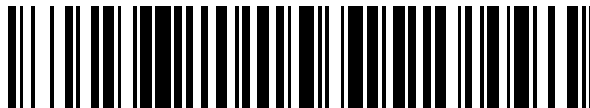


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 970**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010 E 10731777 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2440926**

54 Título: **Métodos de producción de microesferas de amplificación de señal**

30 Prioridad:

**10.06.2009 GB 0910010**

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

**13.02.2015**

73 Titular/es:

**SUPERNOVA DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
20271 Goldenrod Lane, Suite 2028  
Germantown, Maryland 20876, US**

72 Inventor/es:

**MAK, WING CHEUNG;  
WONG, LING WAI;  
CHAN, PUI YEE CANGEL y  
RENNEBERG, REINHARD**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

**ES 2 528 970 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**

Métodos de producción de microesferas de amplificación de señal.

5 La presente invención se refiere a los métodos de producción de microesferas de proteína que comprenden moléculas portadoras de la proteína. Estas microesferas de proteína son útiles en los ensayos biológicos *in vitro* para la detección de las especies objetivo en una muestra.

10 En la aplicación de las microesferas de proteína de la presente invención en el campo de los ensayos biológicos, las microesferas de proteína llevan en la superficie moléculas de afinidad para los reconocimientos específicos y vinculantes de moléculas objetivo en una muestra. Los ensayos biológicos tales como los inmunoensayos vinculados a enzimas (ELISA), los radioinmunoensayos (RIA), los ensayos de inmuno fluorescencia (FIA), los ensayos de inmuno aglutinación o los de ADN, ARN o los ensayos genómicos son bien conocidos y juegan un papel importante en la detección de los analitos en la investigación, en el ámbito de diagnóstico humano y veterinario, diagnosis forense, el análisis ambiental, el análisis alimentario y de detección para la defensa biológica de sustancias peligrosas en el aire o en el agua.

20 Los ensayos biológicos están basados en la interacción de por lo menos una biomolécula etiquetada con un analito (objetivo) que se pretende sea detectado. La etiqueta es el medio para "visualizar" la interacción. Son conocidas diversas clases de etiquetas y ellas dan sus nombres a las diferentes técnicas mencionadas: las enzimas en los ELISA, los isótopos del radio en los RIA, las fluoroforas en los FIA o las etiquetas específicas para las transferencias por adsorción (blots) Western, Southern o Northern. Otros tipos de etiqueta incluyen los liposomas, las partículas látex en los ensayos de inmuno aglutinación tales como los tintes, los mediadores, las partículas de oro.

25 Los requisitos más importantes para los ensayos biológicos son la especificidad analítica y la sensibilidad analítica. La especificidad analítica está determinada por las moléculas de afinidad o las moléculas de reconocimiento biológico, por ejemplo en el caso de acoplamiento del sitio de vinculación de un anticuerpo a su antígeno (analito) o la hibridación de dos filamentos complementarios de ácido nucleico. La sensibilidad analítica de un bioensayo está también influida por las moléculas de reconocimiento biológico debido a la constante de afinidad de su biointeracción con las especies objetivo. La etiqueta actúa como un marcador que indica que una reacción ha sido llevada a cabo entre el objetivo y la molécula de afinidad y puede ser medida con diferentes técnicas:

- 35 (i) Ópticamente, por la medición de la absorción de un tinte o la luz fluorescente emitida por fluoroforas o la luz luminiscente emitida por compuestos luminiscentes o quimioluminescentes o la medición de la turbidez causada por la dispersión de la luz de las partículas látex aglutinadas;
- (ii) Radiactivamente, por la medida de los radio isótopos;
- (iii) Electroquímicamente por la medida de mediadores o sustancias electro activas; o
- (iv) Magnéticamente por la medida de una fuerza magnética.
- 40 (v) Piezoeléctricamente por la medición de los cambios en la masa.

Los ensayo radio inmunes, utilizando radio isótopos como etiquetas, son todavía considerados por muchos como el método más sensitivo. Esta técnica muy potente fue introducida en 1959 por Yalow y Berson y representó una nueva era en la química analítica, en los diagnósticos y en medicina. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja que el riesgo de contaminación dañina de las personas y el medio ambiente no puede ser eliminado en su conjunto debido a los isotopos radioactivos utilizados.

Mientras tanto, han sido desarrollados y mejorados los métodos no-radiactivos con la intención de conseguir una sensibilidad analítica comparable. La importancia de los métodos ópticos basados en la fluorescencia, la luminiscencia y la absorción espectroscópica se ha fortalecido a lo largo del tiempo y continúa creciendo.

50 La tecnología ELISA utiliza enzimas como marcadores con la finalidad de amplificar la señal. Después de realizar el ensayo biológico, la biointeracción de analito y la sonda es amplificada mediante la producción de un elevado número de moléculas tinte por una molécula marcador de enzima. Las enzimas tales como la glucosa oxidasa (GOD, EC 1.1.3.4), la fosfatasa alcalina (AP, EC 3.1.3.1) o la peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) pueden ser utilizadas, con números de recambio de 2000 moléculas sustrato por segundo ( $s^{-1}$ ), 5000  $s^{-1}$  y 10000  $s^{-1}$ , respectivamente. Las desventajas de la técnica de la ELISA son el alto número de pasos involucrados en el procedimiento y el largo tiempo necesario para la incubación del sustrato.

60 Los métodos de fluorescencia han sido también empleados en los ensayos biológicos durante muchos años y continúan teniendo un alto interés. Todas las técnicas basadas en la fluorescencia aseguran una buena sensibilidad y un límite de detección bajo de  $10^{-8}$  a  $10^{-18}$  M. Las técnicas especiales, por ejemplo, el "tiempo de fluorescencia resuelta", las técnicas de quimio - y bioluminiscencia o las técnicas basadas en la transferencia de energía entre una molécula donante y una receptora pueden alcanzar los límites de detección de  $10^{-15}$  a  $10^{-18}$  M.

65 Los ensayos de inmunofluorescencia conocidos en la Técnica anterior utilizan etiquetas fluorescentes de bajo peso molecular con grupos de enlace funcionales reactivos (SOUTHWICKP. L., et al., Cytometry, 11, págs. 418-430,

1990, MUJUMDAR, R.B., et al., Bioconjugate Chemistry, 4, págs. 105-111, 1993, MUJUMDAR, R. B., et al., Cytometry, 10, pp. 11-19,1989), partículas coloreadas por tinte y las fluorescentes (US Patent nos. US 4.837.168 y U.S. 6.013.531 y solicitud de patente internacional núm. WO 95/08772) o los dendrímeros punzantes fluoróforos (DE 718 03 197).

5 También es conocido emplear los liposomas cargado-marcados para la amplificación de la señal en los ensayos inmunológicos (US Patent nos. US 5.756.362, U.S. 4.874.710 y US 4.703.017). En la práctica, la sensibilidad de estos métodos está limitada por la cantidad de sustancia marcadora que puede ser incorporada en los liposomas en forma solubilizada. Un inconveniente adicional de la utilización de liposomas etiquetados es la limitada estabilidad de los liposomas.

10 Como se mencionó más arriba, es importante conseguir una muy alta sensibilidad analítica en el desarrollo de los ensayos biológicos, definida como el grado de respuesta de la señal para un cierto cambio en la concentración de analito (la pendiente de la curva de calibración). En las determinaciones inmunológicas, indiferentemente de si son tipos de ensayos competitivos o sandwich, la sensibilidad analítica es dependiente del rango de concentración.

15 Otros dos factores que afectan en la sensibilidad analítica son la cantidad de muestra necesaria para la determinación y el tiempo total de reacción para el resultado. Cuanto mayor sea el volumen de la muestra y cuanto más largo el tiempo total aplicado a la reacción, menor será la concentración de analito que puede ser detectada y medida. Sin embargo, en muchas situaciones prácticas, no hay suficiente volumen de muestra disponible (por ejemplo, en la investigación farmacéutica) o el componente está distribuido en un volumen muy grande de muestra (por ejemplo, en los residuos de antibióticos en la leche o en una sustancia biodefensiva en el aire. Por lo tanto, un desafío clave es detectar o determinar cantidades muy pequeñas de sustancias en los volúmenes pequeños disponibles de muestra o detectar y / o determinar una sustancia distribuida en muy baja concentración en un volumen de muestra grande.

20 En consecuencia, la tecnología aplicada debe tener alta sensibilidad analítica, especialmente en los rangos muy bajos de concentración.

25 Con el fin de que puedan ser comparadas las sensibilidades analíticas de las diversas técnicas conocidas de manera objetiva, en rangos de concentración muy bajos, el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute y/o el NCCLS en los Estados Unidos) han definido la sensibilidad analítica con tres términos: Límite de Blank (LoB), Límite de detección (LoD) y Límite de Quantitation (Cuantificación) (LoQ). Los datos de estos parámetros son estimados y utilizados para las comparaciones entre las varias tecnologías.

30 Con el fin de conseguir altas sensibilidades analíticas, han sido desarrollados para efectuar la amplificación de la señal diferentes sistemas de bioetiquetado, tales como las bioetiquetas enzimas, bioetiquetas de micro cristal orgánicas y las etiquetas de oro coloidal, etc.

35 En los sistemas de bioetiqueta de enzima, las moléculas enzimáticas convierten los sustratos en productos con propiedades ópticas o electroquímicas. Debido a una tasa de alta rotación, tal como con la peroxidasa de rábano o debido a una muy grande reacción enzimática lineal, tal como con la fosfatasa alcalina, pueden ser generados enormes cantidades de producto (señal) con el fin de lograr la amplificación.

40 Otro enfoque es la técnica conocida como "enzima ciclante" para amplificar la detección de la señal que mejora la sensibilidad del ensayo.

45 En la solicitud de patente Europea publicada número EP 1309867 ha sido divulgada una nueva clase de etiqueta utilizando partículas sólidas de sustancias generadoras de señal. Billones de moléculas que generan señal presentes en cada partícula sólida pueden ser liberados inmediatamente una vez expuestas a un reactivo liberador para crear un " efecto Supernova".

50 El principio de la amplificación de señal de los sistemas de enzima está basado en la conversión de los sustratos enzimáticos para generar las señales que están siendo liberadas en la fase a granel. El principio de la amplificación de señal de sistemas de partícula sólida está basado en la generación y la liberación de un gran número de moléculas señal en la fase de granel en una cámara de reacción. Sin embargo, la liberación de las moléculas señal en la fase de granel da como resultado una dilución parcial de la concentración de la molécula señal y afecta a la sensibilidad analítica.

55 También es conocido un bioensayo de señal amplificada utilizando oro coloidal etiquetado. Taton et al (T. Andrew Taton, Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, "Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle probes", Science, 289(8) 1757-1760, 2000) informan de un método de amplificación de señal basado en oro coloidal seguido de mejora de plata, en el cual el oro coloidal promueve la reducción de la plata (I) en las superficies de la partícula de oro, lo que da como resultado la acumulación de una gran cantidad de metal de plata en la etiqueta de oro coloidal. El enfoque de mejora de plata puede detectar concentraciones de oligonucleótidos tan bajos como 5 nanomoles por litro.

Otro enfoque de la utilización de las etiquetas de oro coloidal para los ensayos biológicos amplificados se basa en agregación inducida del oro coloidal, que da como resultado en un cambio de color de rojo a azul que se puede observar a simple vista. El enfoque de la agregación inducida por la bioafinidad puede detectar oligonucleótidos en niveles de concentración de 10 femtomoles por litro. El principio de amplificación de señal de oro coloidal etiquetado está basado en la acumulación o en la agregación de moléculas señal en un volumen concentrado pequeño. Mediante la comparación de la capacidad de amplificación de señal de los sistemas de etiqueta mencionados más arriba, el sistema de amplificación de oro coloidal con acumulación de moléculas señal -fijado por otra molécula de afinidad- en un área enfocada en un portador sólido (por ejemplo, en los dispositivos de flujo lateral) puede alcanzar alta sensibilidad analítica.

La solicitud de patente Europea publicada número EP2014280 A1 divulga un método de producción de microesferas de proteína que incluye la mezcla de moléculas de proteína con un formador de matriz en solución, añadiendo un reagente de vinculación transversal a la mezcla, retirar el reagente de vinculación transversal y retirar la matriz utilizando un agente quelante de calcio con el fin de dejar las microesferas de moléculas de proteína.

La solicitud de patente de Estados Unidos publicada número US 2009/0104275 A1 divulga un método de producción de microesferas de proteína que incluye la mezcla de moléculas de proteína con un formador de matriz en solución, recubriendo las partículas formadas mediante el encapsulado capa por capa utilizando electrolitos y la retirada de la matriz utilizando un agente quelante de calcio o bajando el pH con el fin de dejar las moléculas de proteína en las cápsulas formadas por la técnica de capa por capa.

La presente invención proporciona un método de producción de microesferas de proteína tal y como está definido en la reivindicación 1.

## DEFINICIONES

### LAS MOLÉCULAS DE AFINIDAD Y RECONOCIMIENTO BIOLÓGICO

Las moléculas de afinidad son sustancias que reconocen y vinculan mediante su estructura o por sus tamaños de poro o mediante su carga eléctrica específicamente a otra sustancia, con un cierto poder de afinidad (constante afinidad/avidez).

Existen muchas moléculas de afinidad diferentes que, generalmente, pueden usarse con una cierta clase de sustancias (por ejemplo, la proteína A/G para anticuerpos IgG) o pueden ser muy específicos para una única sustancia (por ejemplo, un anticuerpo para un antígeno, una secuencia de ADN para otra secuencia, o la Avidina para la Biotina, ciertas enzimas para sus sustratos).

### LAS PROTEÍNAS PORTADORAS

Las proteínas portadoras están implicadas principalmente en la formación de microcápsulas similares a esponjas mediante la apertura de enlaces SS intracelulares y permitiendo entonces la formación de auto ensamblaje de ambos enlaces S-S inter- e intra-moleculares; siendo los enlaces S-S inter-moleculares responsables de la integridad estructural de las microesferas de proteína.

Los ejemplos de proteínas transportadoras que pueden ser usadas incluyen:

- Proteínas fibrosas (por ejemplo, citoesqueletal, proteínas de matriz extracelular, etc.)
- Proteínas globulares
- Proteínas de la sangre que pueden ser aisladas del suero y del plasma (por ejemplo, hemoproteínas, proteínas de transporte, proteínas vinculantes de ADN, etc.).
- Lipoproteínas
- Glicoproteínas
- Proteínas del sistema inmune (por ejemplo, anticuerpos mono- y policlonales, antígenos, etc.)
- Proteínas recombinantes
- Proteínas modificadas genéticamente
- Proteínas modificadas químicamente
- Proteínas sintéticas
- Mezclas de diversas proteínas
- Proteínas de nutrientes (por ejemplo, las proteínas de almacenamiento, proteínas de transporte, etc.)
- Enzimas
- Ribozimas

En general, pueden ser utilizadas cualquiera de las proteínas que contienen azufre de origen humano, animal y vegetal o péptidos que contienen azufre (incluyendo los péptidos sintéticos).

## LA AMPLIFICACIÓN DE SEÑAL

Cualquier reacción entre dos o más sustancias/ componentes de una reacción que conduce a una señal físico-química medible.

5 En muchos casos, la señal en las reacciones immunoquímicas y de hibridación es tan débil que debe ser realizada una amplificación de esta señal antes de que las mediciones conduzcan a resultados interpretables.

La amplificación puede ser realizada mediante diversas metodologías y tecnologías.

10 La presente invención proporciona tanto en un solo paso como en multi pasos un procedimiento de amplificación utilizando microesferas para la amplificación de la señal. En una variante del procedimiento de multi pasos de la amplificación, por lo menos un ciclo de la amplificación puede utilizar las cápsulas que encapsulan las partículas sólidas de las sustancias orgánicas que generan la señal y portan en su superficie moléculas de afinidad para el reconocimiento específico y vinculación a las moléculas objetivo, del tipo divulgado en la EP 1309867.

## LAS MICROESFERAS

20 Las microesferas producidas de acuerdo con el método de la presente invención no tienen un límite sólido y podrían compararse a una bola de esponja con los poros extendiéndose en su interior. Son una red de moléculas de proteína que se unen conjuntamente covalentemente.

25 Están formadas por adsorción vinculante o por coprecipitación en una plantilla recién precipitada y mediante la apertura de los enlaces S-S intra moleculares. Los grupos tiol libres resultantes entonces son permitidos formar nuevos enlaces S-S inter- e intra-moleculares, contribuyendo los enlaces S-S inter moleculares a la formación de la microesfera. Las microesferas tienen una estructura homogénea y no están divididas en capas como las cápsulas formadas por una técnica capa por capa de la manera como aquellas divulgadas en la EP 1309867.

30 Las microesferas tienen un diámetro entre 10nm y 1 mm, preferiblemente de 400 nm a 10 µm. Aunque esos límites caen, por lo menos en parte, fuera del rango micrométrico, el término "microesferas" será utilizado en este documento por conveniencia al referirse a las partículas discretas formadas de redes de moléculas de proteína de acuerdo con la presente invención.

## LAS MICROESFERAS DE AMPLIFICACIÓN DE SEÑAL

35 Las microesferas de amplificación de señal son microesferas que consisten en una proteína portadora + una molécula precursora de señal + una molécula de afinidad.

40 Tienen en su superficie características específicas de vinculación a una sustancia (objetivo o analito) que debe ser determinado.

## LOS FORMADORES DE MATRIZ

45 Los formadores de matriz son materiales tales como el carbonato de calcio, el alginato de calcio, la sílice porosa, los oligo- o los poli sacáridos tales como el dextrano, los cuales están mezclados con las proteínas portadoras y/o las moléculas precursoras de señal con el fin de formar plantillas de microesfera por co-precipitación.

## EL REACTIVO DE REDUCCIÓN

50 El reactivo reductor es un material que causa la apertura de los enlaces disulfuro intra moleculares dentro de las moléculas de proteína en la plantilla de la microesfera. Un ejemplo de un reactivo reductor es el ditiotreitól (DTT).

## EL REACTIVO DE RETIRADA DE LA MATRIZ

55 Los reactivos de retirada de la matriz son materiales tales como el agente quelante (EDTA), ácidos o bases que son utilizados para retirar el formador de matriz de la plantilla de la microesfera, dejando una microesfera de proteína.

## LAS MOLÉCULAS PRECURSORAS DE SEÑAL

60 Las moléculas precursoras de señal son moléculas que, cuando reaccionan con uno o más reactivos distintos, conducen a una señal medible. Las moléculas precursoras de señal pueden ser de un tipo directo o indirecto. En el caso de precursor directo de señal, las moléculas precursoras de señal cambian ellas mismas una vez realizada la activación con el fin de generar la señal para ser detectadas. En el caso de un precursor de señal indirecto, las moléculas precursoras de señal reaccionan con otras especies una vez realizada la activación y estas otras especies pueden ser las responsables de generar la señal para ser detectadas. Las moléculas precursoras de señal

pueden ser moléculas precursoras de señal de bajo peso molecular o moléculas precursoras de señal de alto peso molecular.

5 LAS MOLÉCULAS PRECURSORAS DE SEÑAL DE BAJO PESO MOLECULAR

Las moléculas precursoras de señal pueden ser sustancias de bajo peso molecular seleccionadas del grupo consistente de los fluoróforos y sus derivados, los luminóforos y sus derivados, los cromóforos y sus derivados, los grupos prostéticos o las sustancias activas redox seleccionadas de mediadores redox, las sustancias activas por electrodo.

10 LAS MOLÉCULAS PRECURSORAS DE SEÑAL DE ALTO PESO MOLECULAR

Las moléculas de proteína precursoras de señal, de alto peso molecular, incluyen, pero no se limitan a, las sustancias de de alto peso molecular seleccionadas del grupo consistente en las enzimas y sus precursores, las proteínas bioluminogénicas y fluorogénicas y los ribozimas; los péptidos o proteínas seleccionadas del grupo consistente en anticuerpos incluyendo los anticuerpos monoclonales y los policlonales, los receptores, los antígenos, las proteínas recombinantes, las lectinas, las avidinas, las lipoproteínas y las glicoproteínas, los ácidos nucleicos, las ribozimas y los aptámeros.

Existen muchas sustancias diferentes de diferentes clases químicas que conducen vía una reacción iniciada a una señal medible. La señal medible puede estar basada en:

- fluorimetría
- luminometría
- cambio de color en el rango ultravioleta, visible y cerca de infrarrojos
- 25 - cambio en el potencial redox
- cambio en la masa durante la formación de complejos o precipitación

LA MOLECULA OBJETIVO

30 Este término es sinónimo de "analito", que significa una sustancia o componente químico que es determinado en un procedimiento analítico, tal como un inmuno ensayo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35 La invención proporciona un método para hacer microesferas que comprende una proteína portadora vinculada con moléculas precursoras de señal, en donde las moléculas precursoras de señal son activables para generar una señal perceptible mientras se mantienen vinculadas con la proteína portadora.

40 Las microesferas pueden ser híbrido o hetero-partículas, mediante lo cual se entiende que la proteína portadora y las moléculas precursoras de la señal son diferentes. Alternativamente, las microesferas pueden ser homo-partículas, mediante lo cual se entiende que la proteína portadora y la precursora señal son la misma.

45 Tal y como se indicó más arriba, la moléculas precursoras de señal pueden ser de tipo directo o indirecto. En el caso de un precursor de señal directo, las propias moléculas precursoras de señal son cambiadas una vez realizada la activación con el fin de generar la señal para ser detectadas. En el caso de un precursor de señal indirecto, las moléculas precursoras de señal reaccionan con otras especies una vez realizada la activación y estas otras especies pueden generar la señal para ser detectadas.

50 Preferiblemente, la proteína portadora es seleccionada de proteínas fibrosas, incluyendo pero no limitándose a las proteínas citoesqueletales o las proteínas de matriz extracelular; o las proteínas globulares incluyendo, pero no limitándose a las proteínas de la sangre, las hemoproteínas, las proteínas de adhesión celular; o las proteínas de transporte, los factores de crecimiento, las proteínas receptoras, las proteínas vinculantes a ADN, las proteínas del sistema inmunológico, incluyendo pero no limitándose a los anticuerpos mono- o policlonales, las proteínas nutrientes de almacenamiento/transporte, las proteínas chaperonas o enzimas; o las proteínas genéticamente modificadas; o las proteínas recombinantes o la proteína químicamente modificada y las proteínas sintéticas. Más preferiblemente, la proteína portadora es una proteína que circula en la sangre, tal como la albúmina de suero bovino. Esta proteína es ampliamente utilizada en aplicaciones bioquímicas, incluyendo los ensayos ELISA y los ensayos inmunes de transferencia por adsorción. Tiene buena estabilidad y está disponible en grandes cantidades a bajo coste debido a que puede ser fácilmente purificada desde la sangre bovina, un subproducto de la industria de la ganadería.

60 Las moléculas precursoras de señal pueden ser sustancias de bajo peso molecular seleccionadas del grupo consistente en los fluoróforos y sus derivados, los luminóforos y sus derivados, los cromóforos y sus derivados, los grupos prostéticos o las sustancias redox activas seleccionadas de los mediadores redox, las sustancias activas por electrodo.

Preferiblemente, las moléculas precursoras de señal de bajo peso molecular son fluoróforos tales como las fluoresceínas, las cianinas, las carbocianinas, las rodaminas, los xantenos, las sustancias fluorescentes basadas en diazo tintes y pequeñas moléculas aromático fluorescentes y hetero aromáticas.

5 Alternativamente, las moléculas precursoras de señal de bajo peso molecular pueden ser cromóforos tales como la pirazolona, las antraquinonas, los carotinoides y diazo y monoazo, oxazina, añil o la riboflavina basada en sustancias tinte.

10 Más preferiblemente, las moléculas precursoras de señal de bajo peso molecular son los derivados de la fluoresceína tales como la fluoresceína diacetato (FDA), la fluoresceína diacetato isotiocianato (FDA- isotiocianato) o la fluoresceína maleimida (FDA-maleimida)

15 Las moléculas precursoras de señal de proteína de alto peso molecular incluyen, pero no se limitan a, las sustancias de alto peso molecular seleccionadas del grupo consistente en enzimas y sus precursores, las proteínas bioluminogénicas y fluorogénicas y las ribozimas; los péptidos o proteínas seleccionadas del grupo consistente en anticuerpos incluyendo los anticuerpos monoclonales y los policlonales, los receptores, los antígenos, las proteínas recombinantes, las lectinas, las avidinas, las lipoproteínas y las glicoproteínas, los ácidos nucleicos, las ribozimas y los aptámeros.

20 Preferiblemente, las moléculas precursoras de señal de alto peso molecular son moléculas de afinidad, tales como los péptidos y las proteínas y las cadenas de ácido nucleico, los hidratos de carbono, los ligandos con bajo peso molecular y los polímeros impresos moleculares (MIPs) o las mezclas de los mismos.

25 Alternativamente, las moléculas precursoras de señal de alto peso molecular pueden ser enzimas como la peroxidasa, la oxidoreductasa, la ligasa, la polimerasa y la transferasa.

Más preferiblemente, las moléculas precursoras de señal de alto peso molecular son la avidina y NeutrAvidin (Marca Registrada).

30 Las microesferas descritas anteriormente tienen dimensiones en la gama de 10 nm a 1 mm, preferiblemente en el rango de 400 nm hasta 10 µm. La estructura de las microesferas es preferiblemente sustancialmente homogénea; es decir, el material que forma las microesferas está sustancialmente uniformemente disperso y tienen una densidad sustancialmente uniforme y porosidad a través del cuerpo de las partículas.

35 Las microesferas se asemejan a las bolas de esponja o de algodón lana en miniatura y, aunque tienen un límite discernible, no son cápsulas que tienen un escudo sólido externo que define el límite.

40 Cuando las microesferas están combinadas con moléculas de afinidad para vincularse a un objetivo en la solución, esas moléculas de afinidad se unirán a las microesferas, Las microesferas están compuestas de moléculas de afinidad o las moléculas de afinidad pueden ser conjugadas o vinculadas directamente o a través de las moléculas del vinculador a la superficie de las microesferas o vinculadas/unidas por adsorción. Sin embargo, algunas moléculas de afinidad se difundirán en el interior de las microesferas y se unirán también allí en casos especiales. Por supuesto, el alcance de tal difusión dependerá del tamaño relativo de las moléculas de afinidad y los tamaños de poro de las microesferas.

45 Las moléculas de afinidad unidas a la microesferas pueden ser moléculas de bio reconocimiento tales como los péptidos específicos y las proteínas, las cadenas de ácidos nucleicos, los hidratos de carbono, los ligantes con bajo peso molecular y los polímeros impresos molecularmente (MIPs) o las mezclas de los mismos.

50 Los péptidos o las proteínas pueden ser anticuerpos incluyendo los anticuerpos monoclonales y policlonales, los receptores, los antígenos, las lectinas, las avidinas, los oligopéptidos, las lipoproteínas, las glicoproteínas, las hormonas peptídicas y los alérgenos o partes de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, los oligonucleótidos, las ribozimas, los aptámeros y las partes de los mismos. Los ejemplos de carbohidratos incluyen mono-, oligo- y polisacáridos, los glicolípidos, los proteo-polisacáridos y partes de los mismos. Los ligandos de bajo peso molecular pueden ser biotina o derivados de la biotina, los esteroides u hormonas, los cofactores o coenzimas, los activadores, los inhibidores, los pseudosustratos o los grupos prostéticos de enzimas, los fármacos, los alérgenos o los haptenos.

60 El método de producir microesferas tal como está definido en este documento comprende: mezclar la proteína portadora y las moléculas precursoras de señal con un formador de matriz en solución, preferiblemente solución acuosa, mediante la agitación; añadir una pequeña molécula del reactivo de reducción con agitación; lavar con el fin de retirar la pequeña molécula del reactivo de reducción; añadir un reactivo para retirar el formador de matriz con agitación; y lavar con el fin de retirar el formador de matriz y dejar las microesferas de la proteína portadora vinculadas con las moléculas precursoras de la señal.

65

Preferiblemente, el método se lleva a cabo en una solución acuosa con reactivos acuosos, preferiblemente a temperatura ambiente. El método preferente de mezcla es la agitación con un agitador magnético.

5 La función del formador de matriz es atrapar las moléculas de proteína en una plantilla de microesferas. El formador de matriz es seleccionado de carbonato de calcio, alginato de calcio, sílice porosa o un oligo- o un polisacárido tal como dextrano. El carbonato de calcio es preferiblemente formado mediante la adición de solución de carbonato sódico a una mezcla de proteína portadora, las moléculas precursoras de la señal y cloruro de calcio en una solución.

10 El tamaño de las microesferas puede ser controlado mediante el control de la velocidad de agitación. La densidad de las microesferas puede ser controlada ajustando las proporciones relativas de la proteína portadora, las moléculas precursora de señal, el formador de la matriz y el reactivo reductor.

15 El método de producir la microesferas puede además comprender la unión de las moléculas de afinidad a la superficie de las microesferas. Las moléculas de afinidad pueden ser conjugadas a la superficie externa de las microesferas, por ejemplo mediante fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas o pueden ser vinculadas covalentemente a la superficie exterior de las microesferas ya sea directamente o a través de moléculas vinculadoras. Si son indirectamente enlazadas, las moléculas vinculadoras incluyen, pero no se limitan a, las biomoléculas, por ejemplo la avidina, la estreptavidina, la NeutrAvidin (Marca Registrada), la proteína A, la proteína G, las lectinas o los vinculadores cruzados de bajo peso molecular. Las moléculas de afinidad pueden ser añadidas a la mezcla de la reacción antes del paso de la adición del reactivo de retirada de la matriz.

20 Una forma particularmente preferida para las microesferas es una en el cual la proteína portadora es suero de albumina bovina (BSA) y las moléculas precursoras de señal están seleccionadas de fluoresceína diacetato (FDA), fluoresceína diacetato isotiocianato (FDA-isotiocianato) o fluoresceína diacetato maleimida (FDA-maleimida). Un reactivo desarrollante es conveniente para la "activación" de estos derivados de la fluoresceína en un paso de la activación, convirtiéndolos en fluoresceína, por ejemplo, mediante reacción química, por ejemplo con reactivo alcalino o una reacción bioquímica, por ejemplo esterasa, generando de esta manera una señal detectable. Alternativamente, la activación puede ser llevada a cabo por medios físicos tal como el calentamiento con microondas.

25 Los reactivos químicos liberadores utilizados para desunir las microesferas y desbloquear la moléculas precursoras de señal pueden ser reactivos de reducción de molécula pequeña los cuales son efectivos para romper los enlaces azufre-azufre (intermoleculares e intramoleculares) en las microesferas. El ditioneitol (DTT) es un reactivo liberador especialmente recomendado. La desunión de las microesferas también puede ser conseguido a través de la sonicación, alta temperatura, la radiación de la luz o por cambio de pH.

Ahora se describirá la invención a manera de ejemplo sólo con referencia a los dibujos, en los cual:

40 La figura 1 es un diagrama que ilustra la técnica para la fabricación de las microesferas de acuerdo con la invención;  
La figura 2 es una micrografía de contraste de fase de microesferas de proteína de acuerdo con el primer aspecto de la invención,  
45 La figura 3 muestra imágenes escaneadas del microscopio electrónico de microesferas de proteína con diferente porosidad; las imágenes de la fila de arriba muestran un aumento de 22.000 y las imágenes de la fila inferior muestran un aumento de 150.000;  
La figura 4 es un diagrama que muestra el principio de trabajo de la acumulación y la localización de la señal un bioensayo de sándwich.

50 Refiriéndose en primer lugar a la figura 1, la vista (a) muestra un primer recipiente 100 que contiene una solución mixta de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), proteína portadora y moléculas precursoras de señal y un segundo recipiente 200 que contiene un solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). El contenido de los dos recipientes es mezclado rápidamente para que las moléculas de proteína y las precursoras de señal, por ejemplo las BSA-FDA, queden atrapadas en las plantillas soporte de microesferas de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) 300 por co-precipitación.

55 La vista (b) ilustra lo que ocurre en los pasos siguientes. Las plantillas de microesferas de  $\text{CaCO}_3$  300 con la proteína atrapada y las moléculas precursoras de señal son tratadas con un reactivo reductor, ditioneitol (DTT), que causa la apertura de los enlaces de disulfuro intra moleculares dentro de las moléculas de proteína. Entonces, el DTT es retirado en un número de repetidos pasos de lavado. Nuevos enlaces de disulfuro inter-moleculares e intra moleculares son formados entre las moléculas de proteína. Los nuevamente formados enlaces disulfuro intermoleculares contribuyen a la organización de las moléculas de proteína en las microesferas 20 que contienen también las moléculas precursoras de señal. El material de plantilla de  $\text{CaCO}_3$  es retirado, dejando las moléculas de proteína/ precursoras señal de las microesferas 20 sin la necesidad de la utilización de reticulantes químicos.

65 Volviendo ahora a la figura 2, esta es una micrográfica de contraste de fase de las microesferas de proteína producidas de acuerdo con el procedimiento de más arriba. Muestran una uniformidad de buen tamaño con



pequeña desviación de un promedio. También es importante que las microesferas porten la misma carga de superficie de tal manera que no se peguen juntas. En la figura se muestra claramente la ausencia de pegado conjunto. Además, una distribución de tamaño estrecha es importante para el análisis cuantitativo.

5 La figura 3 muestra micrografías de escaneado con microscopio electrónico SEM de microesferas BSA (albumina de suero bovino) preparadas utilizando concentraciones de DTT que varían desde 0,01 a 1 mM durante un período de 15 a 60 minutos. Las microesferas resultantes fueron similares en el diámetro, la rugosidad de la superficie y el tamaño de los poros de la microesferas incrementándose con la disminución de la concentración de DTT.

10 Una más alta concentración de DTT dio lugar a un mas alto grado de rotura de enlaces de disulfuro intra moleculares dentro de las moléculas BSA, es decir, aumentaron el número de grupos de tiol libres dentro de las moléculas de proteína. Después de la retirada mediante lavado del DTT (fueron utilizados repetidos pasos de lavado), los grupos tiol libres dentro de las moléculas de BSA se auto juntaron para formar nuevos enlaces de disulfuro inter- e intra moleculares, contribuyendo los enlaces de disulfuro inter moleculares a la formación de microesferas de proteína que sobrevivieron después de la retirada de la plantilla de carbonato de calcio.

15 Las microesferas fabricadas utilizando una concentración baja de TDT contienen menos enlaces disulfuros inter moleculares y son por lo tanto más porosas.

20 Volviendo ahora a la figura 4, esta es un diagrama esquemático que muestra el principio de funcionamiento de la acumulación y de la localización de señal en un bioensayo sándwich usando las microesferas de la presente invención.

25 En la vista (a), se muestra un soporte sólido 10 que tiene las moléculas de afinidad 50 en su superficie. La microesfera 20 está representada aquí como un círculo ligeramente aplastado que contiene las proteínas portadoras 30 vinculadas a moléculas precursoras de la señal 40. Debe tenerse en cuenta que este es un diagrama esquemático y a la microesfera se le ha dado un borde sólido para propósitos solamente de ilustración. Además, las líneas de enlace S-S entre las moléculas portadoras de proteína (y los enlaces entre las moléculas portadora de proteína y las moléculas precursoras de señal) se han omitido para mayor claridad. En realidad, la microesfera no es una cápsula con un límite sólido; por el contrario, es como una bola de esponja en miniatura con poros extendiéndose en su interior y estando formada por una distribución uniforme de las moléculas de proteína portadoras y las moléculas precursoras de señal enlazadas las unas con las otras.

35 La microesfera 20 tiene las moléculas de afinidad 50 unidas a su superficie.

Intercalada entre una de los moléculas de afinidad 50 en el soporte sólido 10 y una de las moléculas de afinidad 50 en la microesfera está una molécula objetivo o analito, 60. El soporte sólido puede ser una membrana, un pocillo de una placa de microtitulación, una tira magnética o, más generalmente, cualquiera de las plataformas de fase sólida que son utilizadas en ensayos inmunológicos o de hibridación.

40 En la vista (b), la misma microesfera 20 se muestra todavía unida al soporte sólido 10 mediante el "sándwich" de la molécula objetivo 60 entre dos moléculas de afinidad 50. Sin embargo, en esta vista, la microesfera 20 está mostrada después del tratamiento con un reactivo desarrollante y tiene ahora las moléculas de señal 40\* representadas por los símbolos de soles en miniatura, donde previamente tenía moléculas precursoras de señal 40 representadas por diamantes.

Representada de manera simple, la Figura 4(a) muestra la microesfera apagada, mientras que la Figura 4(b) muestra la microesfera iluminada.

50 Solamente para los propósitos de ilustración, la Figura 4 muestra el mismo tipo de molécula de afinidad 50 en el soporte solido 10 y en la superficie de la microesfera 20. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones prácticas, las dos moléculas de afinidad no serían la misma excepto cuando se utilizan anticuerpos policlonales o si el analito objetivo tiene epítomos repetitivos.

55 En la práctica, muchas bioetiquetas de microesferas serán enlazadas específicamente a los analitos objetivo en un bioensayo, dependiendo del tamaño de la molécula del analito (objetivo) y en el tamaño de las microesferas. En un ensayo inmunológico, una bioetiqueta de microesfera enlazará específicamente al epítomo de una molécula objetivo antígeno; en un ensayo de hibridación, una bioetiqueta de microesfera enlazará a un analito objetivo de secuencia específica de ADN.

60 Una vez realizada la adición de un reactivo desarrollante, millones de moléculas precursoras generadoras de señal dentro de las bioetiquetas se convertirán a moléculas altamente fluorescentes y el bioetiquetas se iluminarán y producirán una señal localizada.

65 La invención será ahora descrita particularmente con referencia a varios ejemplos, aunque debe ser entendido que éstos son no limitantes.

**Ejemplo 1:****Preparación de Microesferas BSA-FDA****Paso 1: Formación de un marco de BSA**

Una solución de de BSA (10 mg/mL) en cloruro de calcio (0,5 mol/L) fue rápidamente mezclada con una solución de carbonato de sodio (0,5 mol/L).

Se formó carbonato de calcio y siendo solo ligeramente soluble, atrapó el BSA en el núcleo/interior de la matriz de carbonato de calcio. El carbonato de calcio sirvió como una plantilla para el atrapamiento del BSA.

El siguiente paso fue la apertura de los enlaces S-S de BSA intramoleculares y la formación de nuevos enlaces S-S intermoleculares de BSA.

Cada paso incluyó varios ciclos de lavado y centrifugación.

Las microesferas resultantes de carbonato de calcio cargadas de BSA fueron incubadas con soluciones de ditioneitol (DTT) con concentraciones que oscilan desde 0,01 a 1 mM con pH 7,5 durante 15-60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las microesferas de carbonato de calcio cargadas de BSA fueron lavadas cinco veces con un tampón (pH 7,4) mediante centrifugación (2000 rpm, 2 minutos) y ciclos de re-dispersión.

La adición del DTT causó la reducción/rotura de los enlaces azufre-azufre intramoleculares en el BSA mientras que la retirada del DTT en estos pasos lavado condujo a la formación de nuevos enlaces azufre-azufre intramoleculares y intermoleculares entre las moléculas de BSA para mantener junta la proteína y formar las microesferas.

**Paso 2: Enlace de moléculas de señal al marco-matriz BSA**

A las microesferas que contenían carbonato de calcio re-suspendido fue añadido fluoresceína diacetato 5-isotiocianato (1 mg/mL) y la mezcla de la reacción fue incubada durante una hora a temperatura ambiente formando enlaces covalentes entre grupos amino BSA y el tiocianato de fluoresceína diacetato.

**Paso 3: Funcionalización de las microesferas de BSA-FDA**

El enlace de los anticuerpos de Cabra-Anti-Ratón para microesferas que portan las moléculas de señal fue realizado utilizando la química EDC/NHS. (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida ester)

**Paso 3.1: Preparación de una solución de las moléculas de afinidad**

Una solución que contenía Cabra-Anti-Ratón IgG (0,2 mg/mL) fue añadida a 2 mM y 5 mM respectivamente de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) en pH 7,4. Se permitió reaccionar la solución durante 15 minutos a temperatura ambiente con batido.

**Paso 3.2: Funcionalización de microesferas con anticuerpo**

Después de los 15 minutos de incubación, una solución de las moléculas de afinidad activadas mediante enlace Cabra-Anti-Ratón IgG fue añadida a una suspensión prelavada de microesferas BSA-FDA y la mezcla fue reaccionada durante 2 horas a temperatura ambiente con batido. La solución de las moléculas de afinidad enlazada a las microesferas BSA-FDA fue centrifugada a 1800 rpm durante 2 minutos.

El sobrenadante fue retirado y el pellet fue reconstituido mediante 2 mL del tampón MES (pH 7,4). Las microesferas BSA-FDA funcionalizadas con moléculas de afinidad fueron lavadas 3 veces con tampón MES (pH 7,4) y re-suspendidas en 2 mL de tampón MES (pH 7,4).

**Paso 4: Retirada de la plantilla de carbonato de calcio**

Entonces, fueron añadidos 10 mL de EDTA (ácido etil diaminotetraacético) de 0,2 M a la suspensión de microesferas BSA-FDA y el conjunto completo fue agitado durante cinco minutos. El tratamiento de EDTA retiró la matriz de carbonato de calcio de las microesferas. Entonces, la reacción de la mezcla fue sometida a centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Fue retirado el sobrenadante y pellet de microesferas anticuerpo funcionalizadas BSA-FDA fue re-suspendido en 2 mL de tampón MES (pH 7,4).

**Ejemplo 2:****Formación de un marco de BSA utilizando un formador de matriz de alginato de calcio**

Una solución de BSA (10 mg/mL) en cloruro de calcio (0,5 mol/L) fue mezclada rápidamente con una solución de alginato de sodio (0,5 mol/L).

5 Se formó alginato de calcio y siendo solo ligeramente soluble, atrapó el BSA en el núcleo/interior de la matriz de carbonato de calcio. El alginato de calcio sirvió como una plantilla para el atrapamiento de BSA.

El siguiente paso fue la apertura de los enlaces S-S de BSA intramoleculares y la formación de nuevos enlaces intermoleculares S-S de BSA.

10

Cada paso incluyó varios ciclos de lavado y centrifugación.

Las microesferas resultantes de alginato de calcio cargadas de BSA fueron incubadas con soluciones de ditioneitol (DTT) con concentraciones que oscilaban desde 0,01 hasta 1 mM con pH 7,5 durante 15-60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las microesferas de alginato de calcio cargadas de BSA fueron lavadas cinco veces con tampón (pH 7,4) mediante centrifugación (2000 rpm, 2 minutos) y ciclos de re-dispersión.

15

La adición de DTT causó la reducción/rotura de los enlaces azufre-azufre intramoleculares en el BSA mientras que la retirada del DTT en estos pasos de lavado condujo a la formación de nuevos enlaces azufre-azufre intramoleculares e intermoleculares entre las moléculas de BSA para mantener junta la proteína y formar las microesferas.

20

### **Ejemplo 3:**

#### **Preparación de microesferas de Avidina**

El ejemplo 3 es un ejemplo en el cual la proteína portadora y la molécula de afinidad vinculante son una y la misma molécula.

#### **Paso 1: Formación de un marco de avidina**

30

Una solución de avidina (10 mg/mL) en cloruro de calcio (0,5 mol/L) fue mezclada rápidamente con una solución de carbonato de sodio (0,5 mol/L).

35 Se formó carbonato de calcio y, siendo solo ligeramente soluble, precipitó y atrajo/adsorbió avidina en su superficie formada de cristal. El carbonato de calcio sirvió como una plantilla para la precipitación de avidina.

El siguiente paso fue el entrecruzamiento de avidina mediante la apertura de sus enlaces S-S intramoleculares y la formación de enlaces S-S intermolecular en la avidina.

40

Cada paso incluyó varios ciclos de lavado y centrifugación.

Las microesferas resultante de carbonato de calcio cargadas de avidina se incubaron con soluciones de ditioneitol (DTT) con concentraciones que van desde 0,01 a 1 mM en pH 7,5 durante 15-60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las microesferas de carbonato de calcio –cargadas de avidina fueron lavadas cinco veces con tampón (pH 7,4) mediante centrifugación (2000 rpm, 2 minutos) y ciclos de re-dispersión.

45

La adición de DTT causó la reducción/rotura de los enlaces azufre-azufre intramoleculares en la avidina mientras la retirada de DTT en estos pasos de lavado condujo a la formación de enlaces azufre-azufre intramoleculares e intermoleculares entre las moléculas de avidina para mantener junta la proteína y formar las microesferas. Los enlaces reducidos SH (sulfhidril) en la proteína se someten a la propia formación de ensamblaje de nuevos enlaces de azufre-azufre intramoleculares e intermoleculares.

50

#### **Paso 2: Funcionalización de las moléculas señal**

55

Esto se logra mediante la vinculación de moléculas de detección específicas (moléculas de afinidad) a la avidina que contiene grupos amino libre, SH y grupos carboxilo para la vinculación covalente de las moléculas de afinidad a las microesferas aún sin las moléculas de afinidad vinculantes.

60 Véase el Ejemplo 2 de más arriba para más detalles del procedimiento de funcionalización para microesferas que contienen avidina.

El procedimiento de funcionalización es más sencillo con Streptavidina o una avidina desglucosilada tal como NeutrAvidin (marca comercial) porque éstas se vinculan directamente a la molécula objetivo reconocedora (analito), es decir, a la molécula de afinidad. Si son utilizadas Streptavidina o NeutrAvidin (marca registrada) entonces normalmente las moléculas de afinidad biotiniladas como por ejemplo, los anticuerpos biotinilados son vinculadas

65

directamente a la Streptavidina o NeutrAvidin (marca comercial) por el poder de fuerte vinculación de las Streptavidinas a la biotina ( $K$  alrededor de  $10^{16}$ ). Por lo tanto, no es necesaria la conjugación química por ejemplo con EDC/NHS.

**5 Paso 3: Disolución del carbonato de calcio fuera de las microesferas**

Esto fue realizado mediante la adición de EDTA (0,2 mol/L) a una suspensión de las microesferas de avidina. Después de este procedimiento, las microesferas de avidina precursoras de señal han sido preparadas:

- 10 Téngase en cuenta que, como en el Ejemplo 1 de más arriba, el paso de retirar la plantilla de carbonato de calcio puede ser llevado a cabo antes del paso de la funcionalización.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producir microesferas de proteína que comprende:
- 5 La mezcla de moléculas de proteína con un formador de matriz en una solución;  
 La adición de un reactivo reductor a la mezcla  
 La retirada del reagente de reducción, y  
 La retirada de la matriz dejando microesferas de moléculas de proteína;
- 10 En donde se selecciona el formador de la matriz de carbonato de calcio, de alginato de calcio, de sílice porosa y de oligo- o polisacárido.
2. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la matriz es retirada por medios físicos seleccionados de tratamiento por alta temperatura o cambio de pH.
- 15 3. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el paso de retirada de la matriz incluye la adición de un agente para la retirada de la matriz seleccionado de un agente quelante, EDTA, un ácido o una base.
4. Un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el reactivo de reducción es ditioneitol (DTT).
- 20 5. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el formador de matriz es el carbonato de calcio formado por adición de una solución de carbonato de sodio a una mezcla de proteína y cloruro de calcio en una solución.
- 25 6. Un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde dichas moléculas de proteína son moléculas de afinidad por vinculación a un objetivo en solución.
- 30 7. Un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde dicha proteína es una proteína portadora y en donde dicho método comprende además la vinculación de las moléculas precursoras de señal a dicha proteína portadora.
8. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 7 en donde se selecciona la proteína portadora de proteínas fibrosas, de proteínas citoesqueléticas o de proteínas de matriz extracelular; o de proteínas globulares, de proteínas de la sangre, de hemoproteínas, de proteínas de adhesión celular o de proteínas de transporte, de factores de crecimiento, de proteínas receptoras, de proteínas de vinculación a ADN, de proteínas del sistema inmunitario, de anticuerpos mono- o policlonales, de proteínas de almacenamiento/transporte nutrientes, de proteínas chaperonas o enzimas; o de proteínas genéticamente modificadas; o de proteínas recombinantes o de proteínas químicamente modificadas. y de proteínas sintéticas.
- 35 9. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 8 en donde dicha proteína portadora es albumina de suero bovino.
- 40 10. Un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en donde las moléculas precursoras de señal son sustancias de bajo peso molecular seleccionadas del grupo consistente de
- 45 (i) fluoróforos seleccionado del grupo consistente de fluoresceínas, cianinas, carbocianinas, rodaminas, xantenos, sustancias fluorescentes basadas en diazo tinte y moléculas pequeñas fluorescentes aromáticas y heteroaromáticas;
- 50 (ii) luminóforos y sus derivados;
- (iii) cromóforos seleccionados del grupo consistente de la cianina, pirazolona, antraquinona, carbocianina, rodamina, xanteno, carotinoide y diazo- y monoazo, oxazina, añil, o sustancias de tinte basadas en la riboflavina;
- (iv) sustratos enzimáticos;
- 55 (v) grupos prostéticos, o
- (vi) sustancias redox activas seleccionadas de mediadores redox, sustancias activas por electrodo;
- o sustancias de alto peso molecular seleccionadas del grupo que consiste en:
- 60 (vii) las enzimas y sus precursores;
- (viii) proteínas bioluminogénicas y fluorogénicas;
- (ix) ácidos nucleicos;
- (x) ribozimas y
- 65 (xi) aptámeros.

11. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 10 en donde las moléculas precursoras de señal son fluoróforos seleccionados de fluoresceína diacetato (FDA), de fluoresceína diacetateisotiocianato (FDA-isotiocianato) y de fluoresceína maleimida (FDA-maleimida).
- 5 12. Un método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 que además comprende el paso de la vinculación de las moléculas de afinidad a la superficie de la microesferas.
- 10 13. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 12 que comprende la conjugación o enlace de las moléculas de afinidad a las microesferas vía moléculas del vinculador seleccionadas del grupo consistente de la avidina, estreptavidina, avidina desglicosilada, proteína A, proteína G, lectina o vinculadores transversales de bajo peso molecular.
- 15 14. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 6, la reivindicación 12 o la reivindicación 13 en donde las moléculas de afinidad son moléculas de bioreconocimiento.
- 20 15. Un método tal como se reivindica en la reivindicación 14 donde se seleccionan las moléculas de afinidad del grupo que consiste de:
- (i) Los péptidos y proteínas seleccionadas del grupo consistente de anticuerpos incluyendo los anticuerpos monoclonales y los policlonales, los receptores, los antígenos, las proteínas recombinantes, las lectinas, las avidinas, los oligopéptidos, las lipoproteínas, las glicoproteínas, las hormonas peptídicas y los alérgenos o partes de los mismos;
  - (ii) Los ácidos nucleicos seleccionados del grupo consistente de ADN, ARN, los oligonucleótidos, las ribozimas, los aptámeros y partes de los mismos;
  - 25 (iii) Los carbohidratos seleccionados del grupo consistente de los mono-, oligo- y polisacáridos, los glicolípidos, los proteo-polisacáridos y partes de los mismos;
  - (iv) Los ligandos con bajo peso molecular seleccionados de la biotina o derivados de la biotina, los esteroides, las hormonas, los cofactores o las coenzimas, los activadores, los inhibidores, los pseudosustratos o los grupos prostéticos de las enzimas, los fármacos, los alérgenos o los haptenos, y
  - 30 (v) polímeros impresos moleculares (MIPs) o mezclas de los mismos.

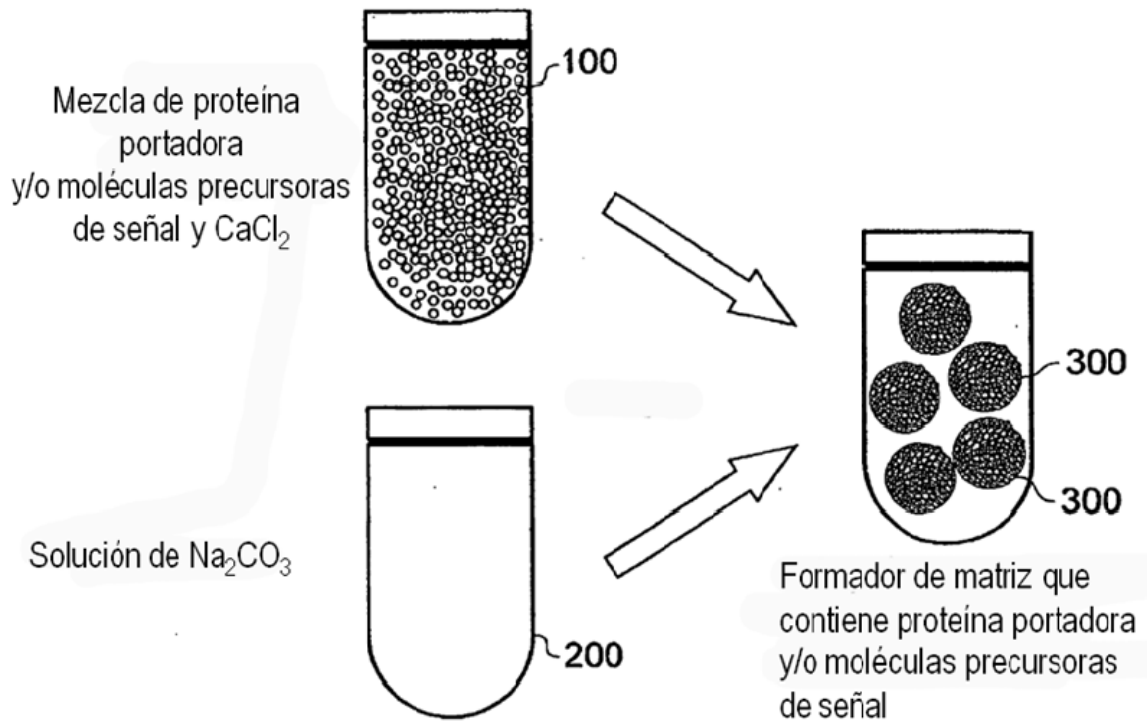


FIG. 1a

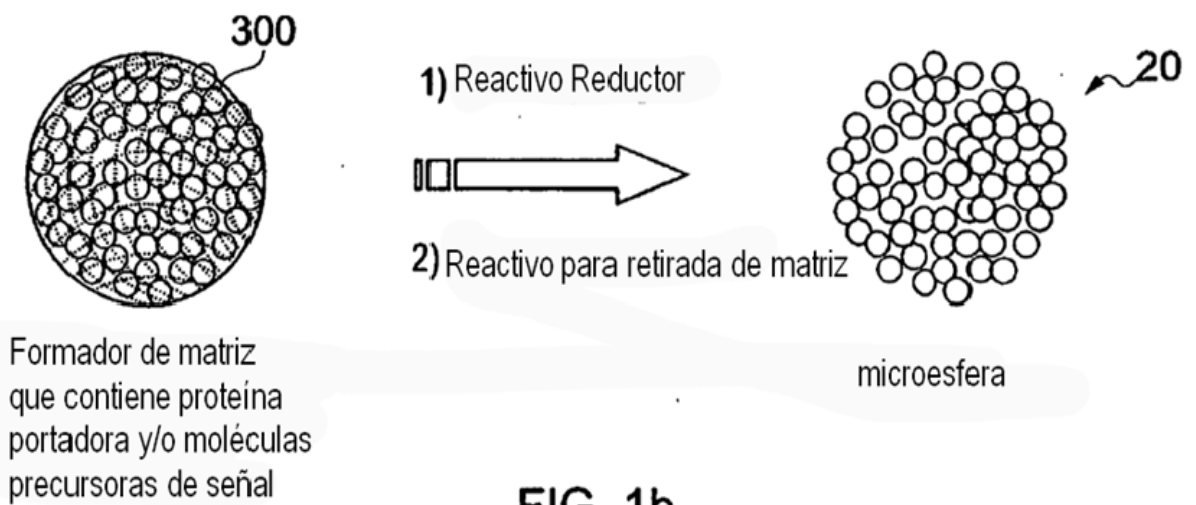
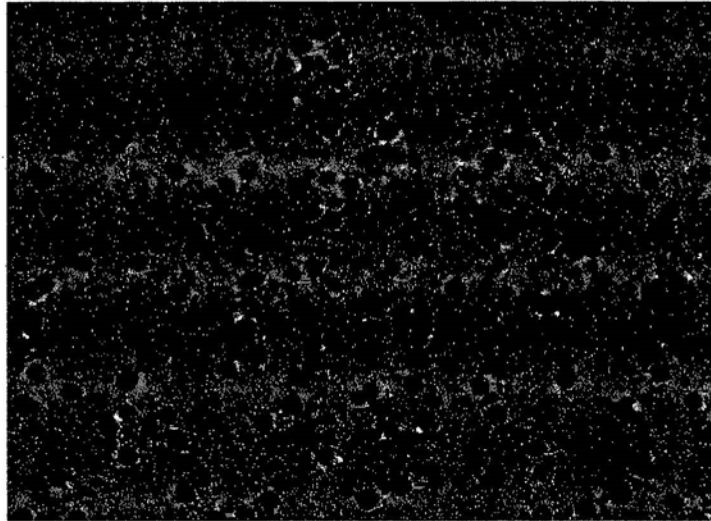
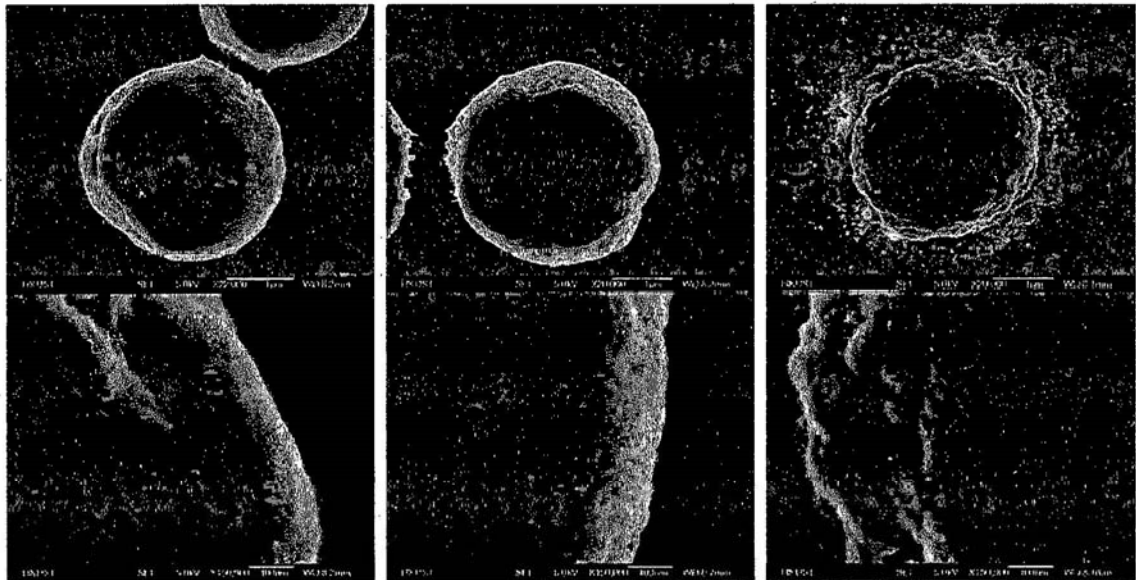


FIG. 1b



**Figura 2**



**Figura 3**



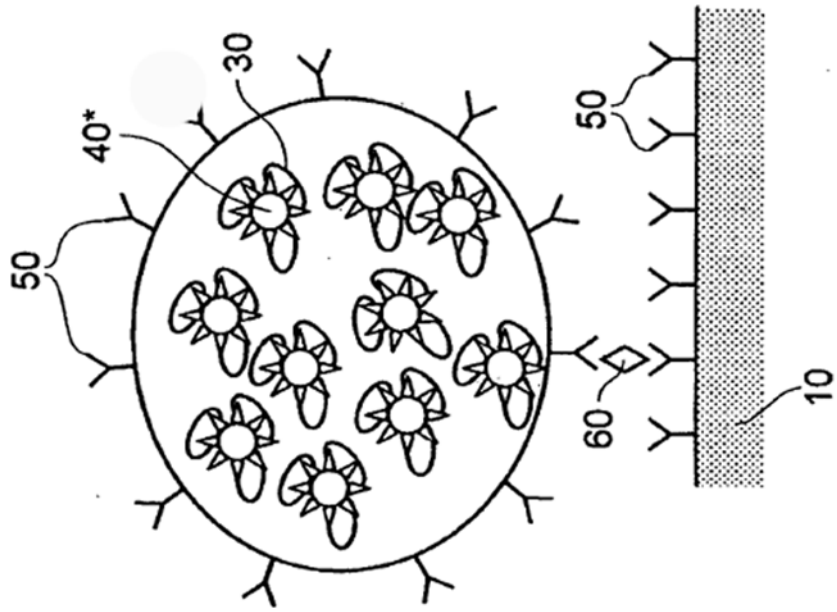


FIG. 4b

Reactivo  
desarrollante

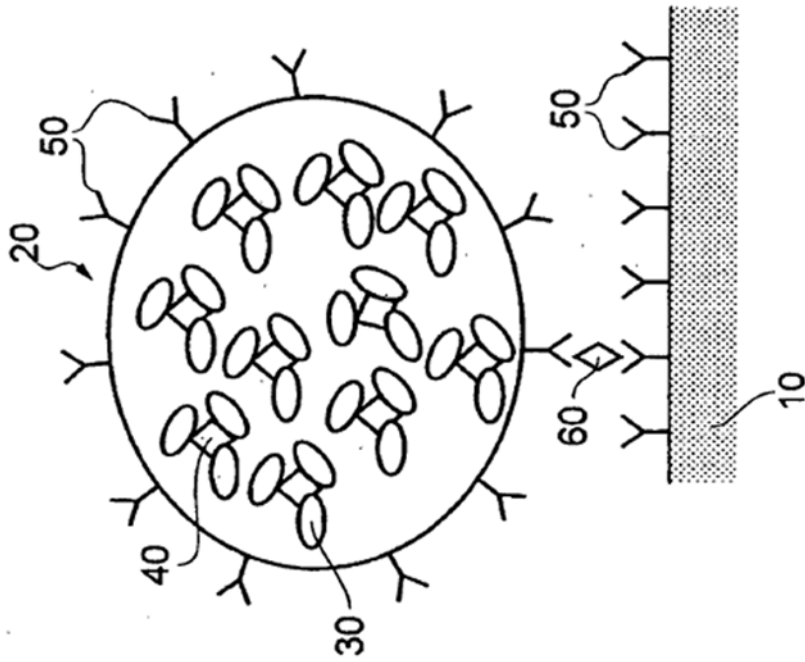


FIG. 4a