

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 024**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07F 1/12 (2006.01)

C07K 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2009 E 09733976 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2281194**

54 Título: **Ensamblaje molecular que comprende oro y un engarce para detección de entidades bioquímicas**

30 Prioridad:

24.04.2008 SE 0800939

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

26.04.2013

73 Titular/es:

**SVANOVA BIOTECH AB (100.0%)
Uppsala Science Park
751 83 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

HAMASUR, BESTON

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 402 024 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

Ensamblaje molecular que comprende oro y un engarce para detección de entidades bioquímicas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un ensamblaje molecular que comprende un ligando, un engarce y una entidad detectable, en el que el ligando está unido covalentemente al engarce, y el engarce es un agente quelante que forma un complejo de coordinación con la entidad detectable.

Antecedentes de la invención

10 Hace 50 años se prepararon anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes para la primera detección por microscopía de antígenos en tejidos. En 1970 los marcadores enzimáticos proporcionaron por primera vez una tinción coloreada permanente con mayor resolución y mayor estabilidad que los marcadores fluorescentes. Mediante la introducción de los marcadores de oro en la microscopía en 1971, los marcadores de oro se han hecho muy importantes para la detección y cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos cuando se usan en técnicas tales como transferencia, citometría de flujo, hibridación e identificación de huella de ADN. Entre los coloides metálicos, el oro sigue siendo uno de los reactivos más ampliamente usados con una historia que data desde Faraday en 1857. El documento RU 201374 describe la síntesis de partículas de oro de átomos de oro y su conjugación con estreptavidina.

20 La estabilidad, sensibilidad y reproducibilidad superior de la fabricación hacen al oro adecuado para su uso en varias aplicaciones. En el microscopio electrónico las partículas de oro son visibles sin tratamiento adicional. En el microscopio óptico, sin embargo, las partículas de oro se hacen visibles a través de un procedimiento de potenciación de plata corto y sencillo. Para la detección por el ojo, las partículas de oro también revelarán proteína inmovilizada en una fase sólida tal como membrana de transferencia a través del color rojo acumulado del sol de oro. La potenciación con plata de este precipitado de oro también proporciona sensibilidad para detección aumentada.

25 Con la correcta química de conjugación pueden acoplarse partículas de oro con una amplia diversidad de moléculas incluyendo proteínas (por ejemplo anticuerpos), polipéptidos, carbohidratos, polímeros, polisacáridos, enzimas y ácidos nucleicos.

30 Hay varias ventajas en la selección de partículas de oro como marcadores para identificación microscópica y no microscópica de moléculas diana. La abundancia de diferentes tamaños de partícula de los que elegir hace posible estudiar los antígenos de forma microscópica sobre una amplia serie de aumentos y proporciona la oportunidad de marcaje múltiple de antígenos en secciones tisulares. Aunque los marcadores fluorescentes y las reacciones de color basadas en enzimas pueden desteñirse con el tiempo y la exposición a la luz, las partículas de oro no desaparecen, las partículas de oro proporcionan un marcador permanente. A diferencia de algunos sistemas de detección basados en enzimas, las sondas de oro son esencialmente no tóxicas, seguras y fáciles de usar. La buena estabilidad de un conjugado de oro bien hecho proporciona al producto un largo periodo de caducidad tanto congelado como almacenado a 4 °C.

35 Para tinción de proteínas inmovilizadas en membranas, las sondas de oro tienen sensibilidad y resolución de detección inmejorable. Además las sondas de oro no son caras en su aplicación y su alta sensibilidad con frecuencia permite que se diluyan anticuerpos primarios valiosos significativamente más que lo que es posible con el uso de otros sistemas de detección.

40 Se ha sintetizado previamente grupos de oro en el intervalo de 1,4 nm, listos para conjugación covalente de ligandos, con dos químicas de superficie diferentes (superficies de Maleimido y sulfo -N-hidrosuccinimida). Sin embargo las desventajas asociadas con estos grupos de oro son: 1) sus pequeños tamaños requieren potenciación con plata en todos los tipos de aplicaciones, 2) las moléculas reactivas en su superficie actúan a un pH mayor de 8,0, esta propiedad dificulta su uso con biomoléculas que tengan puntos isoeléctricos bajos, 3) moléculas mayores (tales como IgM) son incapaces de unirse al grupo de oro debido a impedimento estérico. Además los grupos de oro son difíciles de producir puesto que deben sintetizarse los componentes del reactivo requeridos y se necesitan varias etapas de ultrafiltración y purificación.

50 Los primeros ensayos rápidos usaban látex coloreado para formar la señal visual. El látex era originalmente, y aún es, el principal procedimiento de marcaje usado en ensayos de aglutinación. Esto se debe a su predisposición para aglutinar en presencia de componentes de unión. Para ensayos rápidos, en los que la estabilidad del conjugado es crítica para evitar resultados de falso positivo, esta predisposición para aglutinar puede convertirse en un problema importante.

55 A finales de los años 80 surgió un uso muy importante de conjugados de oro para su incorporación en inmunoensayos de ensayo rápido. Los ensayos rápidos que usan anticuerpo marcado con oro para visualizar la presencia de un analito en una muestra líquida en membranas revestidas con anticuerpos han evolucionado para ser el ensayo de elección en casos en los que se requieran formatos de ensayo no instrumentales, manuales,

rápidos y económicos. Tales ensayos pueden ponerse en formatos de varillas o como dispositivos encerrados dentro de alojamientos de plástico.

Los procedimientos de ensayo para el diagnóstico de diversas enfermedades están mejorándose constantemente. En la actualidad, los procedimientos inmunológicos están entre los procedimientos más sensibles usados para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos en muestras. En tales ensayos, las partículas de oro coloidal se revisten de forma pasiva con anticuerpos específicos para el agente de interés y se secan en una capa de conjugado. Si el antígeno está presente en una muestra de ensayo, se formará un complejo inmune entre el anticuerpo detector marcado con oro coloidal y el antígeno en la muestra de ensayo. El complejo inmune asciende después cromatográficamente por una tira en la que se ha puesto una capa de un anticuerpo de captura, o directamente a través de una membrana revestida con anticuerpo. La presencia de una franja roja visual, debido a las partículas de oro, es indicativa de un ensayo positivo. Puede adaptarse el mismo principio para la detección de anticuerpos específicos si los antígenos homólogos o conjugado de péptido-vehículo se inmovilizan en la tira. Para ciertos analitos (por ejemplo hormonas, drogas recreativas, pesticidas y polisacáridos) que no pueden detectarse fácilmente en este sistema, puede usarse un sistema de inmunocromatografía de flujo lateral de tipo competición.

Aunque puede adsorberse de forma pasiva anticuerpos en el coloide de oro, se ha mostrado que dicho revestimiento directo con frecuencia no tiene éxito debido a la disociación parcial de los anticuerpos y los anticuerpos libres compiten con el conjugado de anticuerpo-oro dando como resultado una baja sensibilidad. Además la orientación incorrecta de los anticuerpos adsorbidos asociados con revestimiento pasivo da como resultado un conjugado que posee baja actividad inmunológica. La adsorción pasiva en coloides de oro se restringe a ligandos cargados positivamente y también a ligandos con un fuerte carácter hidrófobo. Sin embargo los ligandos cargados neutros y pequeños de importancia biológica no pueden unirse directamente a las partículas de oro. Las desventajas descritas anteriormente limitan el uso de sondas de oro en ensayos, tales como ensayos rápidos.

Se han descrito varios procedimientos para potenciar la adsorción de ligandos biológicos a soles de oro. La introducción de grupos sulfhidrilo en la molécula de proteína mediante tiolación es el procedimiento más usado. La modificación del ligando de este modo puede aumentar su capacidad para unirse a soles de oro como se demuestra por el aumento de la resistencia a aglomeración inducida por sales. Sin embargo, dicha modificación está acompañada de pérdida significativa de actividad.

Se han usado modificadores proteicos tales como N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA), 2 iminotiolano (2 IT) o N-Succinimidil 3-[2-piridilditio]-propionamido (SPDP) para tiolación de anticuerpos. Los grupos sulfhidrilo del anticuerpo modificado pueden después unirse fuertemente al sol de oro a través de enlace dativo.

También pueden crearse grupos sulfhidrilo en una molécula de anticuerpo por fragmentación del anticuerpo con pepsina o papaína. Los fragmentos Fab producidos de este modo contienen sulfhidrilo listo para conjugación con soles de oro.

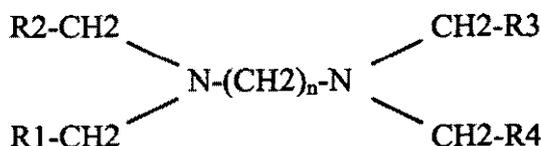
También se ha descrito la modificación de sol de oro con reactivos que contienen tiol. Compuestos químicos tales como SH-R en los que R es CHO, -NH₂, -COOH, SH y OH proporcionan grupos en el sol disponibles para la unión o enlace de anticuerpos, antígenos u otros ligandos con el sol de oro. Los grupos expuestos en el sol se unen después a los ligandos deseados mediante la acción de moléculas de engarce tales como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC).

No todos los tipos de modificación descritos anteriormente son adecuados para todos los ligandos. Aunque la tiolación de algunas clases de anticuerpos mejoró significativamente su capacidad para unirse al coloide de oro otros isotipos de anticuerpo se inactivaron tras este tratamiento mientras que otros anticuerpos perdieron reactividad inmunológica significativa después de la fragmentación con pepsina/papaína.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es eliminar o minimizar las desventajas de la técnica anterior, por ejemplo las desventajas asociadas con la adsorción pasiva. Es un objetivo adicional de la presente invención facilitar la unión de ligandos que no sean capaces de dirigir la adsorción en partículas de oro.

Este objetivo se alcanza mediante la presente invención, que se refiere a un ensamblaje molecular que comprende un ligando, un engarce y una entidad detectable, en el que el ligando se une covalentemente al engarce y el engarce es un agente quelante que forma un complejo de coordinación con la entidad detectable, caracterizado porque la entidad detectable comprende partículas de oro, y porque el agente quelante tiene la estructura química



5 en la que R1, R2, R3, R4 pueden ser iguales o diferentes, en la que R1-R4 se seleccionan del grupo que consiste en -SH, -NH₂, -COOH, hidrocarburos C1-C20 incluyendo o que se sustituyen con al menos un grupo funcional que comprende al menos un heteroátomo, y n ≥ 1, caracterizado además porque el ligando se selecciona de un grupo de especies químicas incluyendo proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos, en las que las partículas de oro tienen cationes divalentes unidos a ellas para mostrar de este modo sitios reactivos para formar un complejo de coordinación con el agente quelante.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir el ensamblaje molecular, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

10 i) mezclar una alícuota de una solución que comprende un ligando con una alícuota de una solución que comprende un agente quelante activado, uniendo de este modo el ligando covalentemente con el agente quelante, formando de este modo un agente de unión

15 ii) mezclar una alícuota de suspensión de partículas de oro con una alícuota de una solución que comprende cationes divalentes, para mostrar de este modo sitios reactivos adecuados para formar complejos de coordinación

iii) mezclar una alícuota del agente de unión proporcionado en la etapa (i) con una alícuota de las partículas de oro producidas en la etapa (ii), formando de este modo el ensamblaje molecular en solución.

La presente invención se refiere además al uso de un ensamblaje molecular como un reactivo en un procedimiento para la detección de especies químicas y/o bioquímicas.

20 La presente invención se refiere además a un kit para la detección de especies químicas y/o bioquímicas, comprendiendo el kit un ensamblaje molecular y un dispositivo; el dispositivo comprende un receptáculo para recibir el ensamblaje molecular y un receptáculo para recibir una muestra que comprende la especie para detectar.

Breve descripción de la invención

Figura 1 Síntesis de EDTA aminado

25 Figura 2 Síntesis de EDTA activado por N-hidroxisuccinimida

Figura 3 Síntesis de EDTA activado por maleimida

Figura 4 Acoplamiento de ligandos que contienen carbonilo con EDTA aminado

Figura 5 Acoplamiento de ligandos que contienen tiol con EDTA activado por maleimida

Figura 6 Acoplamiento de ligandos que contienen amina con EDTA activado por NHS

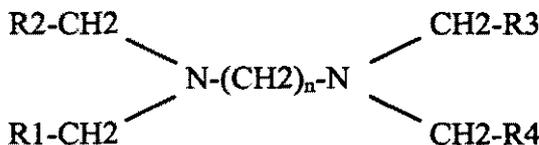
30 Figura 7 Esquema que representa partículas de oro revestidas con un conjugado de ligando-EDTA

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención propone una técnica rápida, fácil de usar para la producción de ensamblajes moleculares de oro-ligando estables, sensibles y específicos para usar en varias aplicaciones. La invención aprovecha la fuerte capacidad quelante (es decir la fuerte capacidad de unión) así como el constituyente de grupos reactivos de agentes quelantes.

Los agentes quelantes son compuestos capaces de formar enlaces coordinados con metales a través de dos o más átomos del compuesto orgánico. Tales compuestos orgánicos se denominan agentes quelantes. El compuesto formado por un agente quelante y un metal se llama un quelado, y los enlaces coordinados formados son relativamente fuertes.

40 La presente invención se refiere a un ensamblaje molecular que comprende un ligando, un engarce y una entidad detectable, en el que el ligando está unido covalentemente al engarce, y el engarce es un agente quelante que forma un complejo de coordinación con la entidad detectable, caracterizado porque la entidad detectable comprende partículas de oro, y porque el agente quelante tiene la estructura química



en la que R1, R2, R3, R4 pueden ser iguales o diferentes, en la que R1-R4 se selecciona del grupo que consiste en -SH, -NH₂, -COOH, hidrocarburos C1-C20 incluyendo o que se sustituyen con al menos un grupo funcional que comprende al menos un heteroátomo, y $n \geq 1$.

En una realización de la presente invención las partículas de oro son coloidales.

5 Se entiende que un heteroátomo es cualquier átomo diferente de carbono (C) e hidrógeno (H).

En una realización de la presente invención los heteroátomos se seleccionan de un grupo de heteroátomos que consiste en S, N y O.

El ligando se une covalentemente al engarce y la unión del ligando es normalmente con al menos uno de R1-R4.

10 De acuerdo con la presente invención, el engarce puede ser cualquier agente quelante capaz de unirse covalentemente con el ligando en cuestión.

15 Son agentes quelantes adecuados: etilendiamintetraacetato (EDTA), ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DTPA) y ácido etilen glicol bis (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) ácido trans-1,2-ciclohexilendiaminotetraacético (DCTA), ácido etilendinitrilotetraquis(metilfosfónico) (EDTP), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido N,N'-bis-(piridoxal-5-fosfato)etilendiamina-N,N'-diacético (DPDP), ácido N,N'-bis(piridoxal-5-fosfato)-trans-1,2-ciclohexil-diamina -N,N'-diacético (DPCP). El quelado puede ser mono-, bi-, tri-, tetra-, penta- o hexadantato.

20 Solamente pueden usarse quelados con grupos reactivos capaces de enlace covalente con ligandos deseados como un engarce de acuerdo con la presente invención. Otra propiedad importante del quelado es la fuerza de unión (valor de pKa) del quelado con su ión. No todos los tipos de ión son adecuados con el coloide de oro, por lo tanto debe seleccionarse en consecuencia un quelado correcto. El quelado también debe tolerar transformación sin perder la capacidad para formar un complejo firme con el ión. Por ejemplo, EDTA es un agente quelante hexadentado con cuatro grupos carboxilo. La ocupación de estos grupos durante la conjugación con ligandos afecta a la propiedad del EDTA, transformándolo de hexadentado a bidentado pero aún con capacidad completa para formar complejo con los iones. Estas propiedades hacen al EDTA un quelado atractivo en la presente invención.

25 La selección de química de conjugación potencialmente útil se determina por la naturaleza química del ligando y el analito para determinar. El procedimiento de la invención es suave, estable y da como resultado la formación de un ensamblaje molecular estable que es esencialmente completamente reactivo, por ejemplo inmunológicamente completamente reactivo. Las ventajas asociadas con la presente invención, en comparación con técnicas previamente conocidas, incluyen:

- 30
- Sensibilidad mejorada, ya que el ensamblaje molecular de acuerdo con la presente invención permite la unión de más moléculas de analito por partícula de oro.
 - Tratamiento suave de los ligandos, no es necesaria etapa de fragmentación como, por ejemplo, para generación de fragmentos Fab.
 - Se minimiza el impedimento estérico por la acción de una rama espaciadora constituyente del quelado. Esta propiedad permite la inmovilización de antígenos mayores como IgM, que no está permitida por procedimientos de conjugación previamente conocidos.

35

 - Adecuación para todos los tipos de ligandos independientemente del punto isoeléctrico y/o los isotipos (en el caso de anticuerpos).
 - Resistencia a las condiciones de pH extremas halladas en muchos compartimentos celulares (por ejemplo vacuolas y lisosomas).

40

 - Los ligandos pueden inmovilizarse en una orientación correcta (es decir sin afectar a las características de unión a ligando con respecto a especificidad o afinidad) en oro a través de aminación reductora o grupos aldehído creados en el anticuerpo (ejemplo 2) con grupos amina de las moléculas queladas modificadas (figura 4).
 - Pueden inmovilizarse moléculas pequeñas y no cargadas (tales como oligosacáridos) en oro con actividad completamente conservada.

45

 - Pueden usarse partículas de oro de cualquier tamaño y forma, normalmente con diámetros que varían de 5-250 nm, para conjugación sin restricción ni pérdida de sensibilidad y estabilidad, por ejemplo debido a efectos de aglomeración. Las partículas de oro son preferentemente coloidales.

En una realización de la presente invención, R1, R2, R3 y/o R4 es un heterociclo.

50 En una realización adicional de la presente invención, el heterociclo es N-hidroxisuccinimida éster.

En una realización adicional de la presente invención, el heterociclo es maleimida.

En una realización de la presente invención, el ligando se selecciona de un grupo de especies químicas incluyendo proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos.

De acuerdo con la presente invención, las partículas de oro se han tratado con cationes divalentes para mostrar de este modo sitios reactivos para formar un complejo de coordinación con el agente quelante.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir el ensamblaje molecular, caracterizado porque el procedimiento comprende las etapas de:

5 i) mezclar una alícuota de una solución que comprende un ligando con una alícuota de una solución que comprende un agente quelante activado, uniendo de este modo el ligando covalentemente con el agente quelante, formando de este modo un agente de enlace

10 ii) mezclar una alícuota de suspensión de partículas de oro con una alícuota de una solución que comprende cationes divalentes, para formar de este modo sitios reactivos adecuados para la formación de complejos de coordinación

iii) mezclar una alícuota del agente de unión proporcionada en la etapa (i) con una alícuota de las partículas de oro que tienen cationes unidos a las mismas producidas en la etapa (ii), formando de este modo el ensamblaje molecular en solución.

15 Se entiende que el término activado significa: una molécula o reactivo que está modificado químicamente para mostrar uno o más grupos reactivos capaces de reaccionar con otro grupo para formar un enlace estable. Una reacción de un Grupo aldehído (-CHO) con un grupo -NH₂ es un ejemplo de activación. Otro ejemplo de activación es una reacción entre un electrófilo y un nucleófilo.

20 En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa de bloquear sitios no revestidos en las partículas de oro, para evitar la aglomeración de las partículas, a través de la adición de un compuesto adecuado.

En una realización adicional de la presente invención, el compuesto usado para bloquear sitios no revestidos en las partículas de oro es albúmina de suero bovino, caseína, polivinil pirrolidona o alcohol polivinílico.

La presente invención se refiere además al uso del ensamblaje molecular como un reactivo en un procedimiento para la detección de especies químicas y/o bioquímicas.

25 Se entiende que la especie química puede ser cualquiera de las especies seleccionadas de un grupo de especies químicas incluyendo proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos.

Se entiende además que la especie bioquímica puede ser cualquiera de las especies seleccionadas de un grupo de especies bioquímicas incluyendo partículas de virus, células y bacterias.

30 La presente invención se refiere además a un kit para la detección de especies químicas y/o bioquímicas, comprendiendo el kit el ensamblaje molecular y un dispositivo; el dispositivo comprende un receptáculo para recibir el ensamblaje molecular, un receptáculo para recibir una muestra que comprenda la especie para detectar, una zona de migración, y una zona de detección para detectar la interacción entre las especies y el ensamblaje molecular.

El ensamblaje molecular de acuerdo con la presente invención es aplicable dentro de varias áreas de aplicación.

35 En una realización de la presente invención, el ensamblaje molecular se usa para la detección de especies químicas y/o bioquímicas en sistemas para cromatografía.

En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa para la detección de especies químicas y/o bioquímicas en sistemas para cromatografía de flujo lateral.

40 En una realización adicional el ensamblaje molecular se usa para la detección de moléculas pequeñas (Hormonas, lipopolisacáridos-LPS, péptidos pequeños, fármacos) que no son capaces de unirse en un formato de tipo sándwich.

En una realización de la presente invención, el ensamblaje molecular se usa para la detección de especies químicas y/o bioquímicas mediante el uso de microscopía electrónica.

En una realización de la presente invención, el ensamblaje molecular se usa para la detección de especies químicas y/o bioquímicas mediante el uso de inmunotransferencia.

45 En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa para la detección en micromatrices de ADN.

En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa para la detección en ensayos de aglutinación (usando partículas de oro grandes).

50 En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa para purificación por afinidad de proteínas específicas. Los anticuerpos para la proteína diana se conjugan en primer lugar con el oro y después se mezclan con el extracto celular/mezcla de proteínas. Después de incubación corta la proteína diana unida al conjugado de oro (el

ensamblaje molecular de acuerdo con la presente invención) se separa mediante el uso de centrifugación y posteriormente la proteína puede disociarse del conjugado reduciendo el pH seguido de centrifugación.

5 En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa para producción de anticuerpos; pueden conjugarse moléculas no inmunogénicas tales como lípidos y carbohidratos con el oro antes de la inmunización. Esta estrategia potencia la inmunogenicidad de las moléculas debido a mejor presentación y reconocimiento de las moléculas por las células del sistema inmunitario.

10 En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa como un vehículo para suministro de fármacos y genes a células diana. La gran estabilidad del ensamblaje molecular lo hace adecuado como un vehículo para el suministro de fármacos y genes a células diana. Además, su resistencia a ambientes rigurosos tales como el ambiente ácido de algunos compartimentos celulares lo hace un conjugado excelente para su uso en biología celular.

En una realización adicional, el ensamblaje molecular se usa en inmunohistoquímica, por ejemplo para la localización de metales pesados en órganos y detección de proteínas en células de una sección tisular.

Ejemplo 1. Activación del agente quelante

15 Los grupos carboxilo del EDTA se convirtieron en primer lugar en grupos amina (Figura 1) con etilendiamina mediante la acción de EDC y N-hidroxisuccinimida (NHS) o en grupos tiol (Figura 2) con 2-mercaptoetilamina en presencia de EDC y NHS. Después de purificación en columna de afinidad de quelación de metales, el quelante tiolado se activa a continuación con Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato) y el quelante de NHS resultante se purifica por filtración en gel en Biogel P-2 (Figura 2). En otro experimento se permitió que los grupos amina del EDTA modificado reaccionara con Sulfo-SMCC para formar EDTA activado con maleimida sensible a ligandos que contienen tiol (Figura 3). Cualquiera de las mezclas de reacción contiene cantidades equimolares de cada reactivo. Este producto es estable durante años cuando se mantiene congelado en alícuotas.

Ejemplo 2. Acoplamiento de ligandos que contienen carbonilo con EDTA aminado.

25 Es necesario activar en primer lugar ligandos que contengan restos de azúcares tales como algunos receptores, hormonas y anticuerpos y también LPS. En un experimento se trata LPS con peryodato sódico 0,3 M en oscuridad durante 15 minutos. Este tratamiento da como resultado la creación de grupos aldehído en las moléculas de azúcares y por lo tanto facilita su conjugación con el quelante activado por amina a través de aminación reductora (Figura 4). Este producto es estable durante años cuando se mantiene congelado en alícuotas.

Ejemplo 3. Acoplamiento de ligandos que contienen tiol con EDTA activado por maleimida.

30 Los ligandos que contienen grupos tiol pueden acoplarse/conjugarse fácilmente con EDTA activado por maleimida (Figura 5). Esta química es adecuada para fragmentos Fab y (Fab')₂ de anticuerpos y también proteínas que contengan restos de cisteína. Pueden crearse fácilmente grupos tiol libres listos para reaccionar con maleimida-EDTA a partir de estos ligandos mediante la acción de ditioneitol (DTT) o cualquier agente reductor. Este producto es estable durante años cuando se mantiene congelado en alícuotas.

Ejemplo 4. Acoplamiento de ligandos que contienen amina con EDTA activado por NHS.

35 El éster de NHS reactivo creado en el EDTA puede reaccionar fácilmente con los grupos de amina libres en los ligandos, especialmente con los restos de lisina para formar un enlace covalente estable (Figura 6). Este producto es estable durante años cuando se mantiene congelado en alícuotas.

Ejemplo 5. Tratamiento de partículas de oro con cationes divalentes o trivalentes

40 Las cargas negativas netas que están presentes en las partículas de oro pueden usarse para acumular cationes adecuados en la superficie del oro. Se mostró que Mn²⁺ era compatible con el oro. En un experimento cuando se incubaron soles de oro con aminoácido lisina cargado positivamente radiactivo (¹⁴C-lisina) se conservó una cantidad sustancial de material radiactivo en las partículas de oro después de lavado exhaustivo de las partículas de oro por centrifugación. Sin embargo cuando se trataron partículas de oro con iones de manganeso antes de la adición de ¹⁴C-lisina, no pudo medirse ninguna radiactividad después de lavar el oro lo que indica que la superficie de oro estaba previamente ocupada con cationes. La concentración mínima de cationes divalentes requerida para este tratamiento, sin desestabilizar el oro, debe determinarse por valoración. En algunos experimentos se mostró que eran óptimos cationes divalentes 1-5 mM.

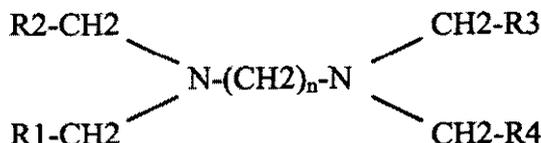
Ejemplo 6. Acoplamiento de ligandos con el agente quelante activado y su conjugación con oro.

50 Dializar una cantidad requerida de ligandos durante una noche contra tampón apropiado. Para anticuerpos y péptidos se recomienda un tampón de borato y fosfato a pH determinado óptimo. Para cada mililitro de soles de oro, premezclar aproximadamente 20 mM del quelante activado con aproximadamente 30 microgramos de los ligandos durante 15 minutos con agitación antes de añadirlos a los soles de oro (Figura 4- Figura 6). En paralelo tratar el sol de oro con la concentración óptima de manganeso como se ha descrito anteriormente. Añadir el complejo de

ligando-quelante a los soles de oro tratados muy lentamente con agitación fuerte (Figura 7). Después de 15 minutos de incubación, los soles de oro revestido se estabilizaron bloqueando los sitios no revestidos en los soles de oro mediante la adición de proteínas apropiadas o polímeros tales como albúmina de suero bovino, caseína, polivinil pirrolidona, alcohol polivinílico, para evitar aglomeración. Después se centrifugó la mezcla de reacción y se recogió el conjugado de oro (un precipitado suelto) del fondo del tubo y se purificó adicionalmente del exceso de ligando y agregado por centrifugación en gradiente de glicerol. Se agruparon las fracciones que contenían material no agregado como se determinó por microscopía electrónica y se resuspendieron en un tampón apropiado. Un tampón apropiado podría estar compuesto de un tampón como solución salina tamponada con fosfato, solución salina Tris, solución salina de borato con aditivos tales como sacarosa, trehalosa, glicerol, PVP, PVP y estabilizador proteico como BSA, caseína y diversos detergentes no iónicos y zwitteriónicos y conservantes como azida sódica o mertiolato.

REIVINDICACIONES

1. Ensamblaje molecular que comprende un ligando, un engarce y una entidad detectable, en el que el ligando está unido covalentemente al engarce, y el engarce es un agente quelante que forma un complejo de coordinación con la entidad detectable, **caracterizado porque** la entidad detectable comprende partículas de oro, y **porque** el agente quelante tiene la estructura química



- en la que R1, R2, R3, R4 pueden ser iguales o diferentes, en la que R1-R4 se seleccionan del grupo que consiste en -SH, -NH₂, -COOH, hidrocarburos C1-C20 que incluyen o se sustituyen con al menos un grupo funcional que comprende al menos un heteroátomo, y $n \geq 1$, **caracterizado** además porque el ligando se selecciona de un grupo de especies químicas que incluye proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos, en los que las partículas de oro tienen cationes divalentes unidos a ellas para mostrar de este modo sitios reactivos para formar un complejo de coordinación con el agente quelante.
2. Ensamblaje molecular de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** R1, R2, R3 y/o R4 es un heterociclo.
3. Ensamblaje molecular de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el heterociclo es N-hidroxisuccinimida éster.
4. Ensamblaje molecular de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el heterociclo es maleimida.
5. Un procedimiento para producir un ensamblaje molecular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado porque** el procedimiento comprende las etapas de:
- mezclar una alícuota de una solución que comprende un ligando con una alícuota de una solución que comprende un agente quelante activado, uniendo de este modo el ligando covalentemente con el agente quelante, formando de este modo un agente de unión
 - mezclar una alícuota de suspensión de partículas de oro con una alícuota de una solución que comprende cationes divalentes, para formar de este modo sitios reactivos adecuados para formar complejos de coordinación
 - mezclar una alícuota del agente de unión proporcionado en la etapa (i) con una alícuota de las partículas de oro que tienen cationes unidos a ellas producidas en la etapa (ii) formando de este modo el ensamblaje molecular en solución.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el procedimiento comprende además la etapa de bloquear sitios no revestidos en las partículas de oro, para evitar aglomeración de las partículas, a través de la adición de un compuesto adecuado.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** el compuesto es albúmina de suero bovino, caseína, polivinil pirrolidona y alcohol polivinílico.
8. Uso de un ensamblaje molecular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 como reactivo en un procedimiento para la detección de especies químicas y/o bioquímicas.
9. Uso de un ensamblaje molecular de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la especie química se selecciona de un grupo de especies químicas que incluye proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos.
10. Uso de un ensamblaje molecular de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la especie bioquímica se selecciona de un grupo de especies bioquímicas que incluye células, bacterias y partículas virales.
11. Un kit para la detección de especies químicas y/o bioquímicas, comprendiendo el kit un ensamblaje molecular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un dispositivo; comprendiendo el dispositivo un receptáculo para recibir el ensamblaje molecular, un receptáculo para recibir una muestra que comprende las especies para detectar, una zona de migración, y una zona de detección para detectar la interacción entre la especie y el ensamblaje molecular.
12. Un kit para la detección de especies químicas y/o bioquímicas de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la especie química se selecciona de un grupo de especies químicas que incluye proteínas, péptidos, anticuerpos o

fragmentos de anticuerpos, hormonas, antígenos solubles, carbohidratos, polisacáridos, ADN, ARN y lípidos; y en el que la especie bioquímica se selecciona de un grupo de especies bioquímicas que incluye células, bacterias y partículas virales.

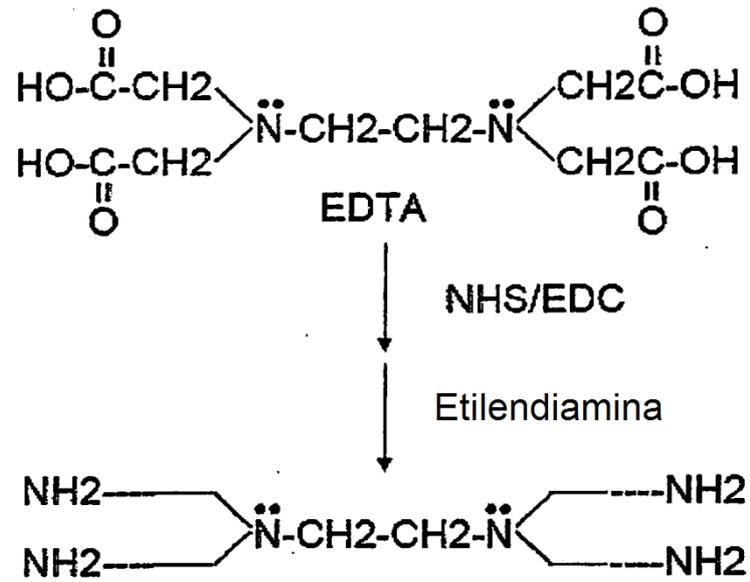


Fig. 1

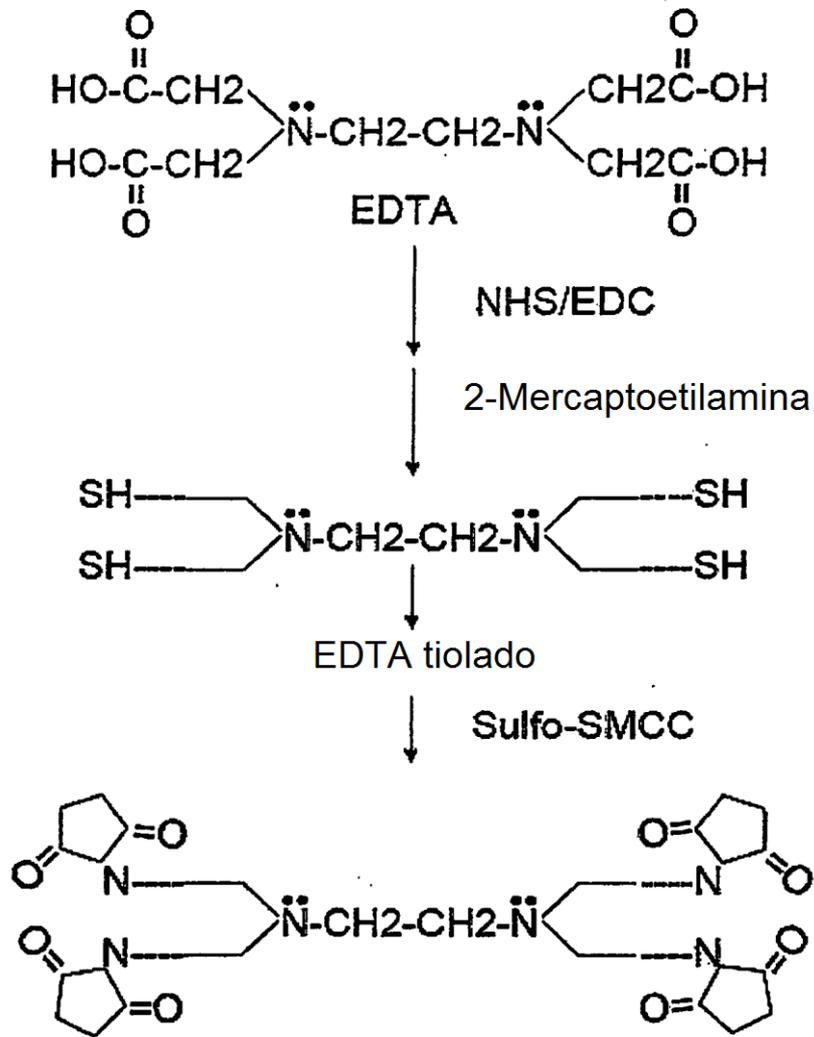


Fig. 2

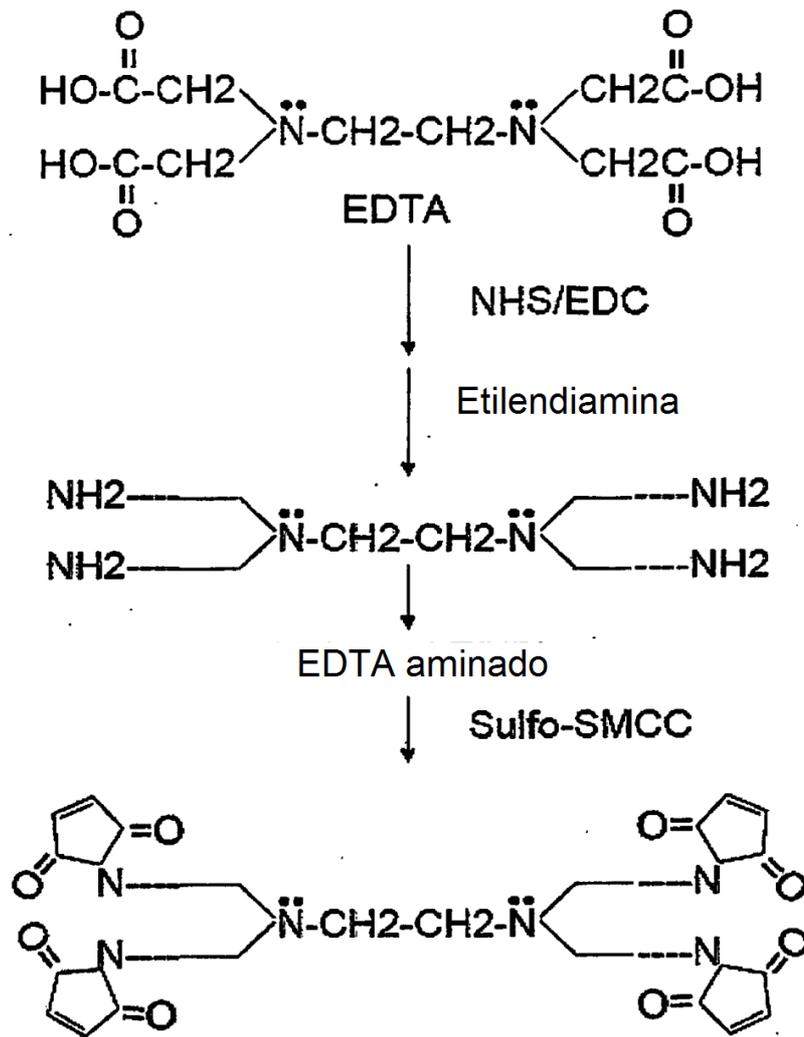


Fig. 3

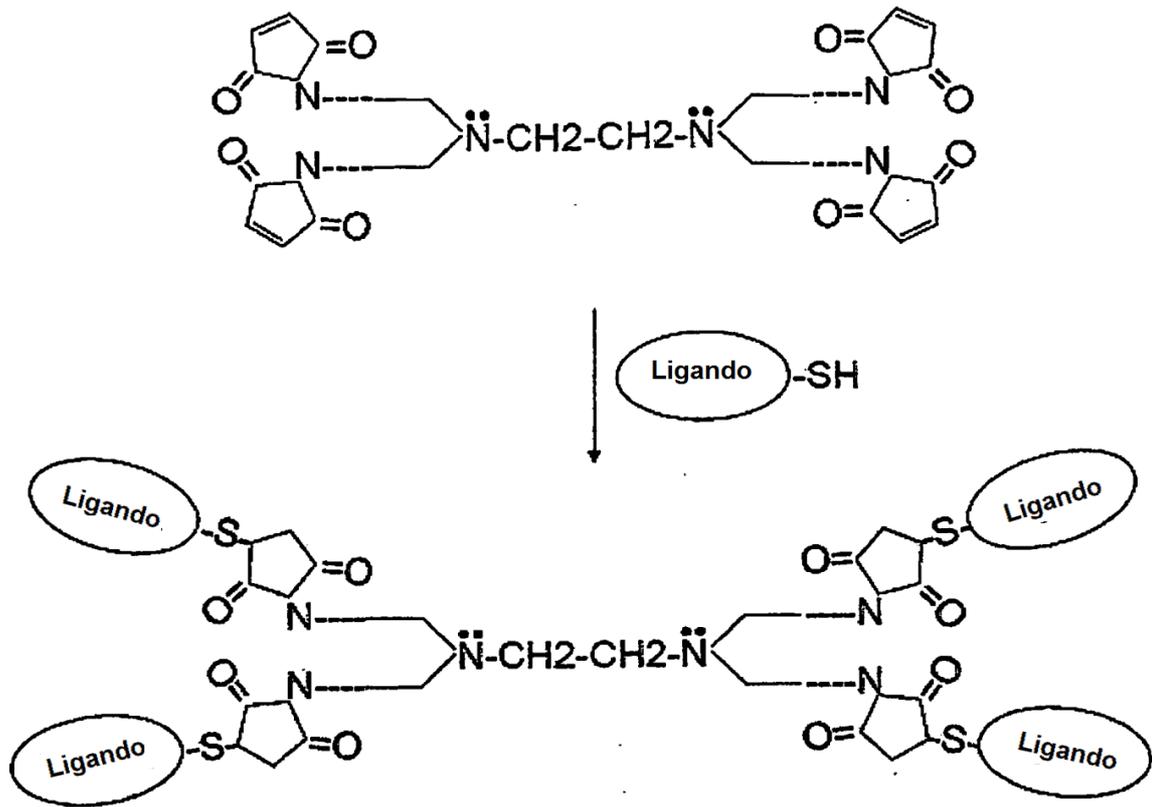


Fig. 5

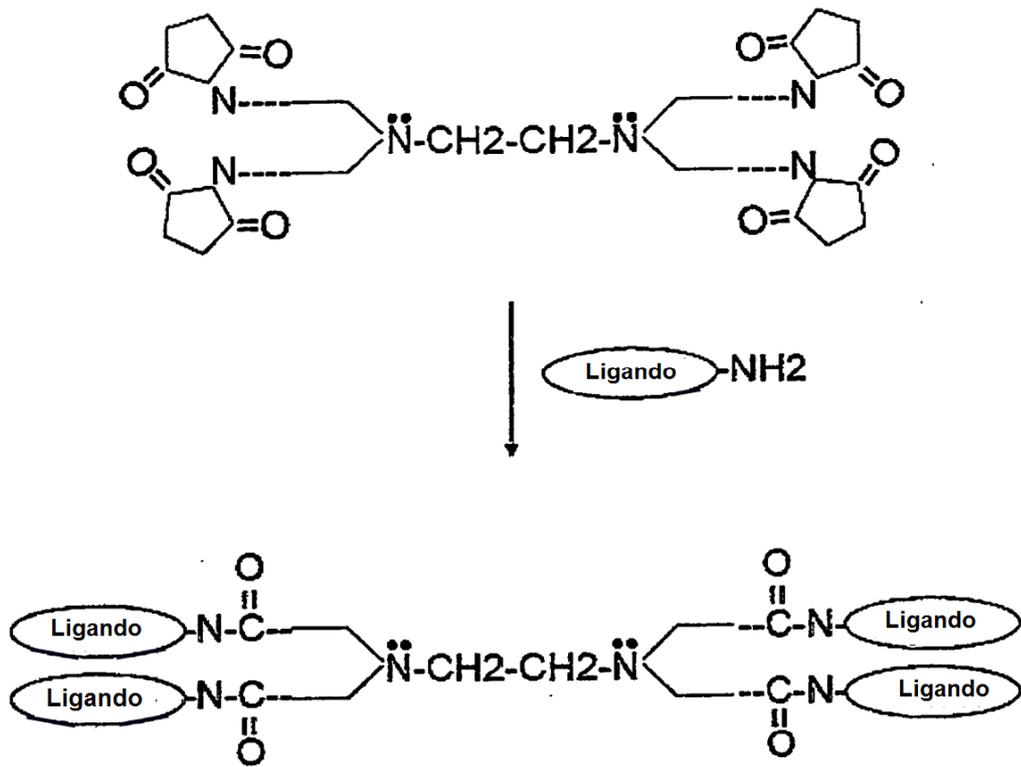


Fig. 6

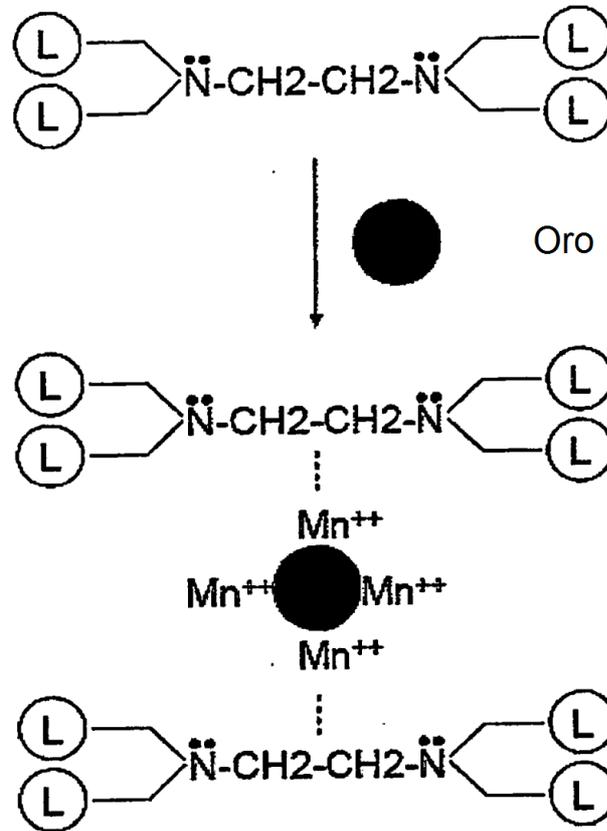


Fig. 7