

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 928**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/77** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**B82Y 20/00** (2011.01)

**B82Y 10/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 05742019 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1756548**

54 Título: **Biosensor que usa modos de galería susurrante en microesferas**

30 Prioridad:

**26.05.2004 AU 2004902818**

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

**09.10.2015**

73 Titular/es:

**GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (50.0%)**

**1 Dalmore Drive**

**Scoresby, Victoria 3179, AU y**

**MULVANEY, PAUL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POETTER, KARL;**

**TOOHEY, BRENDAN y**

**MULVANEY, PAUL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 547 928 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

Biosensor que usa modos de galería susurrante en microesferas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente al campo de la detección de analitos. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de cambios en los perfiles del modo de galería susurrante (WGM) de partículas microesferoidales inducidos por la unión de un analito a un compañero de unión inmovilizado en la partícula, para detectar así la presencia del analito. La presente invención también se refiere a protocolos de multiplexado y a los analitos detectados mediante los cambios en el perfil del WGM.

15 Descripción de la técnica anterior

Los detalles bibliográficos de las referencias proporcionadas en la actual memoria descriptiva están recogidos al final de la memoria descriptiva.

20 Los rápidos avances en la Genómica y la Proteómica han destacado las carencias de los métodos tradicionales de trabajo intensivo para examinar y detectar la interacción entre dos moléculas. Existe una necesidad de diseñar métodos extremadamente sensibles para el análisis de la interacción entre moléculas diferentes y la detección de analitos en una muestra. El desarrollo de métodos que permitan dicho análisis sin la necesidad de marcar uno u otro, o ambos analitos y/o los compañeros de unión de los mismos, sería particularmente deseable.

25 Actualmente los chips génicos proporcionan un medio de análisis de ácidos nucleicos de alto rendimiento mediante el uso de matrices de oligonucleótidos inmovilizadas sobre portaobjetos. Sin embargo, esta tecnología depende del marcaje de al menos una de las moléculas.

30 Los intentos de desarrollar métodos y dispositivos para el examen de la interacción de moléculas que no dependan del marcaje de una o más de las moléculas incluyen biosensores, que son los usados con más frecuencia para el análisis de ADN y/o de proteínas basado en métodos ópticos. Véase, por ejemplo, Baird y Myszk, J Mol Recognit 14: 261 - 268, 2001, Rich y Myszk, J Mol Recognit 15: 352 - 376, 2002, Li et al. Science 299: 840 - 843, 2003 y Lin et al. Science 278: 840 - 843, 1997 que describen métodos ópticos que incluyen dispositivos interferométricos. Malmqvist, Nature 361: 186 - 187, 1993 desvela sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR). La SPR detecta un límite de  $< 10 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$  de carga de masa (Karlsson y Stahlberg, Anal Biochem 228: 274 - 280, 1995) y permite la detección en tiempo real de interacciones biomoleculares. Sin embargo, la SPR requiere una instrumentación cara y específica y la capacidad de mediciones múltiples está limitada.

40 La presente invención proporciona reactivos y métodos para, entre otros, la detección de interacciones entre analitos y sus compañeros de unión sin la necesidad del marcaje de ninguna molécula.

45 El documento WO 02/13337 y el documento US 2002/0172457 divulgan métodos para la detección de un analito en una muestra, que comprenden poner en contacto un conjunto de microesferas con la muestra, en el que cada microesfera comprende un compañero de unión inmovilizado de dicho analito y tiene un perfil de modo de galería susurrante definido, e iluminar dicha muestra, en el que la unión del analito al compañero de unión provoca un desplazamiento espectral en uno o más picos del perfil de WGM de la luz de iluminación transmitida.

50 El documento US 6.583.399 desvela un sensor de resonancia basado en óptica útil para la detección y la discriminación de sustancias específicas presentes en el entorno, en el que el resonador óptico puede comprender microesferas.

55 R. E. Benner et al, "Observation of Structure Resonances in the Fluorescence Spectra from Microspheres", Physical Review Letters, volumen 44, número 7, páginas 475 - 478, describen la excitación interna de un perfil de modo de galería susurrante en una microesfera de poliestireno impregnada con un colorante fluorescente.

Sumario de la invención

60 La presente invención proporciona métodos y reactivos para, entre otros, la detección de moléculas en una muestra. Estas moléculas se denominan en el presente documento analitos. La presencia o la estructura de los analitos no necesita ser conocida, y por lo tanto el método en cuestión es ideal para la detección de compañeros de unión desconocidos hasta la fecha de receptores huérfanos y de potenciales moduladores de la expresión de ácidos nucleicos o de proteínas, incluyendo actividad enzimática, plegamiento, antigenicidad o función. Los métodos de la presente invención se basan en parte en el fenómeno de que los marcadores ópticamente detectables incluidos en o sobre una partícula mostrarán un perfil de modo de galería susurrante (WGM) característico. La referencia a "ópticamente detectable" incluye la referencia a la detección mediante un medio espectrométrico. Cuando un analito

objetivo interactúa con un compañero de unión inmovilizado sobre la partícula microesferoidal, el perfil de WGM cambia, permitiendo una detección muy sensible incluso de acontecimientos de unión raros.

El WGM sólo permite la emisión de ciertas longitudes de onda desde la partícula. El resultado de este fenómeno es que las habituales amplias bandas de emisión (de 10 - 100 nm de ancho) de, por ejemplo, un fluoróforo, se contraen y aparecen como una serie de picos afilados correspondientes efectivamente a los patrones de luz de modo vertical dentro de la partícula. De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que el perfil de WGM es extremadamente sensible a los cambios en la superficie de la partícula microesferoidal y que el perfil de WGM se modifica cuando la partícula microesferoidal interactúa con los analitos o con las moléculas de su entorno.

La invención se refiere a un método para la detección de un analito según se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método poner en contacto un conjunto de partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende dicho analito, en el que cada partícula del conjunto de partículas microesferoidales comprende un compañero de unión inmovilizado de dicho analito y en el que el conjunto de partículas tiene un perfil de modo de galería susurrante (WGM) definido, en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado da como resultado un cambio en dicho perfil de WGM indicado por un desplazamiento espectral en uno o más picos del perfil de WGM de dicho conjunto de partículas microesferoidales, que es indicativo de la presencia de dicho analito, y la detección de la unión de dicho analito y del compañero de unión mediante la detección de dicho desplazamiento espectral de uno o más picos de dicho perfil de WGM, en el que cada partícula de dicho conjunto de partículas microesferoidales comprende un punto cuántico en forma de un marcador detectable ópticamente, y la emisión procedente de dicho marcador detectable ópticamente establece dicho perfil de WGM.

Los métodos de la presente invención pueden ser aplicados para detectar la modulación del perfil de WGM de una partícula microesferoidal en el que dicha modulación es el resultado de la detección de la unión o de otra asociación de moléculas en una muestra a potenciales partículas de unión inmovilizadas en la superficie de la partícula microesferoidal. La detección de las reacciones de unión entre un analito y su compañero de unión basada en cambios apreciables en los perfiles de WGM permite la identificación y el aislamiento de los analitos.

Una característica de la presente invención es que las partículas microesferoidales pueden ser excitadas con una amplia variedad de fuentes luminosas, facilitando la medición en muchos perfiles diferentes de WGM.

La partícula microesferoidal puede ser inmovilizada sobre un soporte sólido, por ejemplo, un soporte sólido puede incluir un portaobjetos de microscopio.

En una forma de realización específica, la presente invención proporciona una partícula microesferoidal que comprende una partícula de látex o de sílice que tiene entre 1  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, marcada con un punto cuántico, comprendiendo adicionalmente la partícula un supuesto compañero de unión de un analito que se va a detectar. El marcador detectable ópticamente es detectable a las longitudes de onda del visible, y la partícula microesferoidal muestra a uno o más perfiles de WGM. Uno o más de los perfiles de WGM de la partícula microesferoidal modula de forma detectable cuando los analitos interactúan con el compañero de unión inmovilizado en la partícula. Cualquiera de dichos cambios en el perfil de WGM es indicativo de la presencia de un analito que se ha unido a su compañero de unión.

Algunos ejemplos de analitos y de compañeros de unión incluyen moléculas químicas, moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, ácidos grasos y carbohidratos.

El método en cuestión de la presente invención no requiere ningún conocimiento de la existencia, de la presencia ni de la estructura del analito. Por ejemplo, si se desea encontrar una molécula (es decir, un analito) que interactúe con una enzima o con el sitio catalítico de una enzima, o en o cerca de un epítipo antigénico de una proteína o de una enzima, entonces el método en cuestión no requiere el conocimiento de si existe o no dicho analito. En ese caso, la partícula microesferoidal portará el compañero de unión objetivo en o cerca de su superficie, y se usarán los cambios en los perfiles de WGM para detectar un analito en una muestra, tal como en una biblioteca combinatoria, en una biblioteca química o en una fuente natural del producto (por ejemplo, una muestra medioambiental, suero, plasma o un extracto biológico) que interactúa con el compañero de unión objetivo.

El multiplexado está disponible mediante la incorporación de múltiples conjuntos de partículas microesferoidales, en el que cada conjunto comprende partículas de diferentes tamaños y/o marcadas con diferentes fluorocromos y/o con diferentes compañeros de unión objetivo.

A lo largo de esta memoria descriptiva, salvo que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento o número entero, o grupo de elementos o de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero, o grupo de elementos o de números enteros.

En la Tabla 1 se proporciona una lista de las abreviaturas usadas en el presente documento.

TABLA 1 - Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
APS	Aminopropilsilano
GAG	Glucosaminoglucano
HEX	Hexaclorofluoresceína
HLGAG	Glucosaminoglucano heparinoide
IR	Infrarrojos
JOE	7'-dimetoxifluoresceína
NIR	Infrarrojo cercano
PEI	Polietileno imina
PSS	Sulfonato de poliestireno
PVP	Polivinilpirrolidona
QD	Punto cuántico
SPR	Resonancia de plasmón superficial
TAMRA	Carboxitetrametilrodamina
TET	Tetraclorofluoresceína
TIR	Reflexión interna total
UV	Ultravioleta
WGM	Modo de galería susurrante

## Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 es una representación gráfica que muestra un esquema del procedimiento usado para la producción de partículas microesferoidales marcadas con un punto cuántico.

10 La Figura 2 es una representación gráfica que muestra una curva calculada que muestra cómo pequeños cambios en el radio de una partícula microesferoidal de sílice dan lugar a unos claros cambios en el perfil del WGM calculado de la partícula microesferoidal.

15 La Figura 3 es una representación gráfica que muestra partículas microesferoidales que comprenden marcadores de puntos cuánticos (QD) ópticamente detectables, que muestran una clara fluorescencia característica y unos perfiles de WGM definidos.

20 La Figura 4 es una representación gráfica que muestra espectros experimentales que muestran el desplazamiento observado en el perfil del WGM de una partícula microesferoidal cuando se adsorbe una monocapa de un biopolímero en las partículas microesferoidales. QD = partícula microesferoidal de control con puntos cuánticos no recubierta; PSS = partícula microesferoidal con una monocapa de sulfonato de poliestireno adsorbida (PSS); PVP = partícula microesferoidal con una monocapa de polivinilpirrolidona (PVP) adsorbida.

25 La Figura 5 es una representación gráfica de los perfiles de WGM para: (a) un ADN que se conjugó en forma de 48-mer con una partícula Q-Sand; (b) microesferas Q-Sand hibridadas con un ADN a-Transprobe, el complemento inverso de Transprobe; y (c) microesferas Q-Sand hibridadas con el producto de una PCR.

## Descripción detallada de las formas de realización preferidas

30 La presente invención proporciona métodos, entre otros, para la detección de una molécula denominada en el presente documento como analito, capaz de entrar en la interacción de unión con otra molécula denominada como su compañero de unión inmovilizada en la superficie de una partícula microesferoidal marcada con un marcador ópticamente detectable que confiere a la partícula un perfil de WGM definido. La referencia a "ópticamente detectable" incluye la referencia a una detección mediante un medio espectrométrico. Una interacción entre el analito y el compañero de unión induce un cambio en el perfil del WGM. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para la detección de analitos en muestras y de interacciones entre analitos. Lo que es importante, ni el analito ni su compañero de unión requieren un marcador. La interacción induce un cambio en el perfil del WGM de la partícula microesferoidal. Los métodos de la presente invención se basan, en parte, en el fenómeno de que los emisores de fluorescencia incluidos en o sobre una partícula microesferoidal establecen unos perfiles definidos de WGM. Las partículas microesferoidales pueden ser excitadas mediante una amplia variedad de fuentes luminosas. Esto facilita la medición en muchas configuraciones diferentes y facilita el multiplexado.

40

Los WGM sólo permiten la emisión de ciertas longitudes de onda de luz desde una partícula. El resultado de este fenómeno es que las habituales amplias bandas de emisión (de 10 - 100 nm de ancho) de un fluoróforo se contraen y aparecen como una serie de picos afilados correspondientes efectivamente a los patrones de luz de modo vertical dentro de la partícula.

5 El perfil de WGM es extremadamente sensible a las interacciones o a las asociaciones con la superficie de la partícula microesferoidal. Por lo tanto, pueden detectarse incluso acontecimientos de unión raros debido al cambio en el perfil de WGM.

10 Debe apreciarse que, salvo que se indique de otro modo, la invención en cuestión no está limitada a las formulaciones específicas de partículas microesferoidales, los métodos de elaboración, los protocolos de diagnóstico de ensayo, o similares como tal pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir formas de realización particulares y no pretende ser limitante. De la referencia a "un analito" y a "un compañero de unión" no debe inferirse que se conozca o se necesite tener ningún conocimiento de la estructura del analito.

15 Debe apreciarse que, según se usa en la actual memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el / la" incluyen los aspectos plurales salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un pico" o a "un perfil" incluye un único pico o perfil, así como dos o más picos o perfiles; una "partícula microesferoidal" incluye una única partícula, así como dos o más partículas; y así sucesivamente.

20 La presente invención contempla un método para la detección de un analito según se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método poner en contacto al menos un conjunto de partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende dicho analito, en el que cada partícula de un conjunto de partículas microesferoidales comprende un punto cuántico como marcador ópticamente detectable y un supuesto compañero de unión de dicho analito inmovilizado, en el que cada conjunto de partículas tiene un perfil definido de modo de galería susurrante (WGM), en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado da como resultado el desplazamiento espectral de uno o más picos de dicho perfil de WGM de dicho al menos un conjunto de partículas microesferoidales, lo que es indicativo de la presencia de dicho analito.

25 Las "partículas microesferoidales" contempladas por la presente invención incluyen partículas que comprenden cualquier material, homogéneo o de otro modo, que pueda producir uno o más perfiles de WGM basándose en su marcador ópticamente detectable. Como será evidente para los expertos en la materia, puede usarse prácticamente cualquier material, homogéneo o de otro modo, para la partícula microesferoidal. Las partículas microesferoidales contempladas en el presente documento también pueden comprender más de una sustancia, y como tal pueden comprender cubiertas, aleaciones o mezclas de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Para la cuantificación de los datos generados mediante los métodos es ventajoso que la partícula microesferoidal comprenda un material sustancialmente homogéneo con un índice de refracción isótropo y que también sea no absorbente (distinto al marcador ópticamente detectable, que se describe adicionalmente a continuación).

30 Algunos materiales particularmente útiles que pueden usarse de acuerdo con la presente invención y que representan formas de realización específicas de la presente invención incluyen materiales seleccionados de entre la lista que consiste en: sílice (por ejemplo: cuarzo o vidrio), látex, titanía, dióxido de estaño, ytria, alúmina y otros óxidos metálicos binarios (tales como ZnO), perovskitas y otros óxidos metálicos piezoeléctricos (tales como BaTiO<sub>3</sub>), ZnS, sacarosa, agarosa y otras microesferas poliméricas. En una forma de realización particularmente preferida, la "partícula" y/o la "partícula microesferoidal" comprende sílice.

35 Por lo tanto, aunque muchas formas de material pueden mantener el perfil de WGM, generalmente es práctico sintetizar pequeñas esferas o partículas esferoidales. Dichas esferas o partículas esferoidales también se denominan en el presente documento "partículas microesferoidales" o "microesferas". Consecuentemente, en las formas de realización preferidas de la presente invención, las "partículas" y las "partículas microesferoidales" de la presente invención son sustancialmente esféricas o esferoidales, o comprenden una "microesfera".

40 Aunque las partículas de la presente invención pueden denominarse "microesferoides", el tamaño real de la partícula microesferoidal depende de varios factores, y las partículas pueden comprender realmente o no medidas en el intervalo micrométrico. En una forma de realización preferida, las partículas microesferoidales de la presente invención comprenden un diámetro (o una medida equivalente de una partícula no esferoidal) de desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 100 µm, incluyendo 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 11 µm, 12 µm, 13 µm, 14 µm, 15 µm, 16 µm, 17 µm, 18 µm, 19 µm, 20 µm, 21 µm, 22 µm, 23 µm, 24 µm, 25 µm, 26 µm, 27 µm, 28 µm, 29 µm, 30 µm, 31 µm, 32 µm, 33 µm, 34 µm, 35 µm, 36 µm, 37 µm, 38 µm, 39 µm, 40 µm, 41 µm, 42 µm, 43 µm, 44 µm, 45 µm, 46 µm, 47 µm, 48 µm, 49 µm, 50 µm, 51 µm, 52 µm, 53 µm, 54 µm, 55 µm, 56 µm, 57 µm, 58 µm, 59 µm, 60 µm, 61 µm, 62 µm, 63 µm, 64 µm, 65 µm, 66 µm, 67 µm, 68 µm, 69 µm, 70 µm, 71 µm, 72 µm, 73 µm, 74 µm, 75 µm, 76 µm, 77 µm, 78 µm, 79 µm, 80 µm, 81 µm, 82 µm, 83 µm, 84 µm, 85 µm, 86 µm, 87 µm, 88 µm, 89 µm, 90 µm, 91 µm, 92 µm, 93 µm, 94 µm, 95 µm, 96 µm, 97 µm, 98 µm, 99 µm y 100 µm. La referencia a estos tamaños de microesferas incluye fracciones de números completos.

Por ejemplo, las fracciones entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  incluyen 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95 o 2,0.

En una forma de realización en particular, las partículas microesferoidales son microesferas.

5 Un conjunto de partículas microesferoidales que incluye un conjunto de microesferas incluye una multiplicidad (es decir, dos o más) de partículas o de microesferas que tienen un marcador o un tamaño o un compañero de unión inmovilizado común.

10 Según se usa en el presente documento, el término "marcador ópticamente detectable" se refiere a cualquier molécula, átomo o ión que emite fluorescencia o fosforescencia. El marcador ópticamente detectable puede elegirse para que emita en cualquier longitud de onda en la que el perfil de WGM pueda ser fácilmente resuelto. Esto depende de la proporción entre la longitud de onda de emisión y el radio de la partícula. Dado que el radio de la esfera es arbitrario, la emisión puede elegirse adecuadamente entre los intervalos del ultravioleta (intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 3 nm), del visible (intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 350 nm hasta aproximadamente 800 nm, del infrarrojo cercano (NIR) (intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 800 nm hasta aproximadamente 1.500 nm) y/o del infrarrojo (IR) (intervalo de longitudes de onda de desde aproximadamente 1.500 nm hasta aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, debido a la facilidad de detección, en una forma de realización particularmente preferida, el marcador ópticamente detectable es detectable en el intervalo de longitudes de onda del visible.

En una forma de realización particular, el marcador ópticamente detectable puede ser un marcador ópticamente detectable que emite radiación visible en respuesta a una excitación infrarroja. Dichos marcadores ópticamente detectables también se denominan en el presente documento "convertidores ascendentes".

25 Consecuentemente, un método ejemplar de detección de un analito puede comprender poner en contacto al menos un conjunto de partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende dicho analito, en el que cada partícula del conjunto de partículas microesferoidales comprende un marcador que emite en la región visible en respuesta a una excitación infrarroja, y un supuesto compañero de unión de dicho analito inmovilizado, en el que cada conjunto de partículas tiene un perfil definido de modo de galería susurrante (WGM), en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado da como resultado un cambio en dicho perfil de WGM de dicho al menos un conjunto de partículas microesferoidales, lo que es indicativo de la presencia de dicho analito.

35 La única restricción con respecto al marcador ópticamente detectable es que la emisión del marcador elegido debería dar como resultado una emisión en modo de cavidad.

De acuerdo con la invención, el marcador ópticamente detectable comprende un punto cuántico. En un método ejemplar que no forma parte de la invención reivindicada, puede usarse la luz dispersada desde pequeñas partículas metálicas (emisión de plasmón superficial) como marcador ópticamente detectable.

40 Un marcador ópticamente detectable particularmente conveniente que puede usarse de acuerdo con la presente invención es incluir partículas fluorescentes sobre o en la partícula microesferoidal. Estas partículas marcadoras ópticamente detectables serán tan pequeñas que sus propiedades y su emisión serán dependientes del tamaño. Dichas pequeñas partículas marcadoras ópticamente se denominan en la materia nanopartículas semiconductoras, 45 puntos cuánticos, cables cuánticos, varillas cuánticas o nanocristales o partículas Q. Sin embargo, según se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "punto cuántico" o "QD" engloba todas estas partículas. Adicionalmente, los marcadores ópticamente detectables que comprenden QD pueden comprender partículas aproximadamente esféricas o esferoidales, o partículas esféricas o esferoidales recubiertas. Sin embargo, no debería considerarse que el término QD está limitado en modo alguno a una morfología esférica, esferoidal, circular, 50 cilíndrica o cualquier otra morfología de un "punto". Por ejemplo, según se usa en el presente documento, los QD también pueden comprender otras morfologías que incluyen, entre otros, partículas alargadas, elipsoidales o alargadas o elipsoidales recubiertas.

55 Los QD consisten en un núcleo cristalino de escala nanométrica de un material semiconductor; las versiones biológicamente activas normalmente están rodeadas por una cubierta protectora y un recubrimiento externo. Por ejemplo, algunos QD pueden comprender cristallitos semiconductores que tienen desde aproximadamente 2 nm hasta aproximadamente 30 nm de diámetro (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nm) y pueden contener aproximadamente 50 - 500.000 átomos en el cristal, incluyendo cristales luminiscentes que comprenden materiales tales como ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, PbS, PbSe, PbTe, HgS, HgSe, HgTe, Si, ZnO.

60 Los QD fluorescen con un amplio espectro de absorción y un estrecho espectro de emisión. Al contrario que otros fluoróforos, que tienen distintos espectros de absorción, los QD absorben luz en un amplio intervalo espectral, lo que permite que los puntos cuánticos sean excitados con un intervalo de fuentes luminosas, tales como láseres, lámparas de arco o LED. Adicionalmente, puede usarse un conjunto de diferentes QD en múltiples aplicaciones sólo mediante el uso de una única fuente de excitación. Sin embargo, los espectros de emisión de cada punto

normalmente son muy estrechos, del orden de aproximadamente 30 nm, dependiendo el color exacto del diámetro y de la composición de la partícula. Adicionalmente, el estrecho aspecto de emisión de los QD permite la resolución espectral de los puntos adyacentes. Además de los beneficios anteriores, los QD también son relativamente fotoestables, incluso durante una excitación intensa, y son más brillantes que los fluoróforos.

5 A la luz de lo anterior, también debería entenderse que la presente invención engloba el uso de diferentes tamaños de QD con objeto de optimizar las longitudes de onda a las que pueden generarse los perfiles de WGM de una partícula microesferoidal.

10 Adicionalmente, la presente invención contempla QD que se tratan con procedimientos tales como un tratamiento térmico, una modificación de superficie, una aleación, una pasivación de superficie o una protección con recubrimientos de superficie para permitir que el QD emita con un elevado rendimiento cuántico y para mejorar la fotoestabilidad durante periodos prolongados de tiempo.

15 Los QD también están disponibles comercialmente en compañías tales como Quantum Dot Corp. (QDC), que produce QD tales como el conjugado de estreptavidina Qdot [marca registrada] 605, que contiene un núcleo de seleniuro de cadmio que emite a 605 nm. También hay disponibles conjugados de Qdot que emiten a 525, a 565, a 585 y a 655 nm. Sin embargo, debería entenderse que la presente invención no está limitada en modo alguno por la composición en particular del QD (o de cualquier otro marcador ópticamente detectable) y que cualquier QD  
20 (comercial o de otro modo) puede ser compatible con la presente invención.

También existen muchos colorantes fluorescentes que están disponibles en la materia que pueden ser usados como fluoróforos en los métodos ejemplares que no forman parte de la invención reivindicada. Una propiedad importante de un colorante fluorescente o de otro fluoróforo, que determina su potencial de uso, es la longitud de onda de  
25 excitación del fluoróforo; debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente luminosa. Sin embargo, muchos colorantes fluorescentes diferentes y otros fluoróforos serán familiares para los expertos en la materia, y la elección del marcador fluorescente no limita en modo alguno la actual invención.

30 Los "fluoróforos" convenientes que pueden usarse para el marcaje de una partícula microesferoidal comprenden cualquier marcador fluorescente que sea excitable mediante el uso de una fuente luminosa seleccionada de entre el siguiente grupo:

(i) Láseres de ion argón - comprenden una línea azul a 488 nm, que es adecuada para la excitación de muchos colorantes y fluorocromos que fluorescen en la región verde hasta roja. También hay disponibles láseres de  
35 argón regulables que emiten en un intervalo de longitudes de onda (a 458 nm, a 488 nm, a 496 nm, a 515 nm entre otras).

(ii) Láseres de diodo - tienen una longitud de onda de emisión de 635 nm. Otros láseres de diodo que están disponibles actualmente operan a 532 nm. Esta longitud de onda excita el yoduro de propidio (PI) de forma  
40 óptima. También hay disponibles láseres de diodo azul que emiten luz alrededor de los 476 nm. Dichos láseres de diodo pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM de las partículas microesferoidales

(iii) Láseres de gas de HeNe - operan con la línea roja a 633 nm. Dichos láseres pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM de las partículas microesferoidales.  
45

(iv) Láseres de HeCd - operan a 325 nm. Dichos láseres pueden emplearse convenientemente para excitar los WGM de las partículas microesferoidales.

(v) Lámpara de arco de mercurio de 100 W - la fuente de luz más eficiente para la excitación de colorantes UV  
50 como Hoechst y DAPI.

(vi) Las lámparas de arco de Xe y las lámparas halógenas de cuarzo pueden usarse asimismo como un medio para excitar los WGM y utilizar por tanto las partículas como sensores.

55 En los métodos ejemplares, los marcadores fluorescentes se eligen de entre: colorantes Alexa Fluor; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes Cy, particularmente Cy3, Cy5 y Cy 5.5; 6-FAM (Fluoresceína); Fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes verde Oregon, incluyendo 488-X y 514; colorantes de Rodamina, incluyendo verde Rodamina, rojo Rodamina y ROX ; Carboxitetrametilrodamina (TAMRA); Tetraclorofluoresceína (TET); y rojo Texas.

60 Habitualmente se usan dos técnicas de tinción, la tinción interna y la tinción externa (marcaje de superficie), para marcar fluorescentemente las partículas microesferoidales. Las dos técnicas producen unas partículas con unas propiedades únicas, cada una beneficiosa para diferentes aplicaciones. La tinción interna produce partículas extremadamente estables con unas emisiones de fluorescencia normalmente estrechas. Estas partículas muestran a  
65 menudo una mayor resistencia a la fotodecoloración. Como el fluoróforo está en el interior de las partículas, los grupos de la superficie están disponibles para su uso en la conjugación con ligandos (proteínas, anticuerpos, ácidos

nucleicos, etc.) de la superficie de la microesfera. Por esta razón, las microesferas marcadas internamente se usan normalmente en aplicaciones de detección de analitos y de inmunoensayo. El marcaje de superficie implica la conjugación del fluoróforo con la superficie de la partícula microesferoidal. Debido a que los fluoróforos están en la superficie de la partícula, son capaces de interactuar con su entorno exactamente igual que los fluoróforos de una célula teñida. El resultado es una partícula estándar que muestra las mismas propiedades de excitación y de emisión que las muestras de células teñidas, en una variedad de condiciones diferentes, tales como la presencia de contaminantes o cambios en el pH. La naturaleza "sensible al medio circundante" de las partículas marcadas en su superficial las hace idealmente adecuadas para simular las muestras biológicas. Las partículas marcadas externamente se usan frecuentemente como controles y estándares de varias aplicaciones que utilizan una detección por fluorescencia. Sin embargo, la presente invención contempla la asociación de una partícula con un marcador fluorescente a través de cualquier medio.

Los términos "partículas fosforescentes", "partículas de fósforo" y "fósforos" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Lo que constituye un marcador fosforescente ópticamente detectable sería fácilmente comprendido por el experto en la materia. Sin embargo, a modo de ejemplo, que en modo alguno limita la invención, algunos fósforos adecuados incluyen pequeñas partículas de ZnS, ZnS:Cu, óxido de Eu y otros fósforos usados en dispositivos de visualización.

Un marcador ópticamente detectable que comprende una "partícula dopada" puede incluir una partícula que comprende cantidades ocultas de uno o más iones de tierras raras, tales como Eu, Y, Yb, Sm y similares.

Según se usa en el presente documento, debería entenderse que el término "marcador ópticamente detectable" también engloba múltiples marcadores ópticamente detectables, mezclas de marcadores ópticamente detectables, nanocristales recubiertos, aleaciones y otras mezclas complejas que serían evidentes para el artesano experto. El uso de todos esos marcadores ópticamente detectables en partículas microesferoidales debe considerarse como incluido en el ámbito de los métodos y los reactivos descritos en el presente documento.

Se ha demostrado que la emisión de cualquier marcador en particular depende de la distribución del marcador en la partícula microesferoidal, del tipo de marcador y de la concentración del marcador. Sin embargo, los métodos de la presente invención todavía son factibles independientemente de si el marcador ópticamente detectable está en la superficie de la partícula microesferoidal, presente en forma de una cubierta en la partícula microesferoidal, ubicado en el núcleo de la partícula microesferoidal o de si está presente en más de una de las ubicaciones mencionadas.

Debería mencionarse que los métodos de la presente invención no se basan en la inactivación de la emisión por parte del marcador ópticamente detectable. Los métodos de la presente invención se basan, sin embargo, en parte, en una modulación (es decir, en un cambio) en el perfil de WGM del marcador ópticamente detectable como resultado de una interacción o de una asociación de un analito con un compañero de unión inmovilizado en la superficie de una partícula microesferoidal.

Cuando se trata de una radiación electromagnética, los WGM son resonancias electromagnéticas que pueden ser establecidas cuando la luz incidente interactúa con una partícula con un índice de refracción mayor que su medio circundante. Los WGM se producen a unas longitudes de onda resonantes en particular de luz para un tamaño de partícula dado, y la naturaleza de los WGM puede cambiar, entre otros, según el tamaño de la partícula que contiene los WGM y los índices de refracción tanto de la partícula como del medio circundante. Adicionalmente, el tamaño de la partícula también puede afectar a los WGM establecidos en la misma. Los WGM se establecen cuando la luz incidente experimenta una reflexión interna total en la superficie de la partícula.

Una reflexión interna total (TIR) puede producirse en la interfase entre dos medios no absorbentes. Cuando un haz de luz que se propaga en el medio con el mayor índice de refracción se encuentra con una interfase en un medio con un menor índice de refracción a un ángulo de incidencia por encima de un ángulo crítico, la luz es reflejada totalmente en la interfase y se propaga de nuevo en el medio con el mayor índice de refracción. Como será evidente para una persona experta en la materia, en un medio tridimensional, la luz puede ser reflejada muchas veces en la partícula con un mayor índice de refracción. En un WGM, la luz se concentra cerca de la circunferencia de la partícula y se le puede asignar un número de modo y un orden de modo. El número de modo,  $n$ , proporciona el número de longitudes de onda alrededor de la circunferencia de la partícula, y el orden de modo,  $l$ , proporciona el número de máximos en dependencia radial del campo electromagnético dentro de la partícula.

Los emisores de fluorescencia incluidos en o dentro de una partícula, según se definen en el presente documento, muestran unos perfiles definidos de WGM. Estos modos permiten que únicamente ciertas longitudes de onda de luz sean emitidas desde la partícula. El resultado de este fenómeno es que el espectro de emisión habitual relativamente ancho de un marcador ópticamente detectable (por ejemplo, los fluoróforos normalmente emiten en un ancho de banda de 10 - 100 nm) se contraiga y aparezca como una serie de afilados "picos" correspondientes efectivamente a los patrones de modo vertical de la partícula. Las series de picos generadas como resultado del establecimiento de un WGM en la partícula microesferoidal de la presente invención se denominan en el presente documento "perfiles de modo de galería susurrante" o "perfiles de WGM".

El perfil de WGM es extremadamente sensible tanto a la posición del marcador ópticamente detectable incluido como a su concentración y a su configuración espacial relativa. Adicionalmente, el tamaño de partícula y el índice de refracción también son importantes en la determinación de las longitudes de onda de emisión observadas en un perfil de WGM.

5 Se propone que la posición y la amplitud de uno o más de los picos de un perfil de WGM pueden estar fuertemente afectados por las interacciones o las asociaciones de la partícula microesferoidal con las moléculas de una muestra o del entorno externo.

10 En un ejemplo, la asociación o la unión de una molécula a una partícula microesferoidal altera el índice de refracción efectivo de la partícula microesferoidal, alterando el perfil de WGM generado por la partícula microesferoidal.

15 El término "índice de refracción" sería fácilmente comprendido por una persona experta en la materia. En resumen, el índice de refracción de un medio es un valor calculado a partir de la proporción entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad en un segundo medio con una densidad mayor. En el caso de una partícula microesferoidal, un cambio en el "índice de refracción efectivo" puede ser un cambio en el índice de refracción de la partícula microesferoidal completa, o un cambio en el índice de refracción efectivo puede ser un cambio en el índice de refracción de una región o de una parte de la partícula microesferoidal. Por ejemplo, un cambio en el índice de refracción efectivo de una partícula microesferoidal puede comprender un cambio en el índice de refracción de la superficie y/o de la periferia de la partícula microesferoidal.

20 En una forma de realización particular, la presente invención contempla un método para la detección de la unión o de la asociación de una molécula con, o próxima a, la superficie o la sub-superficie de la partícula microesferoidal, en el que la unión o la asociación de la molécula a un compañero de unión inmovilizado de la molécula produce un cambio en el índice de refracción efectivo en la superficie de la partícula microesferoidal.

25 Una "sub-superficie" incluye bolsillos o poros que rodean la partícula o que forman una interfase co-continua entre un entorno interno de la partícula y un entorno externo.

30 Según se usa en el presente documento, la molécula o el compañero de unión inmovilizado en la partícula microesferoidal o el analito de una muestra se refieren a cualquier entidad química. Dichas entidades químicas incluyen, pero no se limitan a, una pequeña molécula química; péptidos, polipéptidos y proteínas o análogos de los mismos, moléculas de ácidos nucleicos o análogos de los mismos, átomos o iones metálicos o compuestos que comprenden dichos átomos o iones. De entre las moléculas de ácidos nucleicos se contemplan particularmente los  
35 ARN de interferencia pequeños (mono o bicatenarios) [ARNip], los complejos de ARN de interferencia (ARNi) y los oligonucleótidos de ADN y de ARN. Los compuestos químicos incluyen entidades producidas en una biblioteca combinatoria o en una biblioteca química. Además, se contempla el cribado de productos naturales procedentes de una fuente biológica. La referencia a una fuente biológica incluye una muestra medioambiental, un extracto de un organismo, un extracto vegetal o animal, suero, orina, exudado, semen, plasma, una muestra de suelo, una muestra de río o precintada, una muestra extraterrestre, entre otras fuentes.

40 Según se usa en el presente documento, la frase "unido a, o asociado de otro modo con" se refiere a cualquier proceso mediante el cual una molécula puede ser asociada con una partícula microesferoidal. Algunos modos ejemplares mediante los cuales pueden medirse dichas asociaciones incluyen, pero no se limitan a: unión  
45 covalente, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces iónicos, enlaces metálicos, enlaces polares y enlaces dativos (covalentes), y similares.

Una molécula que incluye un compañero de unión también puede unirse a la partícula microesferoidal a través de un agente que promueva o aumente la adsorción o la unión de la molécula a la superficie de la partícula  
50 microesferoidal, dicho agente se denomina en el presente documento "conector". Por ejemplo, pueden asociarse polinucleótidos con una partícula microesferoidal a través de un conector que comprende un grupo tiol, amina o carboxilo. Algunos ejemplos de conectores adecuados incluyen silanos terminados en amino tales como aminopropiltrimetoxisilano o aminopropiltriethoxisilano. Además de los silanos, también están en el ámbito de la presente invención compuestos tales como poli-L-lisina, que se unen no covalentemente a superficies tales como  
55 vidrio, y adsorben electrostáticamente los grupos fosfato de un polinucleótido. Por lo tanto, otras moléculas, incluyendo otros silanos, que son adecuadas para promover la unión o la asociación de un polinucleótido, de un polipéptido o de otro compuesto, a la superficie de una partícula microesferoidal, serían fácilmente identificadas por el artesano experto, y la presente invención no está limitada por la elección del conector.

60 Los términos "ácidos nucleicos", "nucleótido" y "polinucleótido" incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, tanto hebras sentido como antisentido, y pueden ser modificados químicamente o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcajes, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo (tal como un anillo de morfolino), modificaciones internucleotídicas  
65 tales como enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), fracciones colgantes (por ejemplo,

5 polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos  $\alpha$ -anoméricos etc.). También están incluidas las moléculas sintéticas que mimetizan los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y de otras interacciones químicas. Dichas moléculas son conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos sustituyen a los enlaces de fosfato en el esqueleto de la molécula.

Otra forma de realización de la presente invención contempla que la partícula microesferoidal comprenda adicionalmente ADN unido a, o asociado de otro modo con, la superficie de la partícula microesferoidal.

10 Aún otra forma de realización preferida adicional de la presente invención contempla que la partícula microesferoidal comprenda adicionalmente ARN o un complejo de ARN (por ejemplo, un complejo de ARN-Rnasa) unido a, o asociado de otro modo con, la superficie de la partícula microesferoidal.

15 En una forma de realización alternativa, la presente invención contempla que el perfil de WGM de la partícula microesferoidal module de forma detectable cuando un péptido, un polipéptido o una proteína o un análogo de los mismos se una a, o se asocie de otro modo con, la superficie de la partícula microesferoidal.

En una forma de realización, el péptido, el polipéptido o la proteína es una enzima.

20 En otra forma de realización, el péptido, el polipéptido o la proteína es un anticuerpo.

25 El término "anticuerpo" se refiere a una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de combinarse, de interactuar o de asociarse de otro modo con un antígeno. Un anticuerpo es, por lo tanto, una molécula de unión a un antígeno. El término "antígeno" se usa en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a una sustancia que es capaz de reaccionar con, o de unirse a, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Con respecto a la presente invención, un antígeno también incluye el idiotipo de un anticuerpo.

30 El término "inmunoglobulina" se usa en el presente documento para hacer referencia a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por los genes de las inmunoglobulinas. Las moléculas de inmunoglobulina reconocidas incluyen las regiones constantes  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>),  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$ , las cadenas ligeras ( $\kappa$  y  $I$ ), así como la miríada de regiones variables de inmunoglobulinas. Una forma de inmunoglobulina constituye en la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en otras formas diversas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab, Fab' y (Fab')<sub>2</sub> y anticuerpos quiméricos, y todas estas variantes están englobadas por el término "anticuerpo" según se usa en el presente documento. Además, las inmunoglobulinas de otros animales (por ejemplo, de aves, mamíferos, peces, anfibios y reptiles) tienen una función similar pero una nomenclatura diferente, y éstas también están consideradas como "anticuerpos".

35 Las partículas microesferoidales pueden comprender anticuerpos antiidiotípicos unidos o asociados de otro modo con las mismas. Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo antiidiotípico" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une a unos determinantes antigénicos dentro de la región variable, por ejemplo, los dominios V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>, de un anticuerpo objetivo. Estos determinantes antigénicos de la región variable de un anticuerpo se denominan "idiotipo" de un anticuerpo. Consecuentemente, un anticuerpo específico para estas regiones se denomina "anticuerpo antiidiotípico".

40 Los "análogos" de péptidos, de polipéptidos y/o de proteínas contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos o proteínas que comprenden una modificación en las cadenas laterales, péptidos sintéticos que incorporan aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis y el uso de reticulaciones y otros métodos que imponen restricciones conformacionales en el péptido, el polipéptido o la proteína en cuestión.

45 Algunos ejemplos de modificaciones en la cadena lateral incluyen modificaciones de grupos amino, tales como una alquilación reductora mediante una reacción con un aldehído seguido de reducción con NaBH<sub>4</sub>; una amidación con metilacetimidato; una acilación con anhídrido acético; una carbamoilación de los grupos amino con cianato; una trinitrobencilación de los grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS); una acilación de los grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahydroftálico; y una piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de una reducción con NaBH<sub>4</sub>.

El grupo guanidina de los residuos de arginina puede ser modificado mediante la formación de productos heterocíclicos de condensación con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y gloxal.

50 El grupo carboxilo puede ser modificado mediante la activación con carbodiimida a través de la formación de una O-acilisourea, seguido de una posterior derivatización, por ejemplo, a la correspondiente amida.

5 Los grupos sulfhidrilo pueden ser modificados mediante métodos tales como una carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; una oxidación con ácido perbromico hasta ácido cisteico; la formación de un disulfuro mixto con otros compuestos de tiol; la reacción con maleimida, con anhídrido maleico o con otra maleimida sustituida; la formación de derivados de mercurio mediante el uso de benzoato de 4-cloromercurio, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercurio-4-nitrofenol y otros mercuriales; una carbamoilación con cianato a pH alcalino.

10 Los residuos de triptófano pueden ser modificados, por ejemplo, mediante una oxidación con N-bromosuccinimida o una alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfonilo. Los residuos de tirosina, por otro lado, pueden ser alterados mediante una nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

15 La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede llevarse a cabo mediante una alquilación con derivados del ácido yodoacético o una N-carboxilación con pirocarbonato de dietilo.

20 Algunos ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y de derivados durante la síntesis peptídica incluyen, pero no se limitan a, el uso de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o isómeros D de aminoácidos. En la Tabla 2 se muestra una lista de los aminoácidos no naturales contemplados en el presente documento.

TABLA 2 - Códigos para aminoácidos no convencionales

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ácido $\alpha$ -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
$\alpha$ -amino- $\alpha$ -metilbutirato	Mgabu	L-N-metilarginina	Nmarg
carboxilato de aminociclopropano	Cpro	L-N-metilasparragina	Nmasn
		ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
carboxilato de aminonorbornilo	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
		ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metil-lisina	Nmlys
ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-metionina	Dmet	L-N-metiltriptófano	Nmtrp
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	Dser	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	$\alpha$ -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	$\alpha$ -metil- $\gamma$ -aminobutirato	Mgabu
D- $\alpha$ -metilalanina	Dmala	$\alpha$ -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- $\alpha$ -metilarginina	Dmarg	$\alpha$ -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- $\alpha$ -metilasparragina	Dmasn	$\alpha$ -metil- $\alpha$ -naftilalanina	Manap

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D- $\alpha$ -metilaspártato	Dmasp	$\alpha$ -metilpenicilamina	Mpen
D- $\alpha$ -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil) glicina	Nglu
D- $\alpha$ -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil) glicina	Naeg
D- $\alpha$ -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil) glicina	Norn
D- $\alpha$ -metilisoleucina	Dmile	N-amino- $\alpha$ -metilbutirato	Nmaabu
D- $\alpha$ -metilleucina	Dmleu	$\alpha$ -naftilalanina	Anap
D- $\alpha$ -metil-lisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- $\alpha$ -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil) glicina	Ngln
D- $\alpha$ -metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil) glicina	Nasn
D- $\alpha$ -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil) glicina	Nglu
D- $\alpha$ -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil) glicina	Nasp
D- $\alpha$ -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- $\alpha$ -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- $\alpha$ -metilriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- $\alpha$ -metiltirosina	Dmty	N-ciclodecilglicina	Ncdec
D- $\alpha$ -metilvalina	Dmval	N-cylcododecilglicina	Ncdod
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilasparragina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspártato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil) glicina	Nbhm
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil) glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3-guanidinopropil) glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil) glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil) glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletal) glicina	Nhis
D-N-metil-leucina	Dn mleu	N-(3-indoliletal) glicina	Nhtrp
D-N-metil-lisina	Dn mlys	N-metil- $\gamma$ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil) glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil) glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletal) glicina	Nval
D-N-metiltirosina	Dnmtyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
ácido $\gamma$ -aminobutírico	Gabu	N-( $p$ -hidroxifenil) glicina	Nhtyr
L- $t$ -butilglicina	Tbug	N-(tiometil) glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- $\alpha$ -metilalanina	Mala
L- $\alpha$ -metilarginina	Marg	L- $\alpha$ -metilasparragina	Masn
L- $\alpha$ -metilaspártato	Masp	L- $\alpha$ -metil- $t$ -butilglicina	Mtbug
L- $\alpha$ -metilcisteína	Mcys	L-metiletal glicina	Metg
L- $\alpha$ -metilglutamina	Mgln	L- $\alpha$ -metilglutamato	Mglu
L- $\alpha$ -metilhistidina	Mhis	L- $\alpha$ -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- $\alpha$ -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltoetil) glicina	Nmet
L- $\alpha$ -metilleucina	Mleu	L- $\alpha$ -metil-lisina	Mlys

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
L- $\alpha$ -metilmetionina	Mmet	L- $\alpha$ -metilnorleucina	Mnle
L- $\alpha$ -metilnorvalina	Mnva	L- $\alpha$ -metilornitina	Morn
L- $\alpha$ -metilfenilalanina	Mphe	L- $\alpha$ -metilprolina	Mpro
L- $\alpha$ -metilserina	Mser	L- $\alpha$ -metiltreonina	Mthr
L- $\alpha$ -metilriptófano	Mtrp	L- $\alpha$ -metiltirosina	Mtyr
L- $\alpha$ -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
N-(N-(2,2-difeniletíl) carbamilmetil) glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil) glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difenil-etilamino) ciclopropano	Nmbc		

5 Los reticulantes pueden usarse, por ejemplo, para estabilizar conformaciones tridimensionales, mediante el uso de reticulantes homobifuncionales tales como los ésteres imido bifuncionales que tienen grupos separadores (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> con desde n = 1 hasta n = 6, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que habitualmente contienen una fracción de amina reactiva, tales como N-hidroxisuccinimida y otra fracción reactiva específica de grupo, tal como una fracción maleimido o ditio (SH) o carbodiimida (COOH). Además, los péptidos pueden ser restringidos conformacionalmente mediante, por ejemplo, la incorporación de C $\alpha$  y N $\alpha$ -metilaminoácidos, la introducción de dobles enlaces entre los átomos de C $\alpha$  y C $\beta$  de los aminoácidos y la formación de péptidos o de análogos cíclicos mediante la introducción de enlaces covalentes tales como la formación de un enlace amida entre los N y C terminales, entre dos cadenas laterales o entre una cadena lateral y el N o C terminal.

10 En otra forma de realización preferida alternativa más, el perfil de WGM de la partícula microesferoidal modula de forma detectable cuando se une o se asocia de otro modo una molécula de un carbohidrato o un análogo de la misma, a la superficie de la partícula microesferoidal.

15 En una forma de realización particularmente preferida, la molécula de carbohidrato es una molécula de glucosaminoglucano (GAG) o una molécula de tipo GAG.

20 Los GAG son ubicuos y juegan papeles fundamentales en muchos de los procesos inflamatorios del cuerpo humano. Estos polisacáridos de elevado peso molecular contribuyen a procesos tales como la metástasis cancerosa, la artritis, el rechazo de trasplantes y el asma, y por lo tanto una mayor comprensión de estos procesos podría conducir a fármacos mejorados para el posible tratamiento de dichas afecciones. Actualmente, uno de los GAG mejor conocidos es la familia de las heparinas de los polisacáridos sulfatados, y la actividad anticoagulante de estas moléculas es bien comprendida.

25 Los GAG heparinoides (HLGAG) son un grupo heterogéneo de moléculas (Conrad, Heparin binding proteins. Academic Press, San Diego, 1998; Lander y Selleck, J Cell Biol 148 (2): 227 - 232, 2000). La heparina y el sulfato de heparán, como todos los HLGAG, son largos polisacáridos lineales (Sasisekharan y Venkataraman, Curr Opin Chem Biol 4 (6): 626 - 631, 2000; Casu, Ann NY Acad Sci 556: 1 - 17, 1989; Casu, Adv Carbohidr Chem Biochem 43: 51 - 134, 1985). Son sintetizados en forma de cadenas no sulfatadas de unidades repetitivas de disacáridos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y glucosamina (GlcN) que, en el aparato de Golgi, son modificados en varios sitios a lo largo de su longitud. La heparina es modificada más ampliamente que el sulfato de heparán y la mayor parte de las unidades de GlcN son modificadas por un grupo sulfato para transformarse en GlcN N-sulfatada, y la mayoría de las unidades de GlcA son convertidas en ácido idurónico (IdoA) a través de la acción de la epimerasa. 30 Los HLGAG son heterogéneos dado que las modificaciones en las cadenas de sulfato son a menudo incompletas. El resultado es amplias regiones de modificaciones intermedias.

35 Por lo tanto, por ejemplo, las cadenas de sulfato de heparán consisten en dominios muy sulfatados estructuralmente flexibles ricos en IdoA 2-O-sulfatado que se alternan con regiones de una baja sulfatación consistentes predominantemente en N-acetil GlcN y GlcA, que tienen una estructura rígida. Los patrones de sulfatación de los HLGAG son complejos, especialmente con respecto a la ubicación de los 6-O-sulfatos. Consecuentemente, no todas las moléculas de HLGAG son idénticas. Es el patrón de sulfatación lo que determina ampliamente las características de unión a proteínas de un HLGAG en particular.

40 Algunas proteínas sólo se unen a unos motivos estructurales en particular de un HLGAG y, por el contrario, algunos GAG sólo se unen a unos sitios o regiones en particular de una proteína. La anti-trombina III, por ejemplo, se une a una única secuencia de pentasacárido que muestra una disposición particular de los grupos sulfato y el pentasacárido de heparina se une a un sitio específico de la proteína anti-trombina III (Whisstock et al. J Mol Biol 301: 1287 - 1305, 2000). Tanto el factor de crecimiento derivado de fibroblastos básico (FGF-2) como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) se unen a la heparina, pero las estructuras de la heparina que son esenciales para la unión son bastante diferentes para cada uno y son diferentes a las requeridas por la anti-trombina III (Maccarana et al. J Biol Chem 268 (32): 23898 - 23905, 1993; Lyon et al. J Biol Chem 269: 11216 - 11223, 1994). Además, se ha

demostrado que la heparina se une a una región en particular del FGF-2 (Faham et al. Science 271: 1116 - 1120, 1996).

El FGF-2 reconoce un motivo que contiene un único IdoA 2-O-sulfato en una posición definida, mientras que para el HGF, la ubicación de los grupos de GlcN 6-O-sulfato es crítica. Algunas moléculas de heparina de una preparación portarán tanto el pentasacárido de unión a la anti-trombina III como el motivo de unión al FGF-2, mientras que otras portarán el motivo de unión al HGF y el motivo de unión al FGF-2 y no el pentasacárido de unión a la anti-trombina III. De hecho, de media, sólo un tercio de las moléculas de una preparación de heparina portan el pentasacárido de unión a la anti-trombina III (Conrad, 1998, *supra*).

Las moléculas de tipo GAG también pueden derivar de fuentes distintas a mamíferos. Por ejemplo, el polisacárido capsular de *E. coli* K5 está formado por unidades alternas de  $\alpha$ -N-acetil glucosamina ( $\alpha$ -GlcNAc) y ácido  $\beta$ -glucurónico ( $\beta$ -GlcA) y no contiene sulfato ni otros grupos cargados. El esqueleto de heparina consiste en el siguiente motivo  $\alpha$ -GlcNAc,  $\beta$ -GlcA,  $\alpha$ -GlcNAc, ácido  $\beta$ -idurónico ( $\beta$ -IdoA) con diversos grados de sulfatación. La única diferencia entre el GlcA y el IdoA es la configuración del grupo ácido carboxílico del C-5, por lo tanto, el esqueleto de heparina y el esqueleto de *E. coli* K5 tienen una estructura extremadamente similar.

Un cambio detectable en el perfil de WGM de la partícula microesferoidal, con respecto a un perfil inicial de WGM, es indicativo de la unión o de la interacción entre la molécula y el compañero de unión analito de la molécula.

De acuerdo con la invención, "un cambio detectable en el perfil de WGM" comprende un desplazamiento espectral en uno o más picos del perfil de WGM.

Por lo tanto, un cambio detectable puede comprender bien un desplazamiento hacia el rojo o bien un desplazamiento hacia el azul de uno o más picos de un perfil de WGM con respecto a otro perfil de WGM.

Según se usa en el presente documento el término "desplazamiento hacia el rojo" se refiere al desplazamiento del punto de amplitud máxima de uno o más picos en un perfil de WGM hacia una longitud de onda más larga. A pesar del nombre "rojo", un desplazamiento hacia el rojo puede producirse en cualquier parte del espectro electromagnético y no está limitado a la luz visible. Según se usa en el presente documento, el término "desplazamiento hacia el rojo" incluye cualquier desplazamiento de un pico hacia una longitud de onda más larga. Por el contrario, el término "desplazamiento hacia el azul" se refiere a cualquier movimiento de un pico hacia una longitud de onda más corta.

En una forma de realización particularmente preferida, el desplazamiento hacia el rojo o el desplazamiento hacia el azul de un pico en un perfil de WGM comprenden normalmente un cambio en la longitud de onda de la amplitud máxima del pico de entre aproximadamente 1 y 100 nm. La referencia a entre 1 y 100 nm incluye longitudes de onda de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 nm. En una forma de realización en particular, el desplazamiento hacia el rojo o el desplazamiento hacia el azul de un pico en un perfil de WGM comprenden un cambio en la longitud de onda de la amplitud máxima del pico de entre aproximadamente 1 y 20 nm, lo que incluye longitudes de onda de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 nm. Aunque se ha ejemplificado específicamente con respecto a los desplazamientos de longitudes de onda de los picos de la luz visible, la invención también contempla desplazamientos hacia el rojo y desplazamientos hacia el azul equivalentes y/o proporcionados en otras regiones del espectro electromagnético.

El perfil de WGM de una partícula microesferoidal según se describe en el presente documento puede determinarse mediante el uso de cualquier método conveniente que sería evidente para el experto en la materia. Esencialmente puede usarse cualquier método de detección que pueda detectar una o más longitudes de onda de radiación electromagnética para detectar un perfil de WGM. Preferiblemente, el medio de detección es lo suficientemente sensible como para que pueda diferenciar los picos del perfil de WGM, más preferiblemente, el medio de detección puede diferenciar entre dos picos que están separados al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100 nm entre sí. Algunos medios particularmente convenientes que pueden usarse para la determinación del perfil de WGM de una partícula microesferoidal incluyen un citómetro de flujo, un lector de matrices y un microscopio confocal.

Según se usa en el presente documento el término "microscopio confocal" incluye en su ámbito microscopios confocales de barrido por láser (LSCM) y microscopios confocales multifotónicos.

La partícula microesferoidal puede ser inmovilizada sobre un soporte sólido.

Según se usa en el presente documento, el término "soporte sólido" se refiere a cualquier matriz sólida sobre la que pueda ser inmovilizada una partícula microesferoidal. En algunas formas de realización preferidas de la invención, el soporte sólido comprende un soporte sólido que permite la detección del perfil de WGM de la partícula microesferoidal inmovilizada en el mismo. Consecuentemente, los soportes sólidos preferibles son aquellos que pueden usarse para la inmovilización de una partícula microesferoidal para su análisis mediante el uso de un microscopio confocal. En una forma de realización particularmente preferida, el soporte sólido es un portaobjetos de microscopio.

El método de la presente invención puede usarse en las siguientes aplicaciones: control medioambiental, tal como de la calidad del agua (*Legionella*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, en origen) y puntos de diagnóstico y tratamiento, patógenos y toxinas aerotransportados, el cribado de interacciones proteína:proteína, el cribado de interacciones proteína:carbohidrato y el cribado de fármacos, y el cribado de bibliotecas de moléculas pequeñas.

El multiplexado está disponible debido a la capacidad de tener dos o más conjuntos de partículas microesferoidales. Las partículas de un conjunto pueden tener un marcador común ópticamente detectable y/o un tamaño común y/o una partícula de unión inmovilizada común. Por lo tanto, pueden detectarse múltiples analitos mediante el uso de una multiplicidad de conjuntos de partículas microesferoidales.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

*Producción y marcaje de partículas microesferoidales marcadas con puntos cuánticos*

Normalmente, las partículas microesferoidales pueden ser preparadas superponiendo microesferas comerciales de cualquier composición o tamaño deseados con puntos cuánticos. Los materiales más robustos deberían ser recubiertos con otra capa de sílice para minimizar las interacciones con el medio o los adsorbatos.

Sin limitar las muchas posibilidades, en el presente documento se describe un proceso típico usado para la preparación de partículas microesferoidales mediante el uso de microesferas de vidrio / sílice.

Se colocaron 0,1 g de microesferas de sílice comercial de cinco micrones de diámetro en 20 ml de 2-propanol y se añadieron 20 microlitros bien de mercaptopropilsilano (MPS) o bien de aminopropilsilano (APS). La solución se calentó a reflujo a 80 °C para permitir la quimisorción del MPS o del APS, lo que dio lugar a la creación de grupos mercaptano o amino en la superficie de la microesfera. El exceso de MPS o de APS se eliminó mediante centrifugación.

En lugar de una microesfera funcionalizada con silano, las microesferas también pueden ser activadas mediante la adsorción de un polímero catiónico. Por ejemplo, sin restricción alguna y para ilustrar el método, se mezclaron 0,1 g de microesferas de sílice con 20 ml de una solución acuosa de PEI (polietileno imina) (1 g/l, NaCl 0,5 M). Después de reaccionar durante una hora, la solución se centrifugó para eliminar el exceso de polímero y se resuspendió en agua pura. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Los QD se adsorbieron en las microesferas recubiertas con APS o con PEI mediante la adición de una suspensión de QD en cloroformo a una suspensión de las microesferas en 2-propanol seco. La cantidad añadida era suficiente como para recubrir las microesferas con aproximadamente 10 monocapas. Las microesferas y los QD se equilibraron durante 10 minutos en un tambor rotatorio. Después, las microesferas recubiertas se separaron mediante centrifugación.

Las microesferas marcadas con QD pueden ser estabilizadas adicionalmente mediante el recubrimiento con más sílice. Esto se realizó de dos formas:

En primer lugar se añadieron 5 µl de APS en agua alcalina o cloroformo (1 ml) a las partículas microesferoidales de sílice recubiertas con QD y se dejaron reaccionar durante 1 hora con agitación mediante el uso de un tambor rotatorio a 0,2 Hz. Después de eliminar el exceso de APS mediante ciclos repetidos de centrifugación / resuspensión en agua alcalina o cloroformo, se añadieron 5 ml de "sílice activa" (5 µl de silicato de sodio al 2 % p/p en 5 ml de agua a pH 8,7) a las partículas y se dejaron reaccionar durante una noche. Esto dio como resultado la deposición de aproximadamente 3 - 5 nm de sílice sobre las partículas. El exceso de sílice libre nucleada se separó mediante centrifugación y las partículas se redispersaron en 2-propanol:agua (4:1). Finalmente la capa sílice se aumentó mediante el uso de TEOS y de amoniaco según fuera necesario para obtener el espesor deseado.

El segundo procedimiento implicaba el crecimiento directo de sílice en etanol sin una etapa previa de deposición en agua. Esto consiste en la adsorción de la PVP y el posterior crecimiento de la sílice. Se añadió suficiente PVP (PM de 30.000) como para proporcionar 60 moléculas de PVP por nm<sup>2</sup> de superficie, disolviéndola en cloroformo:2-propanol (9:1). Esto se añadió inmediatamente a las microesferas, a la mezcla se le aplicaron ultrasonidos y se dejó reaccionar durante una noche con agitación.

Las microesferas se centrifugaron (5 s a 3.800 rpm para sílice de 5 micrones) y se redispersaron en 2-propanol (en un primer momento). Se añadió  $\text{NH}_3$  (al 4,2 %) seguido de TEOS (al 10 % en volumen en 2-propanol) con agitación y se dejó depositar durante 12 horas.

5 En la Figura 1A se muestra un esquema que muestra el procedimiento para la producción de las partículas microesferoidales marcadas con QD. Este protocolo genérico permite la preparación de microesferas de sílice fotoestables, de cualquier tamaño práctico desde 1 micrón hasta 100 micrones, marcadas con una o más nanopartículas diferentes con diferentes propiedades de emisión.

10 En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de partículas microesferoidales marcadas con QD según se observan bajo un microscopio confocal.

Ejemplo 2

15 *Detección del ADN*

Se conjugaron microesferas Q-Sand con ADN, formando un complejo con una microesfera Q-Sand y ADN 48-mer inmovilizado. La posición de la quinta base del 48-mer era una base de timidina con una amina incorporada. Esta amina se usó para marcar el ADN con un éster de NHS BODIPY 630/650 mediante el uso de una reacción de condensación estándar. El perfil de WGM para la microesfera Q-Sand conjugada con el ADN 48-mer se muestra en la Figura 5, panel a.

20 El Panel b de la Figura 5 muestra el perfil de WGM de la microesfera Q-Sand del panel a conjugada con un ADN  $\alpha$ -Transprobe que hibrida con las bases 6 - 24 del ADN conjugado con la microesfera Q-Sand. El perfil de WGM resultante, según se observa en el panel b de la Figura 5, tuvo un desplazamiento de aproximadamente 2,4 nm para todo los picos. Además, la reducción en el factor Q (una medida de la calidad del microresonador) fue de aproximadamente 5X.

30 Finalmente, las microesferas Q-Sand mostradas en la Figura 5, panel a, se hibridaron con el producto de una PCR que contenía una región complementaria de las bases de ADN 25 - 48 del ADN 48-mer. El producto de la PCR se generó a partir de ADN de células HeLa y se preparó para su hibridación mediante una digestión con ExoI y Lambda Exo. El perfil de WGM resultante estaba desplazado 2,4 nm para todos los picos. El factor Q tuvo una caída de aproximadamente 10X con respecto al de control Q-Sand solo.

35 Ejemplo 3

*Funcionalización superficial de las partículas microesferoidales de sílice*

40 La funcionalización superficial de las partículas microesferoidales de sílice puede llevarse a cabo de la misma forma a la usada para las partículas microesferoidales de sílice iniciales, poniendo a reflujó las partículas microesferoidales de sílice-QD en 2-propanol que contiene MPS o APS u otro silano para activar la superficie y añadiendo grupos funcionales que reaccionan con el bioadsorbato objetivo.

Preparación de conjugados

45 Se trataron partículas microesferoidales de 5 micrones marcadas con QD de color naranja que emitían a 560 nm y se recubrieron con sílice de 10 nm con MPS, se centrifugaron y se lavaron. Las microesferas y se dejaron reaccionar en agua con el conjugado, tal como un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo, un carbohidrato o similar, durante aproximadamente 1 hora. Después se centrifugaron y se lavaron para producir las microesferas QD bioactivas (BQDM).

Ensayos de unión:

55 Se colocan varias BQDM en un portaobjetos de microscopio bajo un microscopio confocal. Se colocó una gota de la solución de referencia en las microesferas y se recogieron los espectros mediante el uso de un láser de excitación a 488 nm. Después se añadió un microlitro de una solución que contiene un agente que supuestamente interactúa con el conjugado de las BQDM a la gota, y se dejó reaccionar durante media hora. Se recogió el espectro y se detectó cualquier cambio en el perfil de WGM, tal como un desplazamiento hacia el rojo o un desplazamiento hacia el azul de uno o más picos, en el que la observación de un cambio es indicativa de una interacción entre el conjugado de la partícula microesferoidal y el agente añadido exógenamente.

Ejemplo 4

*Diferenciación de las partículas microesferoidales mediante el uso del perfil de WGM*

65

Diferenciación por tamaños

Se produjeron partículas microesferoidales de diferentes tamaños mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento. Se determinaron los perfiles de WGM de cada uno de los diferentes tamaños de partícula mediante el uso de un microscopio confocal.

5 Según se muestra en la Figura 3, el perfil de WGM mostrado por cada una de las partículas de diferente tamaño cambia con el radio de la partícula microesferoidal.

#### Diferenciación por compuesto superficie compuesto

10 Se produjeron partículas microesferoidales QD marcadas que comprenden diferentes moléculas unidas a su superficie mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento. Se determinaron perfiles de WGM de cada una de las diferentes partículas microesferoidales mediante el uso de un microscopio confocal.

15 Según se muestra en la Figura 4, QD se refiere a una partícula microesferoidal marcada con un QD sin ningún compuesto unido a su superficie, PSS se refiere a una partícula microesferoidal que comprende sulfonato de poliestireno (PSS) unido, mientras que PVP se refiere a una partícula microesferoidal con una monocapa de polivinilpirrolidona (PVP) adsorbida.

20 Como es evidente a partir de los datos, las partículas microesferoidales marcadas con QD son sensibles a la unión de un compuesto en su superficie. Adicionalmente, el desplazamiento observado en el perfil de WGM también parece ser sensible a la naturaleza del compuesto que se une a la superficie.

#### Ejemplo 5

25 *Detección de supuestos compañeros de unión en una muestra*

Se conjugan microesferas de sílice con grupos funcionales sulfhidrilo en su superficie, a través de una molécula de acridito en 5', con oligonucleótidos monocatenarios que previamente han sido marcados con un colorante fluorescente.

30 Las microesferas con el oligonucleótido marcado unido se hibridan entonces con oligonucleótidos o con los productos de una PCR complementarios o relacionados.

35 Las microesferas hibridadas y no hibridadas se lavan abundantemente con agua Milli Q y se puntean en un cubreobjetos de microscopio y se dejan secar al aire.

40 Entonces se examinan las microesferas secas con un microscopio confocal con láser y filtros de longitud de onda, apropiado para los colorantes fluorescentes que se están usando. Se registran los modos de galería susurrante generados y se comparan para determinar el desplazamiento en la longitud de onda del patrón del modo de galería susurrante entre las microesferas con ADN adicional hibridado en la superficie de la microesfera y las microesferas que sólo tienen unido el oligonucleótido marcado.

45 El desplazamiento resultante en el patrón de longitudes de onda de los modos de galería susurrante puede usarse potencialmente para determinar la presencia o la ausencia de secuencias complementarias de ADN en las muestras de prueba.

#### Ejemplo 6

50 *Cribado de los compuestos de ensayo*

Las partículas microesferoidales son producidas mediante el uso de los protocolos descritos en el presente documento. Las diferentes microesferas son identificables por su perfil de WGM. Aunque existe una cierta variabilidad entre las microesferas de un tipo particular, el perfil de WGM para un objetivo dado con un emisor fluorescente dado en una microesfera de un tamaño dado será prácticamente equivalente. Pueden ensayarse simultáneamente al menos 50 microesferas Q-Sand diferentes.

60 Las partículas microesferoidales se disponen en matrices en portadores de reacción. Estos portadores son portaobjetos de vidrio enrejillados con regiones para los diferentes compuestos. Se escanean las rejillas y se calculan y guardan los WGM. Esta lectura es el control de los WGM previo al compuesto.

Cada portador de reacción se ensaya con una o más moléculas de ensayo.

La unión no específica es atenuada mediante etapa(s) de lavado.

65 Después del lavado, el portador de reacción se escanea de nuevo. Los positivos son identificados mediante los desplazamientos en los WGM en comparación con los WGM de control de la molécula previos al ensayo.

Ejemplo 7

Protocolo de síntesis de las microesferas

5 Materiales:

(3-aminopropil)trimetoxisilano (APS al 99 %), (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPS, al 95 %), ortosilicato de tetraetilo (TEOS, al 98 %), polivinilpirrolidona (PVP, PM de 40.000), hidróxido de amonio (al 29,1 % en peso de NH<sub>3</sub> en agua) (Sigma-Aldrich). Partículas de sílice de 5 µm (Bangs Laboratories, Inc.) cloroformo (CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>) y 2-propanol (AnalaR, Merck, Kilsyth, Victoria).

Instrumentos:

15 Microscopía de fluorescencia Olympus (Olympus, Bonn, Alemania), rueda rotativa monitorizada, Shake and Stack (ThermoHybaid, Glochester, Reino Unido), limpiador ultrasónico (Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, EE.UU.).

Notas generales importantes:

- \* Esterilizar todos los viales de vidrio y los agitadores magnéticos con etanol y dejar secar completamente.
- \* Usar puntas filtradas para todas las pipetas.
- \* Todos los viales de vidrio deben tener un fondo plano y un tapón de rosca con un volumen de entre 1,5 - 5 ml.
- \* Poner parafilm en todos los viales de reacción de vidrio con tapón de rosca cuando la reacción requiere agitación durante una noche.
- \* La funcionalización de la superficie de las microesferas de sílice se llevó a cabo según recomienda Brendan Toohey.
- \* La aplicación de ultrasonidos durante las etapas de lavado y de disolución de la PVP no es esencial

Funcionalización de la superficie de las microesferas de sílice

1. Limpiar meticulosamente un matraz de fondo redondo x1 con acetona y x2 con 2-propanol.
2. Añadir 20 ml de 2-propanol al matraz de fondo redondo limpio y colocarlo en una manta calefactora, usar fijaciones en la tapa de plástico para mantener las tapas ajustadas y comenzar a hacer pasar agua a través de la línea de Shlenk.
3. Se necesita calentar el 2-propanol a 80 °C con agitación constante para que la reacción tenga lugar de forma óptima, por lo tanto con un termómetro controlando constantemente la temperatura del 2-propanol hasta que se alcance la temperatura, asegurarse de que el termómetro se ha limpiado con etanol antes de cada comprobación de la temperatura.
4. Una vez alcanzada la temperatura, añadir 20 µl de APS y 0,1 g de microesferas de Bang sin tratar, lo que supone 1 ml de la suspensión de microesferas del fabricante, y cocer durante 2 horas con agitación constante.
5. Después del cocimiento, transferir el contenido del matraz a unos matraces apropiados para un lavado.
6. Lavar x2 con 2-propanol y después resuspender en 10 ml de agua Milli-Q y sellar el vial con parafilm.

PARTE A: preparación de la PVP

<i>Etapa</i>	<i>Esencial</i>	<i>Recomendado</i>	<i>Evitar</i>
1. Pesar la cantidad necesaria de PVP (se usan 60 moléculas de PVP por nm <sup>2</sup> de S.A. de esferas de sílice) en un vial de vidrio con tapón de rosca de 15 ml			
2. Disolver en 2 ml del disolvente 9:1 (9 ml) CHCl <sub>3</sub> : (1 ml) 2-propanol con una agitación suave durante 1 hora o agitar y agitar vorticialmente hasta que el medio sea transparente	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ El medio con la PVP disuelta es transparente</li> <li>◆ La PVP se disuelve completamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Después de la suspensión de la PVP en 1 - 2 ml de disolvente, agitar y agitar vorticialmente</li> <li>◆ Preparar la PVP una hora antes de su uso o disolviéndola con agitación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Calentar durante la aplicación de ultrasonidos</li> <li>◆ Aplicar un exceso de ultrasonidos durante 15 min</li> </ul>
3. Recombinar con solución madre 9:1			

45

PARTE B: pasivación de nanocristales a microesferas de sílice funcionalizadas de 5 µm

Etapa	Esencial	Recomendado	Evitar
1. Mezclar 200 - 500 µl de una suspensión de SiO <sub>2</sub> funcionalizada con APS / MPS ((0,02 g/ ml) y 50 - 200 µl de puntos Q en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml	Agitar manualmente durante 1 - 2 minutos	Las microesferas de sílice funcionalizadas con APS tienen una mayor afinidad por los puntos cuánticos	No agitar
2. Poner en una rueda motorizada a Min- rpm	♦ Al menos 15 min - 1 hora ♦ Min-rpm	Dejar en rotación durante 1 hora	
3. Añadir 2-propanol para romper las 2 fases, agitar, agitar vorticialmente y después centrifugar a 3.600 rpm 10 s, después desechar el sobrenadante	Agitar y agitar vorticialmente y centrifugar a 3.600 rpm durante 10 s ♦ Comprobar que el sedimento fluoresce bajo luz UV		
4. Resuspender el sedimento en CHCl <sub>3</sub> , agitar y aplicar ultrasonidos (Blitz), después centrifugar a 3.600 rpm 10 s. Desechar el sobrenadante y <u>repetir</u> el lavado	♦ Agitar vigorosamente y aplicar ultrasonidos ♦ Comprobar que el sedimento fluoresce bajo luz UV cuando se ha desechado el sobrenadante después de lavado final, si lo hace, continuar hacia la etapa 5, de otro modo comenzar de nuevo	También se puede usar 2- propanol como disolvente de lavado	
5. Resuspender el sedimento lavado en la solución de PVP preparada en la PARTE A, después combinar con la solución madre de PVP y aplicar ultrasonidos poco después, dejando en agitación durante una noche.	♦ Resuspender el sedimento en una porción (1 - 2 ml) de la solución de PVP y pipetear 2 - 3 veces para maximizar la recuperación de muestra y después combinar con la solución madre de PVP ♦ Usar un vial de vidrio con tapón de rosca de 15 ml como recipiente de reacción	Añadir el sedimento resuspendido con agitación	
6. Dejar en agitación durante una noche. Si la muestra es correcta, lavar x2 en 2-propanol, después cubrir con una lámina de aluminio y almacenar a 4 °C	♦ Precintar el vial con tapón de rosca con parafilm ♦ Movimiento de agitación suave ♦ No calentar		Viales de fondo cóncavo

PARTE C: recubrimiento con TEOS de microesferas dopadas con nanocristales protegidas con PVP

5

Etapa	Esencial	Recomendado	Evitar
1. Tomar 1 - 5 ml de tu muestra de microesfera protegida con PVP		♦ Aplicar ultrasonidos (sólo Blitz) a la muestra	
2. Combinar a 1:1 con solución madre de NH <sub>3</sub> al 4,2 % (por ejemplo, 1 ml de microesferas protegidas con PVP, después 1 ml de solución de NH <sub>3</sub> al 4,2 %)			
3. Con agitación, administrar 100 µl de TEOS [5 µl de TEOS puro en 1 ml de una solución de 2-propanol (solución a 1:200)] a la solución de microesferas de NH <sub>3</sub> / PVP y dejar en agitación durante una noche.	Añadir el TEOS mientras la punta está en el medio, pero añadir en un lateral del vial o en el centro del medio de reacción Precintar el vial con tapón de rosca con parafilm Vial con tapón de rosca de fondo plano Movimiento de agitación suave ♦ ¡NO CALENTAR!		Viales de fondo cóncavo
4. Tras haber realizado con éxito el recubrimiento con TEOS, puede llevarse a cabo el proceso de lavado con 2-propanol, es decir, añadir 1 ml de 2- propanol, agitar bien, aplicar ultrasonidos (Blitz), después centrifugar la	♦ Cubrir la muestra con una lámina de aluminio y almacenar a 4 °C ♦ Repetir el lavado al menos 3x		

muestra a 3.600 rpm durante 10 s y desechar el sobrenadante y resuspender en 2-propanol reciente.			
---------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--

## Bibliografía

- 5 Baird y Myszka, J Mol Recognit 14: 261 - 268, 2001;  
Casu, Ann NY Acad Sci 556: 1 - 17, 1989;  
Casu, Adv Carbohidr Chem Biochem 43: 51 - 134, 1985;  
Conrad, Heparin binding proteins Academic Press, San Diego, 1998;  
Faham et al. Science 271: 1116 - 1120, 1996;  
10 Karlsson y Stahlberg, Anal Biochem 228: 274 - 280, 1995;  
Lander y Selleck, J Cell Biol 148 (2): 227 - 232, 2000;  
Li et al. Science 299: 840 - 843, 2003;  
Lin et al. Science 278: 840 - 843, 1997;  
Lyon et al. J Biol Chem 269: 11216 - 11223, 1994;  
15 Maccarana et al. J Biol Chem 268 (32): 23898 - 23905, 1993;  
Malinqvist, Nature 361: 186 - 187, 1993;  
Rich y Myszka, J Mol Recognit 15: 352 - 376, 2002;  
Sasisekharan y Venkataraman, Curr Opin Chem Biol 4 (6): 626 - 631, 2000;  
Vollmer et al. Biophysical Journal 85: 1974 - 1979, 2003;  
20 Whisstock et al. J Mol Biol 301: 1287 - 1305, 2000;

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la detección de un analito, comprendiendo dicho método poner en contacto un conjunto de partículas microesferoidales con una muestra que supuestamente comprende dicho analito, en el que cada partícula de dicho conjunto de partículas microesferoidales comprende un compañero de unión inmovilizado de dicho analito, y en el que el conjunto de partículas tiene un perfil de modo de galería susurrante (WGM) definido, en el que la unión de dicho analito a dicho compañero de unión inmovilizado da como resultado un cambio en dicho perfil de WGM indicado por un desplazamiento espectral en uno o más picos del perfil de WGM de dicho conjunto de partículas microesferoidales, lo que es indicativo de la presencia de dicho analito, y la detección de la unión entre dicho analito y el compañero de unión mediante la detección de dicho desplazamiento espectral en uno o más picos de dicho perfil de WGM, caracterizado por que cada partícula de dicho conjunto de partículas microesferoidales comprende un punto cuántico como marcador ópticamente detectable, y la emisión desde dicho marcador ópticamente detectable establece dicho perfil de WGM.
2. El método de la reivindicación 1 en el que dicha partícula microesferoidal comprende un material seleccionado de la lista que consiste en: sílice, látex, titanía, dióxido de estaño, ytria, alúmina, otros óxidos metálicos binarios, perovskitas y otros óxidos metálicos piezoeléctricos, sacarosa, agarosa y otros polímeros.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha partícula comprende sílice.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dichas partículas son esféricas.
5. El método de la reivindicación 1 en el que dicho marcador ópticamente detectable es detectable en uno cualquiera o más de los intervalos de longitudes de onda del ultravioleta, del visible, del infrarrojo cercano (NIR) y/o del infrarrojo (IR).
6. El método de la reivindicación 5 en el que dicho marcador ópticamente detectable es detectable en el intervalo de longitudes de onda del visible.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho compañero de unión inmovilizado comprende una molécula de ácido nucleico.
8. El método de la reivindicación 7 en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende ADN.
9. El método de la reivindicación 7 en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende ARN.
10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho compañero de unión inmovilizado comprende un péptido, un polipéptido o una proteína.
11. El método de la reivindicación 10, en el que dicho péptido, polipéptido o proteína es una enzima.
12. El método de la reivindicación 10, en el que dicho péptido, polipéptido o proteína es un anticuerpo.
13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho compañero de unión inmovilizado comprende una molécula de un carbohidrato.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho carbohidrato es una molécula de un glucosaminoglucano.
15. El método de la reivindicación 1 en el que la modulación de dicho perfil del WGM comprende un desplazamiento hacia el rojo de uno o más picos de dicho perfil.
16. El método de la reivindicación 1 en el que la modulación de dicho perfil del WGM comprende un desplazamiento hacia el azul de uno o más picos de dicho perfil.
17. El método de la reivindicación 15 o 16 en el que el desplazamiento hacia el rojo o el desplazamiento hacia el azul comprende un cambio en la longitud de onda de dicho pico o picos de entre 1 y 100 nm.
18. El método de la reivindicación 17 en el que el desplazamiento hacia el rojo o el desplazamiento hacia el azul comprende un cambio en la longitud de onda de dicho pico o picos de entre 1 y 20 nm.

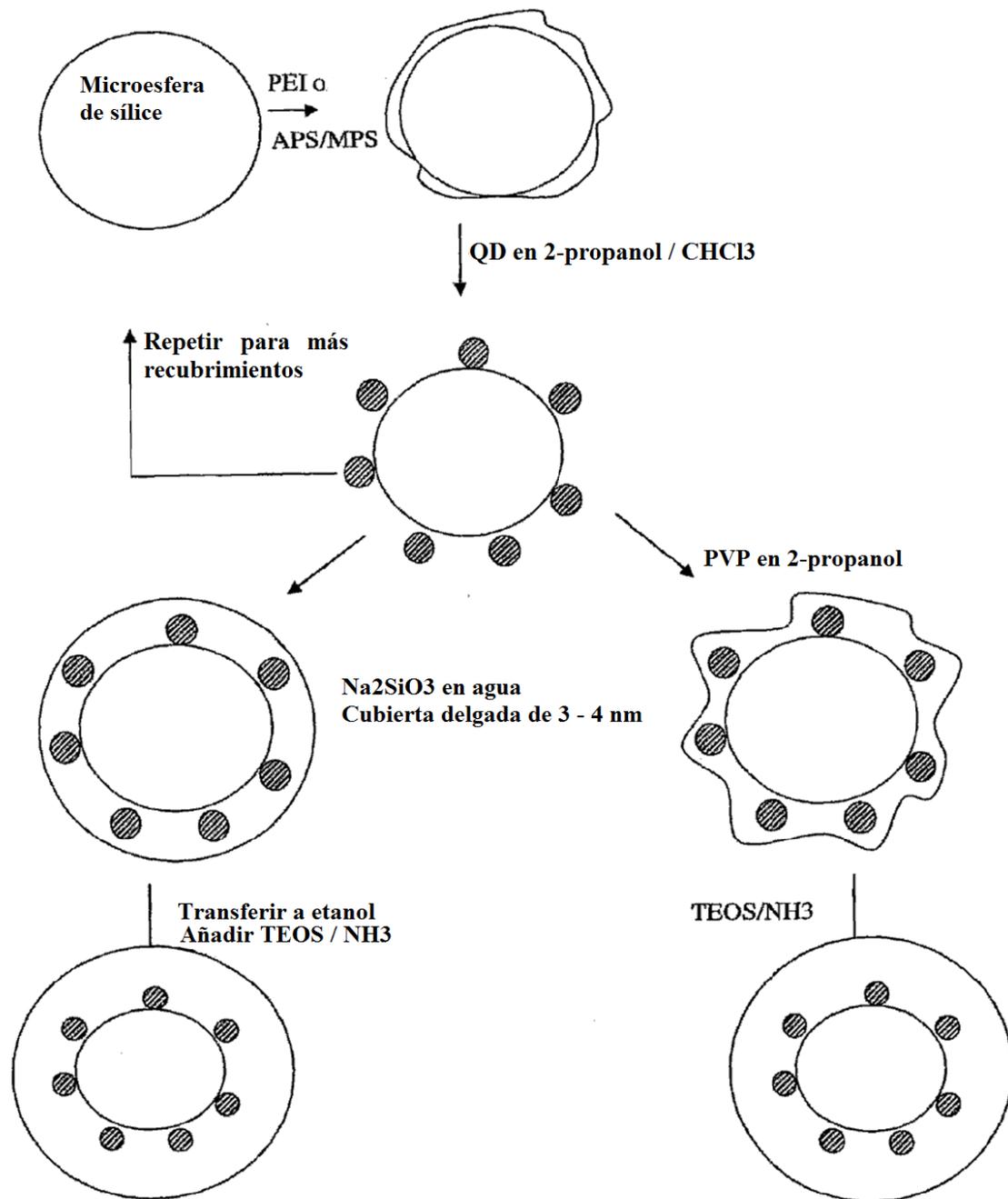


FIGURA 1

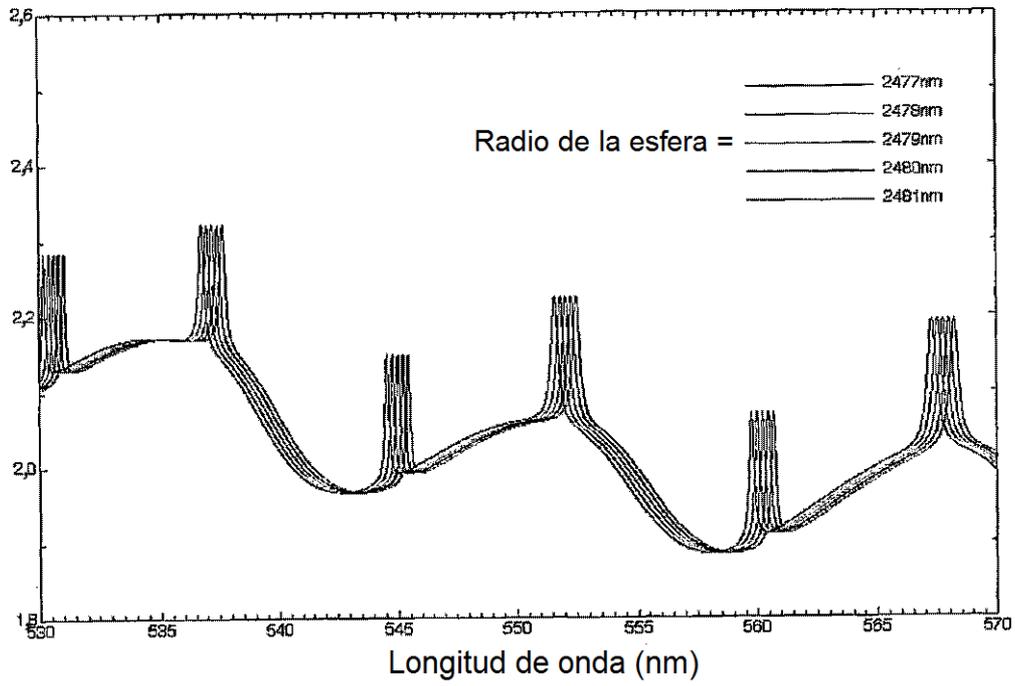
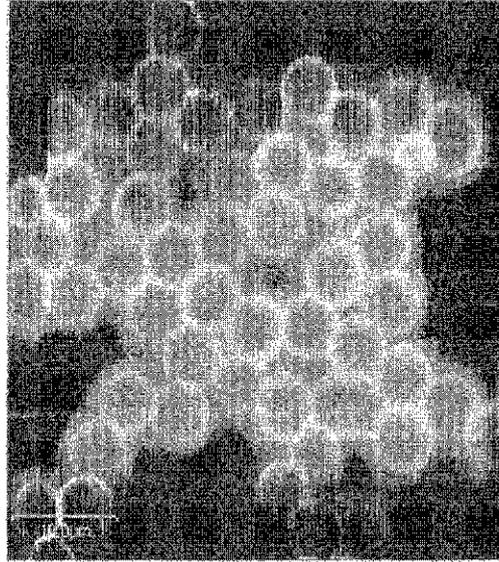
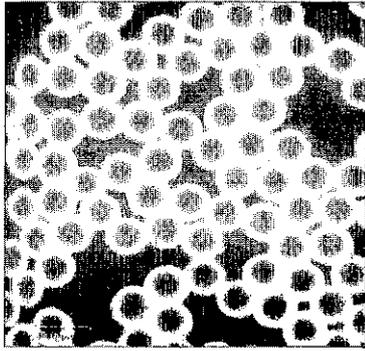


FIGURA 2



**FIGURA 3**

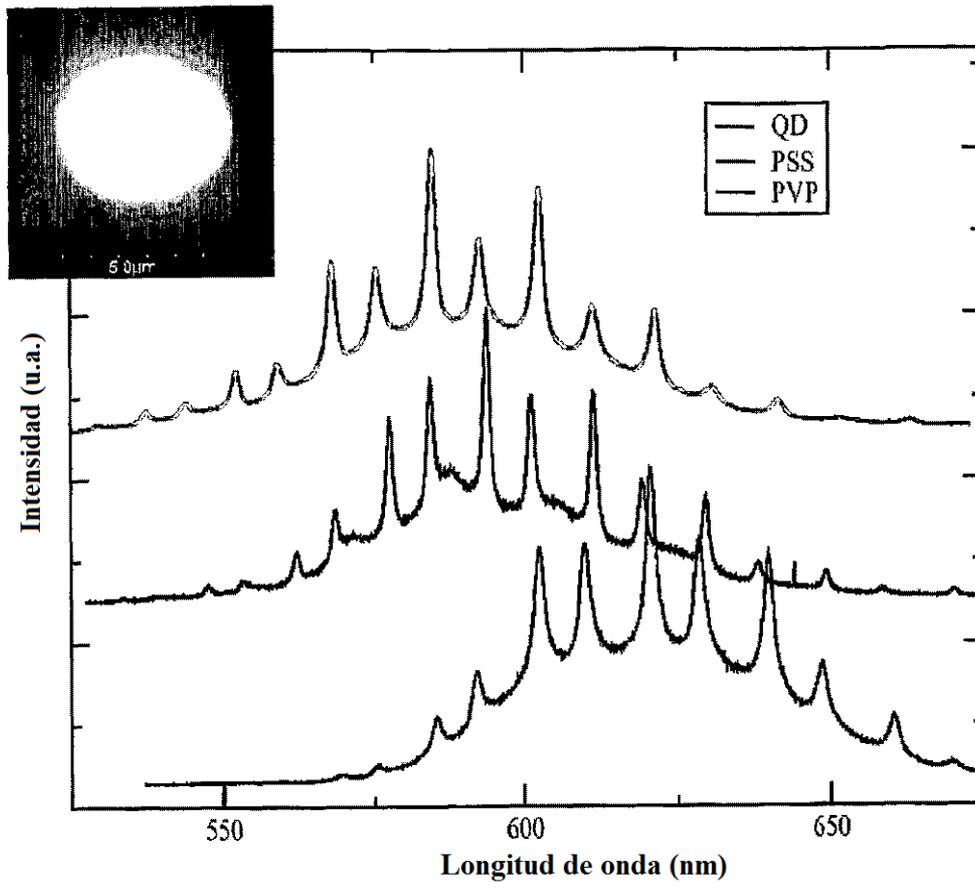
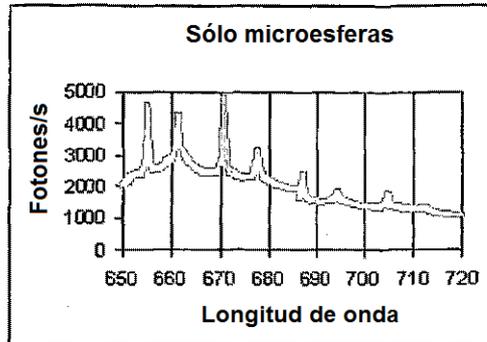
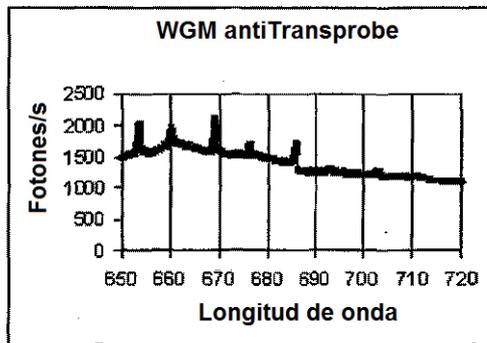


FIGURA 4

a.



b.



c.

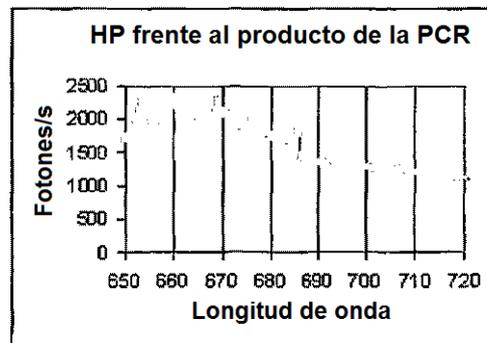


FIGURA 5