002**, 280, (4), 310-315). Por consiguiente, posibles medios para eluir proteínas nativas a partir de las partículas incluyen modificar la temperatura o el pH de la disolución, aumentar la resistencia iónica o electroeluir las proteínas bajo condiciones no desnaturalizantes, en ausencia de detergente.

Ejemplo 12 – Síntesis de Partículas con Núcleo de NIPAm/AAC-Envoltura de NIPAm

En esta arquitectura de partículas, un núcleo que contiene restos de cebo de afinidad, está rodeado por una envoltura de NIPAm. La capacidad de tamizado de la envoltura de NIPAm ocultará al núcleo y a sus grupos de cebo de afinidad de partículas mayores que puedan estar presentes y que podrían competir con las dianas de baja abundancia y bajo peso molecular, pretendidas para unirse al cebo de afinidad del núcleo. Se preparó una disolución de envoltura disolviendo NIPAm, 0,02 equivalentes molares de cada uno de BIS y SDS en H_2O y filtrando la disolución a través de un filtro de membrana. La disolución se desgasificó en vacío durante varios minutos y luego se purgó con nitrógeno durante 2 h a la temperatura ambiente con agitación. Al tiempo que se purgaba la disolución de

la envoltura, la disolución del núcleo se preparó disolviendo NIPAm, 0,08 equivalentes molares de AAC y 0,02 equivalentes molares de BIS en H₂O y luego se filtró la disolución. La disolución del núcleo se desgasificó luego y se purgó con nitrógeno a 70°C según se describe para la preparación de las partículas de NIPAm. Una vez que la disolución se había equilibrado a 70°C y se había agitado bajo nitrógeno durante 1 hora, se añadió APS (0,005 equivalentes molares) a la disolución del núcleo. Después de permitir que la reacción del núcleo de NIPAm/AAC se incubara durante 3 h a 70°C bajo nitrógeno, se añadió la disolución de la envoltura al matraz de reacción, seguido de una parte alícuota adicional de APS. Después, la reacción se dejó agitar a 70°C bajo nitrógeno durante 3 h adicionales. En ese momento, la reacción se retiró del calor y se dejó agitar durante una noche bajo nitrógeno a la temperatura ambiente. Después, las partículas se recogieron y lavaron de la misma manera a la descrita para las partículas de NIPAm.

Ejemplo 13 – Partículas de la envoltura del núcleo tienen el mismo corte de tamizado molecular que NIPAm/AAC

La medición por difusión de la luz del diámetro de partículas de la envoltura del núcleo proporcionó un valor de 1048 nm para el núcleo de NIPAm/AAC y de 1198 nm cuando se añadió la envoltura de NIPAm. Con el fin de determinar si las partículas de la envoltura del núcleo tenían el mismo corte de peso molecular (MWCO) que partículas de NIPAm/AAC, se utilizó una disolución de marcadores de peso molecular de proteínas. La disolución consistía en 0,5 mg/mL de cada una de las siguientes proteínas: aprotinina (PM 6.500 Da, Sigma-Aldrich), lisozima (PM 14.400 Da, Sigma-Aldrich), inhibidor de tripsina (PM 21.500 Da, Invitrogen), anhidrasa carbónica (PM 31.000 Da, Sigma-Aldrich), ovoalbúmina (PM 45.000 Da, Sigma-Aldrich) y BSA (PM 66.000 Da, Fisher Scientific) disueltas en Tris (pH 7, 50 mM). El tiempo de incubación era de 1 hora y las partículas se lavaron según se describe en el manuscrito. El análisis por SDS-PAGE reseñado en la Figura 16 muestra una concordancia sustancial en los valores de MWCO para los dos tipos de partículas.

Ejemplo 14 – Partículas de la envoltura del núcleo protegen a la lisozima frente a la degradación enzimática por quimotripsina.

Otra proteasa, α -quimotripsina (PM 25.000 Da, pI = 8,75, Sigma) se eligió para demostrar la capacidad de partículas de proteger proteínas frente a la degradación. α -quimotripsina se utilizó a una relación de 1:10 (p/p) para α -quimotripsina:lisozima. La digestión con lisozima se realizó en Tris HCl 100 mM que contenía CaCl₂ 10 mM, pH 7,8 a 30°C durante 3 horas. Las partículas de la envoltura del núcleo se incubaron con lisozima y tripsina en las condiciones de digestión arriba descritas. También en este caso, las partículas protegían a la lisozima frente a la degradación por quimotripsina (Figura 17, pista 5). La degradación por lisozima también es evidente en la incubación sin partículas (Figura 17, pista 3).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para inhibir o prevenir la degradación de analitos de proteínas en una muestra que también contiene una proteasa, que comprende poner en contacto la muestra con partículas de captura para los analitos, en donde las partículas de captura comprenden una matriz polimérica que tiene un tamaño de poros que, bajo determinadas condiciones, permite que los analitos y la proteasa penetren en la matriz polimérica, al tiempo que excluyen que otros compuestos penetren en la matriz polimérica, permitiendo a la muestra y a las partículas de captura permanecer en contacto durante un período de tiempo para que las partículas de captura secuestren los analitos y proteasa y, con ello, inhiban o eviten la degradación de los analitos secuestrados.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el analito de proteína se selecciona del grupo que consiste en: proteínas, glicoproteínas, proteolípidos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, biomarcadores, compuestos de fármacos, odorantes volátiles, productos tóxicos y contaminantes.
- 3.- Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la matriz polimérica es expandible y contráctil; opcionalmente, en los casos en los que la matriz polimérica se expande o contrae, el tamaño de los poros de la matriz de gel se expande o contrae, respectivamente.
- 4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
- (a) la matriz polimérica es expansible y contráctil en respuesta a un estímulo aplicado; preferiblemente, en donde el estímulo aplicado es un cambio térmico, eléctrico, magnético, de ultrasonidos, presión, radiante, láser, osmótico o de pH; o
- (b) la matriz polimérica es expansible o contráctil tras el tratamiento con una enzima.
- 5.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la matriz polimérica puede comprender, además, un agente atrayente; opcionalmente
- (a) en donde el agente atrayente es secuestrado con la partícula de captura; o
- (b) en donde el agente atrayente es unido de forma covalente a la partícula de captura; o
- (c) en donde el agente atrayente está integrado en la matriz polimérica.
- 6.- Un método según la reivindicación 5, en el que el agente atrayente es un ligando de afinidad; opcionalmente, en donde el ligando de afinidad comprende un anticuerpo o proteína, un aptámero, ácido nucleico, un fármaco, un producto químico, un metabolito, un lípido, un glicolípido, un fosfolípido, un polipéptido, un grupo de afinidad o un grupo metálico.
- 7.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la matriz polimérica es una matriz co-polimérica que comprende un monómero estructural y un monómero de afinidad.
- 8.- Un método según la reivindicación 7, en el que el monómero estructural se selecciona del grupo que consiste en: acrilamida y derivados de la misma, acrilamidas N-alquil-sustituídas; N,N-metilenbisacrilamida, N,N-cistaminbisacrilamida, N-vinilalquilamidas, ácido acrílico, ácido metacrílico, alilamina, estireno, glutamato de bencilo, ácido 2-etilacrílico, 4-vinilpiridina, silicona, metacrilato de hidroxietilo, óxido de etileno, tereftalato de butilenos, ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico, vinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, lactida, glicolida, caprolactona, hidroxialcanoatos, quitosano, ácido hialurónico, almidón, celulosa y agarosa; más preferiblemente, en el que el monómero estructural es ácido N-isopropilacrílico.
- 9.- Un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el monómero de afinidad
- (a) comprende un resto cargado positivamente; preferiblemente, en el que el resto cargado positivamente se selecciona del grupo que consiste en: grupos aminas y grupos amida; o
- (b) comprende un resto cargado negativamente; preferiblemente, en el que el resto cargado negativamente se selecciona del grupo que consiste en: grupos ácidos carboxílico, grupos hidroxilo, grupos tiol y grupos fosfato; o
- (c) se selecciona del grupo que consiste en: colorantes de afinidad, grupos ácido borónico, ácidos nucleicos, glicopéptidos, glicoproteínas, ciclodextrinas, calixarenos, grupos porfirina y grupos alifáticos; o
- (d) en el que el monómero de afinidad es ácido acrílico.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la partícula de captura tiene un núcleo que comprende una matriz co-polimérica que comprende un monómero estructural y un monómero de

afinidad; y

una envoltura que comprende una matriz polimérica que comprende un monómero de envoltura, en donde la matriz co-polimérica y la matriz polimérica tienen cada una un tamaño de poros que, bajo determinadas condiciones, permiten que el analito penetre en las matrices, al tiempo que excluyen que otros compuestos de la muestra penetren en las matrices.

5 11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la partícula de captura tiene un tamaño del corte del peso molecular de 5 a 100 kDa; preferiblemente, 20 a 50 kDa.

10 12.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, además, aislar las partículas de captura de la muestra; y liberar el analito de la partícula de captura; preferiblemente, en el que el aislamiento de las partículas de captura se realiza moviendo físicamente las partículas; opcionalmente

(a) en el que las partículas se mueven físicamente mediante exposición a un campo magnético, un campo eléctrico, un gradiente de pH, un gradiente de disolventes, un flujo de fluido, un flujo microfluídico o una fuerza física; o

15 (b) en el que las partículas se mueven físicamente uniendo las partículas a un sustrato; preferiblemente, en el que el sustrato es una perla o una superficie.

20 13.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la matriz polimérica tiene un tamaño de poros que, bajo una primera condición, permite que el analito atraviese el poro, y que tiene un tamaño de poros bajo una segunda condición, que no permite que el analito atraviese el poro; y en el que la muestra contactada y las partículas de captura se exponen a la primera condición durante el período de tiempo suficiente para que las partículas de captura secuestren el analito; seguido de exponer las partículas de captura a la segunda condición;

aislar las partículas de captura de la mezcla; y

re-exponer las partículas de captura a la primera condición para liberar el analito de la partícula de captura.

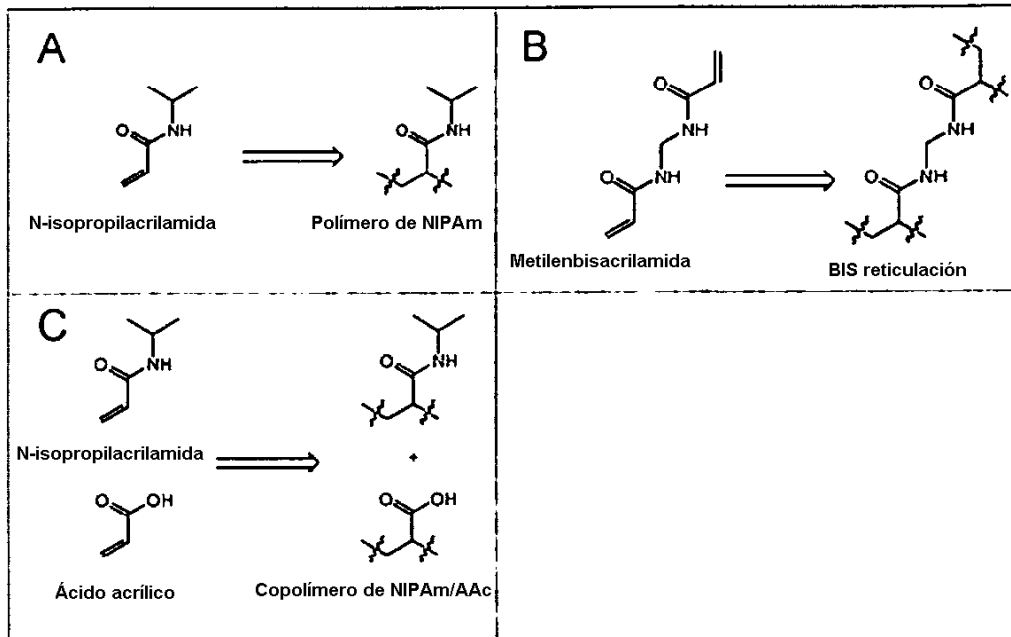


FIGURA 1

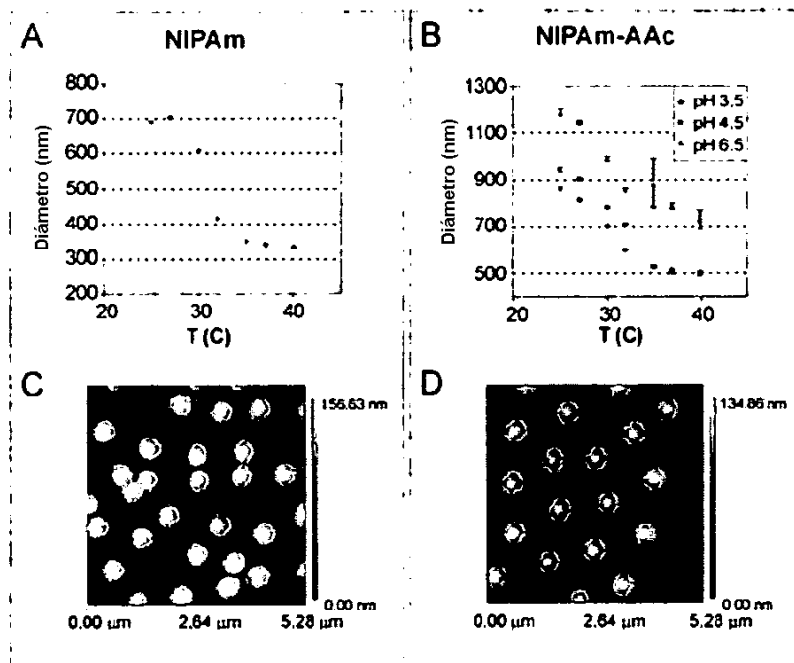


FIGURA 2

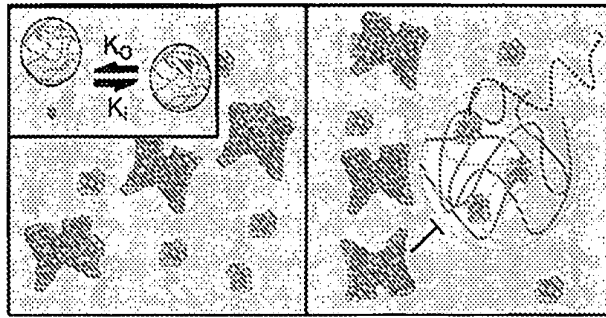


FIGURA 3

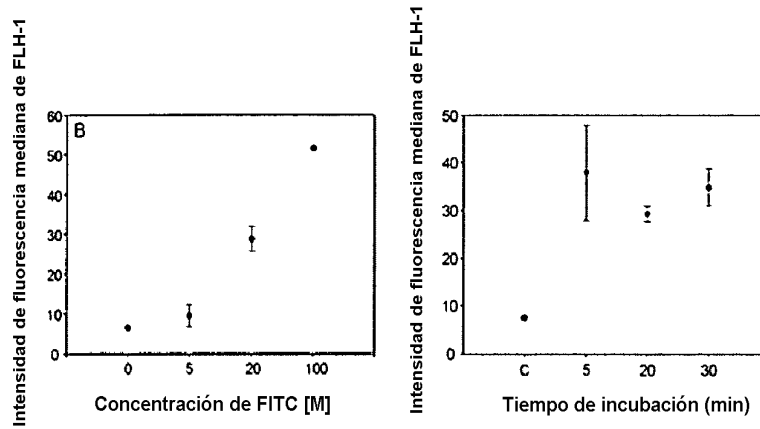


FIGURA 4

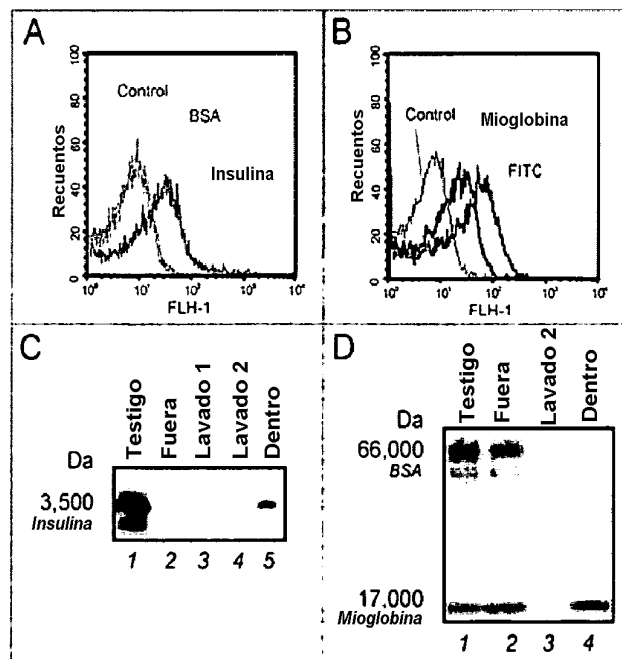


FIGURA 5

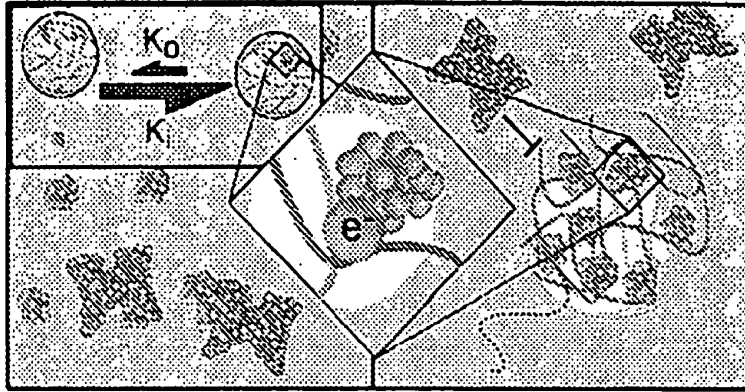


FIGURA 6

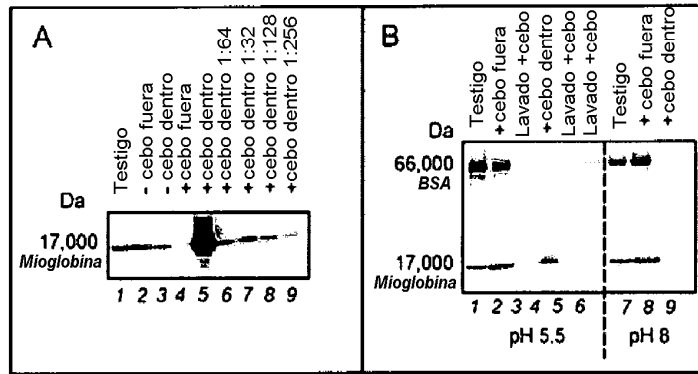


FIGURA 7

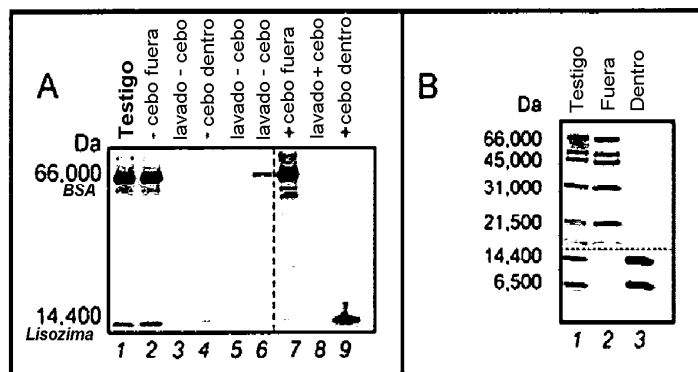


FIGURA 8

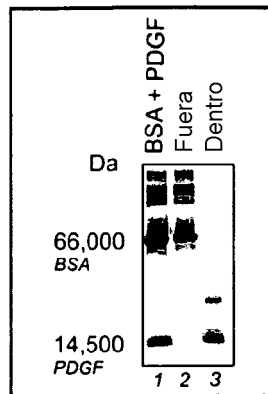


FIGURA 9

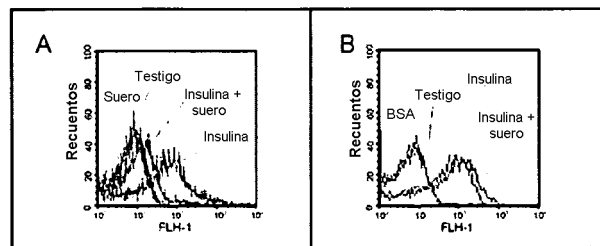


FIGURA 10

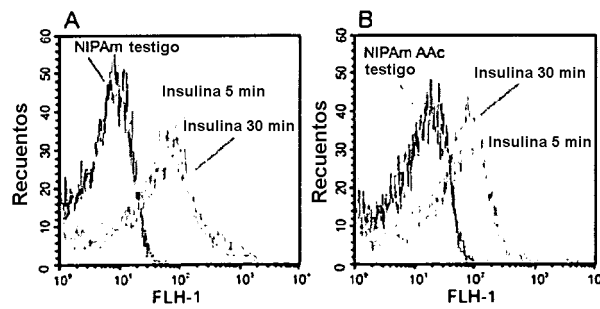


FIGURA 11

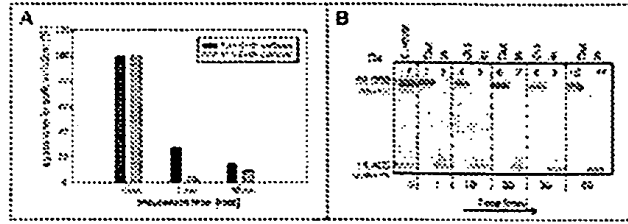


FIGURA 12

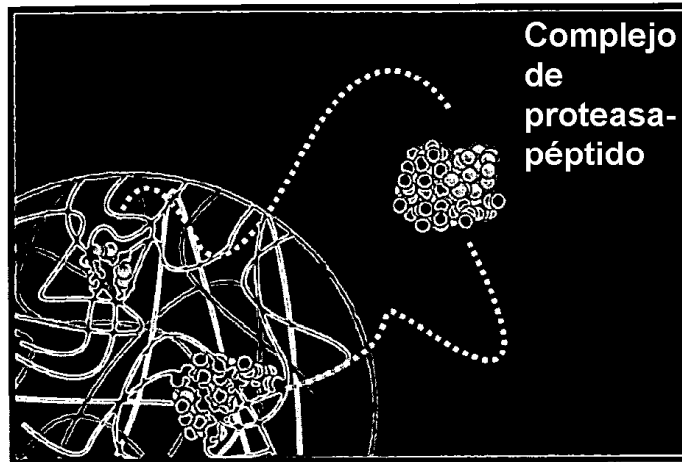


FIGURA 13

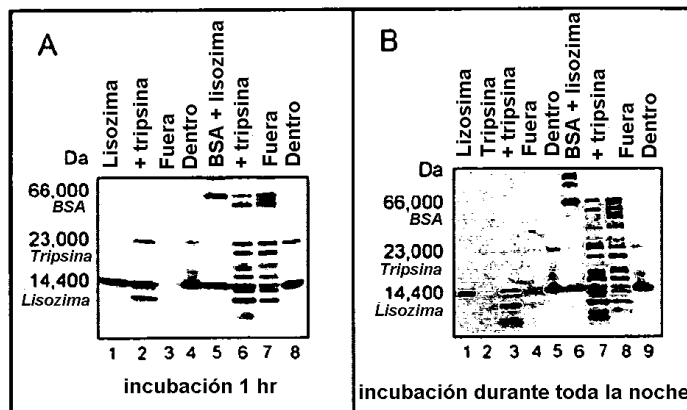


FIGURA 14

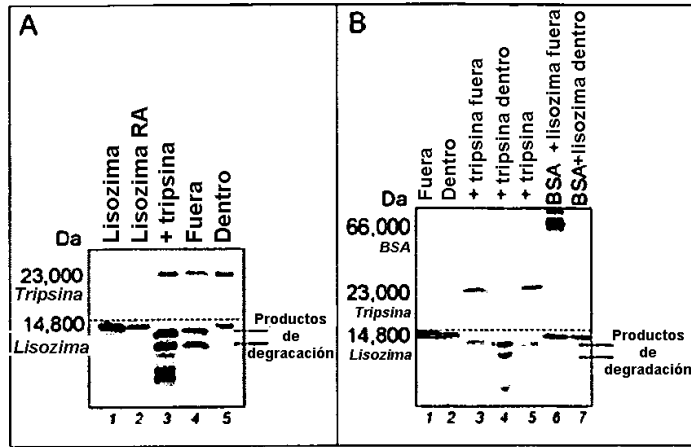


FIGURA 15

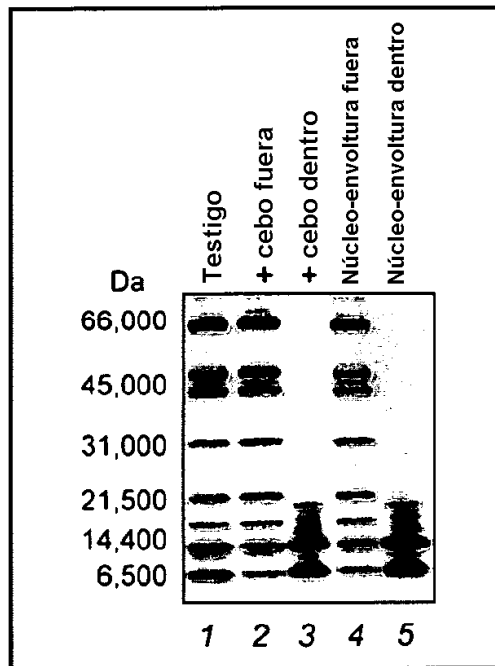


FIGURA 16

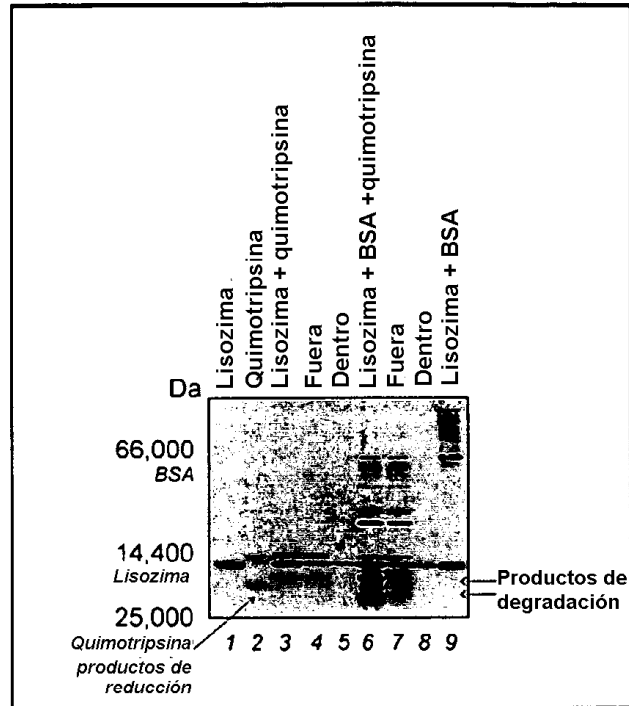


FIGURA 17