

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 904**

51 Int. Cl.:

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2012 E 12799638 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2745091**

54 Título: **Espaciadores largos rígidos para potenciar la cinética de unión en inmunoensayos**

30 Prioridad:

16.11.2011 US 201161560441 P

01.12.2011 EP 11191454

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

11.01.2016

73 Titular/es:

KONINKLIJKE PHILIPS N.V. (100.0%)

High Tech Campus 5

5656 AE Eindhoven, NL

72 Inventor/es:

EVERS, TOON HENDRIK y

KOETS, MAATJE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 904 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

Espaciadores largos rígidos para potenciar la cinética de unión en inmunoensayos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para detectar una molécula diana en una muestra que comprende un recipiente de muestra para la medida de la molécula diana en una muestra, una primera partícula, en el que dicha primera partícula está funcionalizada con una primera molécula de unión que se puede unir específicamente a dicha molécula diana, y una estructura de superficie que comprende una segunda molécula de unión, en el que dicha estructura de superficie cubre un sensor plano o está presente en una segunda partícula, en el que dicha primera partícula puede unir directa o indirectamente dicha segunda molécula de unión de la estructura de superficie; en el que dicha primera y/o segunda molécula de unión se ancla en la superficie de partícula de dicha primera y/o segunda partícula y/o la superficie de sensor plano a través de una molécula de enlazador largo y rígido; en el que la longitud y la consistencia de dicha molécula de enlazador se selecciona de manera que de lugar a una longitud de extensión promedio de dicho enlazador de más de 60 nm; y en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de la presencia o cantidad de una molécula diana en una muestra. La presente invención también describe el uso de una partícula de acuerdo con la invención para detectar una molécula diana en una muestra.

Antecedentes de la invención

La demanda de una asistencia sanitaria generalizada y eficaz mueve el mundo del diagnóstico *in vitro* hacia soluciones integradas inmediatas y de acceso libre. El logro de tales soluciones es difícil: las pruebas necesitan ser rápidas, sensibles, cuantitativas y precisas. Además, la plataforma sobre la que se realiza la prueba necesita ser fácil de usar y compacta.

Los ensayos de afinidad hacen uso de moléculas biológicas para capturar moléculas diana específicas a partir de una muestra y permitir una determinación de su concentración. Típicamente, la captura por afinidad se logra dispersando nano o micropartículas recubiertas con las moléculas de captura en un fluido de muestra (Luchini *et al.*, 2008, Nano Lett., 8(1), 350-361). Por lo tanto, los ensayos basados en afinidad típicos se usan en un amplio número de aplicaciones, tales como ensayos de diagnóstico, detección de biomoléculas en investigación, tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, de este modo, haciendo uso de moléculas de afinidad tales como, por ejemplo, anticuerpos, que están típicamente caracterizados por una alta afinidad de unión hacia una biomolécula específica. En principio, las partículas magnéticas funcionalizadas se atraen a una superficie de sensor, donde las partículas se pueden unir indirectamente, es decir, en virtud de un analito capturado, o directamente para capturar sondas, tales como anticuerpos imprimidos sobre la superficie. El número de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra. Típicamente, en tales aplicaciones de biosensor, las partículas se pueden detectar usando cualquier técnica sensible a las partículas próximas a la superficie, a menudo tales técnicas se basan en la detección óptica, tal como la detección de luz dispersada o reflexión interna total frustrada (RITF) como se describe, por ejemplo, en Bruls *et al.*, Lab Chip, 2009, 9. 2504-3510.

El documento WO 2008/0833 A1 divulga procedimientos, reactivos y aparatos para la detección de agentes. Se describen los formatos de ensayo para la detección de uno o más agentes de interés en una muestra basados en ensayos de tipo sándwich directos e indirectos convencionales.

El documento US 2004/110220 A1 divulga procedimientos y dispositivos para detectar ácidos nucleicos. En particular, el sistema de detección se basa principalmente en nanopartículas que tienen oligonucleótidos anclados en las mismas (conjugados nanopartícula-oligonucleótido). Los oligonucleótidos descritos en los mismos tienen una porción que es complementaria a una porción de la secuencia del ácido nucleico (porción de reconocimiento) para permitir la hibridación a un ácido nucleico diana.

El documento WO 2008/083323 A1 divulga reactivos y aparatos para la detección de agentes. Los aparatos, cámaras de ensayo y procedimientos relacionados utilizan matrices, por ejemplo, matrices de proteínas, matrices de receptores, matrices de ácidos nucleicos útiles para el cribado de fármacos y/o ligandos.

El documento WO 2010/073182 A1 divulga un procedimiento, un dispositivo y un cartucho para medir la troponina I en una muestra usando marcas magnéticas, anticuerpos y un dispositivo sensor. El dispositivo comprende una cámara de reacción que facilita la unión de la troponina I a un anticuerpo antitroponina I monoclonal acoplado a un marcador magnético y a un anticuerpo antitroponina I policlonal acoplado a una superficie de sensor. A continuación, se detecta el marcador magnético sobre la superficie de sensor.

El documento US 2010/008618 A1 divulga materiales y procedimientos que usan una técnica de transducción óptica que emplea la modulación de un acontecimiento de reconocimiento biológico en la superficie de una guía de ondas. Se divulgan enlaces y películas de superficie para el reconocimiento de moléculas marcadas.

5 El documento WO 2009/005552 A2 describe procedimientos y composiciones para la unión multivalente y captura cuantitativa de componentes en una muestra. En particular, se describen la modificación de formatos de ensayo de tipo sándwich convencionales para dar como resultado agentes de unión con "avidez" polivalentes para incrementar la Kd aparente. Esto se logra adhiriendo más de un anticuerpo o antígeno a un "esqueleto" que puede ser un polímero de cadena principal, tal como un ácido nucleico mono o bicatenario, tal como APN, ADN, ARN, etc.

10 El documento US 2009/148863 divulga plataformas de detección basadas en nanopartículas funcionalizadas. En particular, las nanopartículas comprenden un primer componente de monocapa que está adaptado para unirse a un resto biológico, que, a su vez, se puede adaptar para unirse a un analito. La superficie de nanopartícula puede comprender adicionalmente un segundo componente de monocapa, que contribuye a la exposición del primer
15 componente de monocapa sobre la superficie. Las nanopartículas están unidas por medio de una primera y segunda monocapa a una molécula de captura, por ejemplo, un anticuerpo, lo que permite la detección de una molécula individual en tiempo real.

20 El documento EP 1441217A2 describe un ensayo de unión con guía de ondas óptica basado en la detección de la dispersión de luz dirigida hacia elementos de RIT o dispositivos de guía de ondas a través de la inmovilización de miembros de unión específica (SBM) mediante varios medios.

25 El documento US 2005/0048599 divulga la detección de microorganismos sobre un sustrato fijado. La unión se basa en proporcionar una configuración de tipo sándwich y tiene lugar por medio de un componente de unión de etiqueta que une la etiqueta a la diana a través de un medio que es específico para una diana (por ejemplo, anticuerpos o aptámeros). Un componente indicador es detectable por un detector.

30 Sin embargo, una importante desventaja de los ensayos de afinidad de la técnica anterior es el hecho de que la unión de las partículas funcionalizadas que han unido una molécula diana a la superficie todavía es muy lenta, limitante de la velocidad e ineficaz. Un motivo para esta reacción lenta, entre otros, radica en la dificultad de unir una partícula relativamente grande (por ejemplo, ~500 nm) a una superficie por medio de una molécula diana pequeña (por ejemplo, ~10 nm). Esta desproporción se bosqueja en la figura 3, que ilustra los tamaños relativos de diana y partícula. Como consecuencia, no existen muchas orientaciones de los complejos partícula-diana que den como resultado una unión eficaz. No obstante, aunque la partícula puede rotar cuando está en contacto con la superficie, la probabilidad de unión
35 es bastante pequeña.

Por lo tanto, hay una fuerte necesidad de diseñar novedosas estructuras diana-partícula, que se puedan unir eficazmente a una superficie tal como una superficie de sensor plano o una superficie de partícula.

40 **Objetivos y resumen de la invención**

La presente invención aborda estas necesidades y proporciona medios para potenciar la eficacia de unión de las partículas a superficies. El objetivo anterior se consigue en particular mediante un dispositivo para detectar una molécula diana en una muestra que comprende un recipiente de muestra para la medida de la molécula diana en una
45 muestra, una primera partícula, en el que dicha primera partícula está funcionalizada con una primera molécula de unión que se puede unir específicamente a dicha molécula diana, y una estructura de superficie que comprende una segunda molécula de unión, en el que dicha estructura de superficie cubre un sensor plano o está presente en una segunda partícula, en el que dicha primera partícula puede unir directa o indirectamente dicha segunda molécula de unión de la estructura de superficie; en el que dicha primera y/o segunda molécula de unión se ancla en la superficie de
50 partícula de dicha primera y/o segunda partícula y/o la superficie de sensor plano a través de una molécula de enlazador largo y rígido; en el que la longitud y la consistencia de dicha molécula de enlazador se selecciona de manera que de lugar a una longitud de extensión promedio de dicho enlazador de más de 60 nm; y en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

55 La invención describe cómo la probabilidad de unión de una partícula grande a una superficie se puede incrementar significativamente anclando la diana en las moléculas de enlazador de partícula que tienen una longitud determinada. De forma sorprendente, se pudo observar que proporcionar una molécula de espaciador o enlazador largo y rígido supera las dificultades de unión de las partículas usadas en la técnica anterior y, de esta manera, posibilita una unión
60 más eficaz.

La fig. 4 ilustra el principio que subyace a la presente invención. El número de orientaciones posibles en que una partícula se puede unir a la superficie incrementa fuertemente si el punto de anclaje está situado más lejos de la partícula. Sin embargo, el uso de una molécula de espaciador largo no resuelve necesariamente el problema. La figura
65 5 ilustra que si incluso se usa un enlazador muy largo, por ejemplo, una molécula de PEG, la flexibilidad de la molécula

más bien podría conducir a un plegamiento que de como resultado una estructura globular y, de esta manera, una menor extensión de la molécula de captura de la superficie de partícula.

Sin el deseo de vincularse a una teoría, una explicación para la eficacia de unión incrementada observada es que el uso de una molécula de enlazador largo y rígido para situar una molécula de unión lejos de la superficie de partícula potencia significativamente la cinética de unión de una partícula a la superficie. Los inventores de la presente solicitud han reconocido que la distancia de extremo a extremo resultante es una función de la longitud de extensión promedio, longitud de contorno y rigidez de una molécula y pudieron demostrar que estas características contribuyen significativamente a la cinética de unión potenciada observada.

En un experimento que usó nanopartículas recubiertas con estreptavidina de 500 nm y moléculas de ADNds rígidas como moléculas de enlazador de longitud variable, en particular, se pudo mostrar que el número de partículas unidas se incrementa con la longitud de enlazador de ADNds (véase la fig. 6). En particular, los inventores pudieron demostrar que la longitud de las moléculas de enlazador sobre las partículas contribuye esencialmente al número de partículas unidas a una superficie de sensor. Estos hallazgos y otro hallazgo que se describirá en detalle en el presente documento ha conducido al desarrollo de un diseño de enlazador mejorado. Por tanto, la arquitectura del enlazador como se describe en el presente documento es responsable de la cinética de unión potenciada, mejorando, de esta manera, la velocidad, eficacia y precisión de ensayos de afinidad basados en nanopartículas.

En un modo de realización preferente de la presente invención, la primera y/o segunda partícula es una partícula magnética.

En un modo de realización preferente adicional, el diámetro de dicha primera y/o segunda partícula es al menos aproximadamente 100 nm. En modos de realización preferentes adicionales, la longitud de extensión promedio de un enlazador como se menciona anteriormente es al menos un 10 % del diámetro de una partícula que tiene un diámetro de al menos aproximadamente 100 nm

En todavía otro modo de realización preferente, dicha molécula de enlazador rígido tiene una longitud de extensión promedio de al menos un 20 % de la longitud de contorno de dicha molécula de enlazador.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la primera molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo, un aptámero, un ligando o un ácido nucleico complementario.

En un modo de realización específico de la presente invención la rigidez y longitud de dicha molécula de enlazador se determina por medio de la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$, donde $\langle R^2 \rangle$ se puede describir de acuerdo con la fórmula

$$\langle R^2 \rangle = 2 \text{ PI } [1 - (P/L)(1 - e^{-L/P})],$$

en la que P es la longitud de persistencia del polímero y L es la longitud de contorno del enlazador.

En un modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de enlazador es o comprende una molécula de ácido nucleico o un polímero no biológico. En un modo de realización particularmente preferente, la molécula de enlazador puede estar seleccionada del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico bicatenario, tal como ADNds, una molécula de APN, un híbrido APN-ADN y un híbrido ARN-ADN.

En todavía otro modo de realización particularmente preferente, la molécula de ácido nucleico bicatenario es un ADNds, un híbrido APN-ADN, o un híbrido ARN-ADN.

En el modo de realización más preferente de la presente invención, la molécula de enlazador es un ADNds.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la primera partícula comprende adicionalmente una estructura de superficie repulsiva que se ancla directamente en la superficie de dicha partícula, en la que dicha estructura de superficie repulsiva cubre la superficie de la partícula para dar como resultado una carga neta específica y/o una repulsión estérica de la partícula, y en la que dicha estructura de superficie repulsiva transmite un efecto de empuje sobre dichas partículas hacia dicha superficie de sensor.

En todavía otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de enlazador es más larga que dicha estructura de superficie repulsiva.

En un modo de realización preferente adicional de la presente invención, dicha estructura de superficie repulsiva es una estructura cargada.

En un modo de realización particularmente preferente, la estructura cargada es o comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico bicatenario, por ejemplo, ADNds, un APN, un híbrido APN-ADN, un ARN-ADN, un hidrogel y un polímero.

5 En un modo de realización particularmente preferente adicional de la presente invención, dicha estructura de superficie repulsiva es un recubrimiento estérico.

10 En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de enlazador y/o dicha estructura de superficie repulsiva no se puede escindir mediante DNasa y/o una enzima de restricción que pueda fragmentar una molécula de ácido nucleico bicatenario.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de enlazador comprende adicionalmente al menos un espaciador flexible corto.

15 En todavía otro modo de realización preferente, el espaciador flexible corto comprende un ácido nucleico monocatenario.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de la presencia o cantidad de una molécula diana en una muestra que comprende las etapas de

(a) poner en contacto la muestra y una primera molécula de unión anclada en una primera partícula en un dispositivo de acuerdo con la presente invención; y

25 (b) poner en contacto la muestra con
i) una segunda molécula de unión que se pueda anclar en una superficie plana o en una segunda partícula, en el que la primera molécula de unión y/o la segunda molécula de unión se pueden unir específicamente a dicha molécula diana, o

ii) una molécula análoga diana anclada en la superficie plana o en la segunda partícula; en el que la molécula diana puede interferir con la unión de la primera molécula de unión a la molécula análoga diana; y

30 (c) detectar el número de primeras partículas unidas a la superficie plana o a la segunda partícula en virtud de la unión de la primera molécula de unión a la segunda molécula de unión,

en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

35 En un modo de realización preferente adicional de la presente invención, se aplica una fuerza magnética para acercar las partículas en estrecha proximidad con dicho soporte sólido o entre sí para facilitar la agrupación de las partículas.

40 En un modo de realización preferente adicional de la presente invención, el anclaje de dicha segunda molécula de unión a la superficie plana o la segunda partícula tiene lugar antes o después de la unión de la segunda molécula de unión a la molécula diana.

45 En otro modo de realización preferente de la presente invención, la detección de partículas unidas tiene lugar por medio de reflexión interna total frustrada (RITF) o por medio de la medida de la luz dispersada desde dichas partículas unidas cerca de la superficie o por medio de la detección óptica de formación de agrupaciones.

En un aspecto adicional, la presente invención describe el uso de una partícula como se define en el presente documento para detectar una molécula diana en una muestra.

50 En un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, la molécula diana como se menciona en el contexto del dispositivo, procedimiento o uso como se describe anteriormente en el presente documento es troponina cardíaca I (cTnI), NT-proBNP u hormona paratiroidea.

Breve descripción de los dibujos

55 La fig. 1 muestra el principio de detección por RITF. La luz de una fuente de luz penetra en un cartucho, se refleja desde la interfase de fluido/cartucho y se proyecta en un detector. Si están presentes partículas en el campo evanescente creado sobre esta interfase, disminuye la intensidad de la luz reflejada.

60 La fig. 2 muestra un inmunoensayo de tipo sándwich que usa tecnología Magnotech. En el panel (1), las partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo primario dirigido a la diana se dispersan en el líquido de muestra y se unen a la diana. En panel (2), las bobinas superior e inferior accionan las partículas magnéticas de manera pulsada, dando como resultado la unión a la superficie de sensor donde un anticuerpo secundario se puede unir a la molécula diana unida. En panel (3), las partículas no unidas se eliminan de la superficie de sensor y las partículas unidas se detectan usando un campo evanescente.

65

La fig. 3 ilustra los tamaños relativos de una molécula diana (negro) de 10 nm, intercalada entre la superficie de sensor y una partícula de 500 nm (no presentado por completo). Izquierda: partícula orientada de manera apropiada para formar un enlace; derecha: partícula no orientada de manera apropiada para formar un enlace.

5 La fig. 4 ilustra el número incrementado de orientaciones en las que una partícula se puede unir a la superficie si el punto de anclaje (representado por el pequeño círculo negro) se extiende más alejado de la partícula.

La fig. 5 muestra un bosquejo que compara la extensión de un anticuerpo anclado a la superficie por medio de un enlazador de PEG (izquierda) o enlazador de ADNds (derecha), ambos con la misma longitud de contorno.

10 La fig. 6 representa un gráfico que muestra el número de partículas unidas como una función de la longitud de enlazador de ADN. Se incubaron partículas recubiertas con estreptavidina de 500 nm con ADNds de longitud variable. Cada molécula de ADN contenía un resto de biotina en un extremo de la molécula de ADN, una molécula de Texas Red en el otro extremo de la molécula. La solución que contenía partículas y ADN se inyectaron en un cartucho y se unieron a la superficie de sensor, recubierta con anticuerpos anti-Texas Red usando atracción magnética. Al registrar repetidamente el número de partículas que se habían unido a la superficie después de una corta etapa de lavado magnético que eliminó las partículas no unidas de la superficie, se determinó la tasa de unión (expresada en número de partículas unidas por unidad de tiempo).

20 La fig. 7 representa un gráfico que muestra el número de partículas unidas como una función de la longitud de enlazador de ADN. Los detalles son similares a los de la fig. 6, sin embargo, se usaron partículas con diámetro de 1000 nm.

25 La fig. 8 muestra una partícula con una alta densidad superficial de moléculas de enlazador. Aunque las moléculas de enlazador se estiran relativamente, el alto impedimento estérico disminuye la movilidad del enlazador.

30 La fig. 9 representa el efecto de la densidad superficial de enlazador sobre la cinética de unión. Parte superior: bosquejo de formato de ensayo: una partícula de 500 nm recubierta con estreptavidina (naranja) se une a una molécula diana individual, una hebra de ADNds con una biotina en un extremo y una molécula de Texas Red anclada en el otro extremo (azul diamante), que está disponible para unirse a una superficie de sensor recubierta con anticuerpos anti-Texas Red. Posteriormente, diferentes cantidades de ADNds no funcional de la misma longitud (pero sin la molécula de Texas Red) se unen asimismo a la partícula y se compara la capacidad de las partículas para unirse a la superficie de sensor. Parte media: experimento de carga de partículas que usa ADNds de 1999 pb que presenta la cantidad relativa de partículas que se unen tras la carga con ADN no funcional, en comparación con una partícula con solo 1 molécula de ADN funcional. Parte inferior: el mismo gráfico, pero, a continuación, para ADN de 497 pb.

40 La fig. 10 muestra una partícula, cargada previamente con moléculas de captura ancladas en la superficie por medio de un enlazador largo rígido. Durante el ensayo, la molécula diana (diamante) se une a la partícula y, posteriormente, a la superficie.

45 La fig. 11 representa una partícula, cargada previamente con moléculas de captura ancladas directamente a la superficie. Durante el ensayo, la molécula diana (diamante) se une a la partícula y una segunda molécula de captura que reconoce la diana, que está conectada a un enlazador largo rígido. El otro extremo del enlazador se conecta a un elemento de reconocimiento (por ejemplo, biotina), que se puede unir a una molécula de captura compatible (por ejemplo estreptavidina) sobre la superficie de sensor.

La fig. 12 muestra partículas unidas a la superficie a través de una interacción específica (izquierda) o una interacción no específica (derecha).

50 La fig. 13 muestra un diseño de enlazador posible.

Descripción detallada de los modos de realización

55 La presente invención se refiere a un medio y procedimientos para detectar una molécula diana en una muestra. Aunque la presente invención se describirá con respecto a los modos de realización particulares, la presente descripción no ha de interpretarse en un sentido limitante.

60 Antes de describir en detalle los modos de realización ejemplares de la presente invención, se dan definiciones importantes para entender la presente invención.

60 Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de "un" también incluyen los plurales respectivos a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

65 En el contexto de la presente invención, el término "aproximadamente" indica un intervalo de precisión que un experto en la técnica entenderá para garantizar aún el efecto técnico del rasgo en cuestión. El término típicamente indica una

desviación del valor numérico indicado de un $\pm 20\%$, preferentemente un $\pm 15\%$, más preferentemente un $\pm 10\%$, e incluso más preferentemente un $\pm 5\%$.

Se ha de entender que el término "que comprende" no es limitante. Para los propósitos de la presente invención, el término "que consiste en" se considera un modo de realización preferente del término "que comprende". Si a continuación en el presente documento se define un grupo para comprender al menos un determinado número de modos de realización, esto también pretende englobar un grupo que únicamente consiste preferentemente en estos modos de realización.

Además, los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", etc. y similares en la descripción y en las reivindicaciones se usan para las distinción entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Se ha de entender que los términos usados de este modo son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que los modos de realización de la invención descrita en el presente documento pueden funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en el presente documento.

En el caso de que los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", "i", "ii", etc. se refieran a etapas de un procedimiento o uso o ensayo, no hay coherencia de tiempo o intervalo de tiempo entre las etapas, es decir, las etapas se pueden llevar a cabo de forma simultánea o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre tales etapas, a menos que se indique de otro modo en la solicitud tal como se expone anteriormente o a continuación en el presente documento.

Se ha de entender que la presente invención no se limita a los reactivos, protocolos, metodología particular, etc. descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el propósito de describir modos de realización particulares y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que únicamente está limitada por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención en un aspecto hace referencia a un dispositivo para detectar una molécula diana en una muestra que comprende un recipiente de muestra para la medida de la molécula diana en una muestra, una primera partícula, en el que dicha primera partícula está funcionalizada con una primera molécula de unión que se puede unir específicamente a dicha molécula diana, y una estructura de superficie que comprende una segunda molécula de unión, en el que dicha estructura de superficie cubre un sensor plano o está presente en una segunda partícula, en el que dicha primera partícula puede unir directa o indirectamente dicha segunda molécula de unión de la estructura de superficie; en el que dicha primera y/o segunda molécula de unión se ancla en la superficie de partícula de dicha primera y/o segunda partícula y/o la superficie de sensor plano a través de una molécula de enlazador largo y rígido; en el que la longitud y la consistencia de dicha molécula de enlazador se selecciona de manera que de lugar a una longitud de extensión promedio de dicho enlazador de más de 60 nm; y en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

Mediante la presente invención se concibe un dispositivo adecuado, preferentemente para la detección de una molécula diana, que usa un sistema de biosensor. En la técnica son conocidos varios procedimientos analíticos para detectar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra de prueba o volumen de muestra. Típicamente, tal sistema de detección puede detectar ópticamente partículas, que están funcionalizadas con una molécula de unión adecuada a fin de unir el analito de interés. La presencia o cantidad del analito se puede estimar a partir del número de analito unido a las partículas. La presencia o cantidad del analito también se puede estimar a partir del número de agrupaciones de partículas. En modos de realización específicos de la presente invención, el sistema de biosensor que comprende el dispositivo como se describe en el presente documento puede detectar partículas individuales unidas a un sensor plano como se describe en el presente documento o la presencia de agrupación de partículas, y accionar las partículas mediante un campo magnético generado mediante un generador de campo magnético.

Un "generador de campo magnético" como se usa en el presente documento típicamente comprende uno o más imanes en el dispositivo optomagnético como se describe en el presente documento para generar un campo magnético con la cámara de muestras, en el que dicho campo magnético guiará las partículas magnéticas hacia la superficie de contacto. El campo magnético típicamente tiene un gradiente distinto de cero que permite ejercer fuerzas magnéticas sobre las partículas magnéticas (dipolo). Los ejemplos adecuados de tales generadores de campo magnético, o sistemas adecuados que comprenden tales generadores de campo magnético serán conocidos por el experto en la técnica. En modos de realización específicos de la presente invención, el generador de campo magnético puede ser un generador de campo magnético como se describe en Bruls *et al.*, Lab Chip, 2009, 9, 2504-3510, o puede estar comprendido en o ser parte de un sistema como se describe en Ranzoni *et al.*, 2011, Nano Lett., 11, 2017-2022.

Típicamente, las partículas magnéticas se pueden accionar aplicando un campo magnético de tal modo que se pueda acelerar el procedimiento analítico. En modos de realización específicos de la presente invención, también se concibe que el uso de un campo magnético pueda reducir la señal de fondo que se debe a la eliminación de partículas

inespecíficamente unidas. La fig. 2 muestra un ejemplo de cómo las partículas se pueden accionar para eliminar eficazmente las partículas no unidas o inespecíficamente unidas del sensor plano como se describe en el presente documento. Un imán superior e inferior que se puede accionar de manera pulsada elimina eficazmente las partículas no unidas de modo que las partículas unidas se detectan en la superficie de sensor.

5 Se puede usar de manera diferente un accionamiento magnético como se usa en el contexto de la presente invención, en concreto, para disponer partículas magnéticas en una muestra en cadenas a fin de acelerar la agrupación de partículas. Mediante la presente invención también se concibe el uso de accionamiento magnético para hacer vibrar y rotar agrupaciones de partículas para la determinación de la presencia y cantidad de agrupaciones formadas. En
10 modos de realización específicos, el accionamiento magnético de las partículas puede tener lugar pulsado, es decir, el campo de accionamiento al menos se interrumpe una vez por un pausa. Se ha descubierto que la dinámica de accionamiento en términos de pulsos repetidos reduce las interacciones no específicas y potencia el número de acontecimiento de unión. Los detalles y parámetros adicionales en relación con la detección de una molécula diana usando basada en la detección de agrupaciones de partículas serán conocidos por el experto en la técnica o pueden
15 proceder de Ranzoni *et al.*, 2011, Nano Lett., 11, 2017-2022.

Los sistemas de biosensor adecuados para su uso en la presente invención pueden comprender, por ejemplo, un cartucho de biosensor que comprende un recipiente de muestra, un dispositivo sensor para detectar las partículas, sistema de detección, y opcionalmente un generador de campo magnético. En modos de realización adicionales, el
20 sistema puede comprender una o más unidades funcionales adicionales, tales como un sistema de lectura, por ejemplo, una pantalla o impresora, una interfaz para sistemas informáticos o de bases de datos, una unidad de calibración, una conectividad directa o indirecta con dispositivos de alta transferencia, etc. Mediante la presente invención se conciben particularmente dispositivos portátiles para un análisis rápido e instantáneo donde se pueda insertar un cartucho que incluya el formato de ensayo. Típicamente, tal dispositivo comprende una fuente de
25 alimentación, preferentemente en forma de baterías recargables, un dispositivo de visualización, conectividad inalámbrica, tal como WLAN, para un acceso a bases de datos rápido, o acceso a un sistema de información de laboratorio. Un sistema de biosensor ejemplar, que se puede usar en el contexto de la presente invención se describe en Bruls *et al.*, Lab Chip, 2009, 9. 2504-3510.

30 Son particularmente preferentes los dispositivos de detección basados en una detección óptica de partículas cerca de o en una superficie. Sin estar limitado a los mismos, en la fig. 1 se ilustra un dispositivo ejemplar que comprende una fuente de luz y un sistema de detección de luz.

Una "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier muestra, que incluye una molécula diana como se define en el presente documento. Por ejemplo, tales muestras pueden incluir muestras procedentes de o que comprenden heces, sangre completa, suero, plasma, lágrimas, saliva, fluido nasal, esputo, fluido de oídos, fluido genital, fluido de mama, leche, el calostro, fluido placentario, líquido amniótico, sudor, líquido sinovial, fluido ascítico, líquido cefalorraquídeo, bilis, fluido gástrico, humor acuoso, humor vítreo, fluido gastrointestinal, exudado, trasudado,
40 líquido pleural, líquido pericárdico, semen, fluido de vías respiratorias altas, líquido peritoneal, fluido obtenido de un sitio de una respuesta inmunitaria, fluido obtenido de un sitio de recogida global, lavado bronquial, orina, material de biopsia, por ejemplo, a partir de todos los órganos adecuados, por ejemplo, el pulmón, el músculo, cerebro, hígado, piel, páncreas, estómago, etc., una muestra de células nucleadas, un fluido asociado con una superficie mucosa, pelo, o piel. Además, se pueden usar muestras a partir de fuentes ambientales, por ejemplo, muestras de agua, muestras de carne o aves de corral, muestras a partir de fuentes de contaminación potencial, etc.

45 El término "molécula diana" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula unida por una molécula de unión y, por ejemplo, puede ser una sustancia biológica tal como una biomolécula, preferentemente un biomarcador, complejos, fracciones celulares o células. Preferentemente, una molécula diana en el contexto de la presente invención, es un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, o molécula de ARN o un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido de ADN o ARN. Son incluso más preferentes las moléculas diana, tales como un péptido, un polipéptido o proteína, un fragmento de proteína o polipéptido, o un dominio de proteína o polipéptido funcional, una molécula de fármaco, una molécula pequeña, o una vitamina.

50 Una molécula diana se puede obtener directamente a partir de las muestras como se describe anteriormente en el presente documento. En otras situaciones, las muestras se pueden someter a técnicas de preparación de muestras, por ejemplo, basadas en protocolos estándar, que, por ejemplo, incluyen purificación parcial, que hace a las moléculas diana más accesibles a los compañeros de unión, es decir, una molécula de afinidad como se define en el presente documento. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden centrifugar para separar las fracciones que incluyen membranas o células completas a partir de suero, las muestras de heces se pueden seccionar y homogeneizar con detergente y tampón fisiológicamente aceptables, las muestras de esputo se pueden licuar y fraccionar. Además, se
60 pueden añadir antibióticos o bactericidas a las muestras para impedir el crecimiento adicional de cualquier organismo presente. Las células completas también se pueden eliminar o se pueden lisar para liberar su contenido.

Un "recipiente de muestra" como se usa en el presente documento se refiere a un recipiente fabricado a partir de
65 cualquier material adecuado, como vidrio, cualquier plástico transparente, o un semiconductor en el que se mida la

muestra. Las partículas magnéticas como se describe en el presente documento pueden estar presentes de antemano en el recipiente de muestra cuando se introduce la muestra, introducirse junto con la muestra, o introducirse después de que se haya inyectado la muestra en el recipiente de muestra. El recipiente de muestra puede comprender adicionalmente una superficie de sensor que comprenda una segunda molécula de unión. Preferentemente, la superficie de sensor está situada en el fondo del recipiente de muestra. En modos de realización específicos, el recipiente de muestra puede estar situado en un cartucho cambiabile, por ejemplo, en un componente independiente separado del dispositivo sensor. Debido a su posible contaminación con una muestra, tal cartucho puede ser preferentemente un artículo desechable, por ejemplo, fabricado a partir de plásticos por moldeo por inyección. También se conciben cartuchos reciclables o partes de cartuchos reciclables, por ejemplo, cartuchos o partes de cartuchos, que se puedan desinfectar o esterilizar.

Un "sensor plano" como se usa en el presente documento, define una zona en la que tiene lugar o se detecta un acontecimiento de sensor real. Típicamente, el sensor plano está situado en el fondo del recipiente de muestra. El sensor plano puede servir para la detección del número de partículas unidas, que está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en las muestras. Los ejemplos de tales sensores planos y sensores correspondientes, que se pueden usar en el contexto de la presente invención se proporcionan en Bruls *et al.*, 2009, Lab Chip, 9, 3504-3510.

El término "partícula" como se usa en el presente documento quiere decir un objeto localizado pequeño al que se puede atribuir una propiedad física tal como volumen o masa. En el contexto de la presente invención, una partícula comprende o consiste en cualquier material adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, la partícula puede comprender, o consistir en, o consistir esencialmente en material inorgánico u orgánico. Típicamente, una partícula puede comprender, o consistir en, o consistir esencialmente en metal o una aleación de metales, o un material orgánico, o comprender, o consistir en, o consistir esencialmente en elementos glucídicos. Los ejemplos de material concebido incluyen agarosa, poliestireno, látex, poli(alcohol vinílico), sílice y metales ferromagnéticos, aleaciones o materiales de composición. Son particularmente preferentes las composiciones, aleaciones o metales magnéticos o ferromagnéticos. Las partículas útiles particularmente preferentes en la presente invención son partículas superparamagnéticas. El término "superparamagnético" como se usa en el presente documento describe una forma de magnetismo, que aparece en nanopartículas ferromagnéticas pequeñas o ferromagnéticas. En la técnica se sabe que en las nanopartículas suficientemente pequeñas, la magnetización puede voltear aleatoriamente la dirección bajo la influencia de la temperatura. El tiempo entre dos volteos se denomina tiempo de relajación de Néel. En ausencia de un campo magnético externo, si el tiempo usado para medir la magnetización de las nanopartículas es mucho mayor que el tiempo de relajación de Néel, la magnetización parece estar en promedio cero, es decir, en el estado paramagnético. En tal estado, un campo magnético externo puede magnetizar las nanopartículas de forma similar a una sustancia paramagnética. Sin embargo, la susceptibilidad magnética es mucho más grande que la de las sustancias paramagnéticas. En modos de realización preferentes adicionales, el material puede tener propiedades específicas. Por ejemplo, el material puede ser magnético o no magnético. En otros modos de realización, el material puede ser hidrófobo o hidrófilo. En modos de realización específicos adicionales, la partícula es una partícula de plástico. Los ejemplos de partículas de plástico incluyen microesferas de látex o poliestireno, por ejemplo, las usadas comúnmente para la purificación. En todavía otro modo de realización, la partícula puede ser una partícula similar a célula. El término "partícula similar a célula" como se usa en el presente documento se refiere a una estructura biológica o semibiológica, que está presente en los sistemas biológicos o tiene la forma y/o función de sistemas biológicos o partes de sistemas biológicos. Un ejemplo preferente o una partícula similar a célula es un liposoma.

El término "liposoma" como se usa en el presente documento quiere decir una vesícula, por ejemplo, que comprende una capa, por ejemplo, bicapa, o membrana lipídica o fosfolipídica. Típicamente, los liposomas son estructuras huecas, que se pueden llenar de moléculas, por ejemplo, moléculas de fármaco o composiciones farmacéuticas, y se pueden usar para administrar dichas moléculas a sitios diana, por ejemplo, células cancerosas o zonas infectadas, etc. Los liposomas preferentemente pueden ser estructuras compuestas hechas de fosfolípidos y pueden contener cantidades pequeñas de otras moléculas, por ejemplo, estar compuestas de fosfolípidos de origen natural con cadenas lipídicas mixtas (como fosfatidiletanolamina de huevo) u otros tensioactivos. Un liposoma puede variar en tamaño desde un intervalo de nanómetros a decenas de micrómetros. En modos de realización específicos adicionales, una partícula puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en agarosa o agarosa.

Además, una partícula se comporta esencialmente como una unidad completa en términos de su transporte y propiedades. En consecuencia, las partículas pueden ser de forma simétrica, globular, esencialmente globular o esférica, o ser de una forma o conformación irregular, asimétrica.

El tamaño de una partícula concebida por la presente invención oscila típicamente entre 50 nm y 50 μ m. Son preferentes las partículas en nanómetros y micrómetros que oscilan hasta varios micrómetros. En modos de realización preferentes adicionales, el diámetro de partícula es más grande que 100 nm. El término "diámetro" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier segmento de línea recta que pasa por el centro de la partícula y cuyos puntos extremos están sobre la superficie de partícula. En el caso de partículas no esféricas o semiesféricas, se entiende que el diámetro es el diámetro promedio de los segmentos de línea recta más grandes y más pequeños que pasan por el centro de la partícula y cuyos puntos extremos están sobre la superficie de partícula. Se entiende

adicionalmente que un radio de una partícula como se define en el presente documento es la mitad de su diámetro como se define anteriormente en el presente documento. Son particularmente preferentes las nanopartículas, por ejemplo, las partículas de un diámetro de aproximadamente 100 nm a 10 micrómetros, más preferentemente 100 nm a 3 µm, incluso más preferentemente 300 nm a 1000 nm, por ejemplo, 300 nm, 310 nm, 320 nm, 330 nm, 340 nm, 350 nm, 360 nm, 370 nm, 380 nm, 390 nm, 400 nm, 410 nm, 420 nm, 430 nm, 440 nm, 450 nm, 460 nm, 470 nm, 480 nm, 490 nm, 500 nm, 510 nm, 520 nm, 530 nm, 540 nm, 550 nm, 560 nm, 570 nm, 580 nm, 590 nm, 600 nm, 620 nm, 650 nm, 670 nm, 700 nm, 720 nm, 750 nm, 770 nm, 800 nm, 820 nm, 850 nm, 870 nm, 900 nm, 920 nm, 950 nm, 970 nm, 1000 nm, o cualquier valor intermedio. Son incluso más preferentes las nanopartículas que tienen un diámetro de aproximadamente 500 nm.

Preferentemente, las partículas de acuerdo con la presente invención están funcionalizadas con una primera molécula de unión o una segunda molécula de unión. Mediante modos de realización específicos de la presente invención también se conciben partículas que comprenden adicionalmente una estructura cargada como se describe en el presente documento.

En un modo de realización particularmente preferente, el material es un material magnético. En modos de realización particularmente preferentes adicionales, la entidad sobre la que está presente una estructura de superficie como se define anteriormente en el presente documento, o sobre la que se ancla una primera o segunda molécula de unión de acuerdo con la presente invención es una nanopartícula magnética.

En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, el material, o partícula, por ejemplo, nanopartícula, puede ser partículas superparamagnéticas, que típicamente están dispersadas en soluciones acuosas y conservan una pequeña carga, por ejemplo, una carga negativa o positiva, o poseen un determinado potencial zeta para garantizar la estabilidad coloidal, manteniendo las partículas separadas y evitando la agrupación no específica.

Mediante la presente invención se conciben al menos dos tipos de partículas, en concreto, una primera y segunda partícula.

El término "primera partícula" como se usa en el presente documento se refiere a una partícula como se describe en el presente documento que está funcionalizada con una primera molécula de unión. La primera molécula de unión puede ser cualquier molécula que se pueda unir específicamente a una molécula diana de interés. De esta manera, la primera partícula funciona como una partícula de captura. La primera molécula de unión se puede anclar indirectamente a la superficie por medio de una molécula de enlazador largo y rígido como se define en el presente documento. La superficie de la primera partícula se puede modificar adicionalmente mediante estructuras adicionales, tales como una estructura cargada como se describe en el presente documento.

El término "segunda partícula" como se usa en el presente documento se refiere a una partícula como se describe en el presente documento, que está funcionalizada con una segunda molécula de unión. Mediante la presente invención se concibe que la segunda partícula comprenda una estructura de superficie como se describe en el presente documento que comprende una segunda molécula de unión. Mediante la presente invención también se concibe que la segunda partícula se pueda unir a la primera partícula en virtud de la unión de la molécula diana. De esta manera, la segunda partícula puede unir la molécula diana por medio de unión de la segunda molécula de unión. La unión concebida de la primera partícula que ha capturado la molécula diana a la segunda partícula conduce a la formación de agrupación de partículas, que se puede detectar como se describe en el presente documento. El número de agrupaciones de partículas está entonces relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

El término "molécula de unión" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que tiene una alta afinidad de unión por una segunda molécula, es decir, un compañero de interacción. Una molécula de unión en el sentido de la presente invención, comprende típicamente unir o capturar restos que puedan unir una molécula diana específica como se define en el presente documento, tal como una biomolécula o un biomarcador, o que puedan unir una entidad diana que contiene moléculas, tal como, por ejemplo, un virus, o una célula o un fragmento celular, o material procedente de tejido.

En un modo de realización particularmente preferente, la molécula de unión se selecciona del grupo que consiste en aptámeros, péptidos, proteínas, oligonucleótidos, en particular, ácidos nucleicos complementarios, y polímeros de impresión molecular, ligandos o receptores, y lectinas, en la que la molécula de unión preferentemente es un anticuerpo o un fragmento del mismo o un ácido nucleico complementario.

Un "aptámero" como se usa en el contexto de una molécula de unión puede ser una molécula de ácido nucleico corta, por ejemplo, una molécula de ARN, ADN, o APN o cualquier otro formato de ácido nucleico adecuado conocido por el experto en la técnica, que se pueda unir a una molécula diana como se define en el presente documento, preferentemente a una molécula diana de ácido nucleico como se define en el presente documento. Además, la presente invención concibe aptámeros peptídicos, es decir, aptámeros que se pueden unir específicamente a una(s) proteína(s), un(os) polipéptido(s) o un(os) péptido(s) que comprenden una(s) secuencia(s) de aminoácidos

específica(s). Típicamente, un(os) aptámero(s) peptídico(s) es/son un(os) bucle(s) peptídico(s) variable(s), que, por ejemplo, comprenden 10 a 20 aminoácidos. En el contexto de la presente invención el(los) aptámero(s) peptídico(s), en modos de realización específicos se pueden anclar en uno o ambos extremos a una estructura de esqueleto. El la estructura de esqueleto puede ser cualquier molécula, preferentemente una proteína, por ejemplo, una proteína, que
 5 tenga buenas propiedades de solubilidad. Las moléculas del esqueleto adecuadas son conocidas por el experto en la técnica. Un ejemplo de una molécula del esqueleto adecuada que se va a usar en el contexto de la presente invención es la proteína bacteriana tiorredoxina-A. El bucle peptídico de aptámero se puede insertar preferentemente en un centro activo reductor de la molécula del esqueleto. De forma alternativa, en el contexto de la presente invención se
 10 pueden usar como estructuras de esqueleto la proteína estafilocócica A y los dominios de la misma y los derivados de estos dominios, tales como proteína Z o lipocalinas. Los aptámeros peptídicos o de ácido nucleico se pueden generar de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, por medio de PCR o enfoques de síntesis molecular o enfoques de doble híbrido en levaduras.

Un "péptido" consiste en cadenas de aminoácidos. Un péptido como se usa en el contexto de una molécula de unión puede comprender o de forma alternativa consistir en un tramo de 2 a 35 aminoácidos, derivados de aminoácidos o una mezcla de los mismos. El péptido puede ser lineal, ramificado, circular o mezcla de los mismos. Una molécula de afinidad péptídica también se puede anclar a una estructura de esqueleto como se define anteriormente en el presente documento.

Un "proteína" es un polímero de aminoácidos enlazados por por enlaces peptídicos, que puede comprender una cadena polipeptídica o más de una cadena polipeptídica típicamente colocadas juntas de una manera biológicamente funcional. Una proteína como se usa en el contexto de una molécula de unión puede comprender o de forma alternativa consistir en un tramo de más de aproximadamente 35 aminoácidos, derivados de aminoácidos o una mezcla de los mismos. La proteína puede tener una conformación lineal, ramificada, circular o comprender una mezcla
 25 de estas conformaciones. Una molécula de afinidad proteica también se puede anclar a una estructura de esqueleto como se define anteriormente en el presente documento.

Un "oligonucleótido" como se usa en el contexto de una molécula de unión puede comprender o de forma alternativa consistir en un tramo de aproximadamente 5 a 120 nucleótidos, por ejemplo, un tramo de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,
 30 90 o 100 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 15 a 60 nucleótidos. Una molécula de unión oligonucleotídica puede ser preferentemente una molécula de ARN, ADN o APN, o una mezcla de los mismos. Se conciben moléculas de unión, que son moléculas de ácidos nucleicos complementarios. El término "molécula de ácido nucleico complementario" se refiere a una molécula de una secuencia definida, donde las hebras individuales son complementarias entre sí. En la técnica se sabe que las hebras complementarias de una molécula de ácido nucleico bicatenario tienen una fuerte afinidad entre sí debido a la formación de apareamiento de bases. También se conciben secuencias de oligonucleótidos monocatenarios, que están anclados en o integrados en la estructura de molécula de enlazador como se define en el presente documento. En modos de realización particularmente preferentes tal enlazador adecuado también comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico. El tramo monocatenario puede reconocer e hibridizarse a la secuencia nucleotídica complementaria de interés con alta afinidad. En tal análisis, la
 40 molécula diana comprende un oligonucleótido que es complementario o casi complementario a la molécula de unión.

El término "polímero molecularmente impreso" como se usa en el presente documento se refiere a un polímero, que se ha formado en presencia de una molécula que se extrae posteriormente, dejando cavidades complementarias. Típicamente, un polímero molecularmente impreso muestra una determinada afinidad química por la molécula original.
 45 Un polímero molecularmente impreso puede estar compuesto de cualquier unidad polimérica adecuada conocida por el experto en la técnica. Las técnicas para su producción incluyen técnicas de polimerización, tales como polimerización en masa, por precipitación, en emulsión, en suspensión, por dispersión, por gelificación, y polimerización de hinchamiento en múltiples etapas. Son particularmente preferentes los procedimientos de impresión jerárquica.

Un "anticuerpo" como se usa en el contexto de una molécula de unión se refiere a una molécula de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que une inmunospecificamente un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos del(de los) epítipo(s) o porción(es) de una molécula diana, por ejemplo, un polipéptido de la presente invención, que reconocen o se unen específicamente. Los epítipos específicos y su interacción con anticuerpos serán conocidos por el experto en la técnica. El término "unir específicamente" como se usa en el presente documento se refiere a la unión y detección inmunoespecífica de un anticuerpo a un epítipo antigénico. El término "unir específicamente" excluye la unión no específica, pero no excluye necesariamente la reactividad cruzada con otros antígenos, en particular, con antígenos que comprenden el mismo epítipo antigénico detectado por el presente anticuerpo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, multiespecífico, humano, humanizado o quimérico, un anticuerpo monocatenario, o constituir un fragmento Fab, fragmento Fab', un fragmento producido por una genoteca

de expresión de Fab, F(ab')₂, Fv, Fv enlazado a disulfuro, minicuerpo, diacuerpo, scFv, sc(Fv)₂, molécula de inmunoglobulina completa, producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), proteína de fusión a inmunoglobulina con dominio de unión, anticuerpo camélido, anticuerpo que contiene V_{HH}, un anticuerpo antiidiotipo (anti-Id) y cualquier fragmento de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Más preferentemente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen Fab, Fab' y F(ab')₂, Fv, Fvs monocatenario (scFv), sc(Fv)₂, anticuerpos monocatenarios, Fvs enlazado a disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden tanto un dominio VL como VH.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos (por ejemplo, ratón y rata), burro, mono, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser monospecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de una molécula diana, por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con la presente invención o pueden ser específicos para tanto una molécula diana, por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con la presente invención, así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Son preferentes los anticuerpos monospecíficos.

El término "ligando" como se usa en el presente documento, en general, se refiere a una sustancia que forma un complejo con una molécula diana, tal como una biomolécula y, de esta manera, se puede unir específicamente a la molécula con una alta afinidad de unión. En particular, un ligando puede ser una molécula que desencadena señales que se puede unir a un sitio en una proteína diana. A menudo un ligando se une a un compañero de unión a menudo denominado receptor. Los sistemas de unión receptor-ligando para su uso en la detección de moléculas diana son conocidos en la técnica. Típicamente, la unión del ligando a un receptor altera la conformación química, es decir, la forma tridimensional de la proteína de un receptor. El estado conformacional de una proteína de un receptor determina el estado funcional de un receptor. Los ligandos adecuados en el contexto de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, agonistas y antagonistas de receptores, activadores, tales como proteínas de unión a ADN, o neurotransmisores.

El término "lectina" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína o glucoproteína que puede reconocer específicamente y unirse reversiblemente a restos glucídicos de glucoconjugados complejos sin alterar la estructura covalente de ninguno de los ligandos glucosilados reconocidos. Los ejemplos de lectinas adecuadas en el contexto de la presente invención incluyen lectinas monovalentes, como toxinas vegetales y bacterianas, que se pueden unir a restos de azúcar en membranas o paredes celulares. Otras lectinas adecuadas en los significados de la presente invención son lectinas de unión a manosa, lectinas de unión a galactosa/N-acetilgalactosamina, lectinas de unión a N-acetilglucosamina, lectinas de unión a ácido N-acetilneuramínico o lectinas de unión a fucosa.

El término "primera molécula de unión" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de unión como se describe en el presente documento, que se puede unir específicamente a una molécula diana en una muestra. La primera molécula de unión se puede anclar en la superficie de partícula mediante cualquier procedimiento adecuado o de cualquier manera adecuada conocida por el experto en la técnica por medio de una molécula de enlazador largo y rígido como se describe en el presente documento.

El término "anclada en la superficie de partícula o superficie de sensor plano" como se usa en el presente documento se refiere a la unión covalente o no covalente o al acoplamiento de la primera molécula de unión o segunda molécula de unión a la superficie de partícula. En particular, tal acoplamiento puede ser, por ejemplo, una unión covalente, una unión de van der Waals o una unión electrostática entre las capas. El anclaje en la superficie puede ser reversible o se puede concluir, por ejemplo, cambiando el pH, la temperatura, la concentración de iones, por iluminación con luz, por degradación enzimática o escisión enzimática, etc.

Se ha de entender que tanto la primera como segunda moléculas de unión están ancladas en la superficie de partícula o superficie de sensor plano por medio de una molécula de enlazador largo y rígido. Esto quiere decir que tanto la primera y/o segunda moléculas de unión se puede acoplar a una molécula de enlazador largo y rígido como se define a continuación en el presente documento. Mediante la presente invención se concibe proporcionar una determinada distancia entre la primera partícula y la segunda partícula o entre la primera partícula y la superficie de sensor plano. Se apreciará inmediatamente por el experto en la técnica que con este propósito al menos una molécula de unión se debe acoplar a un enlazador largo y rígido para proporcionar la longitud de extensión promedio concebida. Por ejemplo, si una primera molécula de unión se acopla a una molécula de enlazador largo y rígido, la segunda molécula de unión se puede anclar directamente en la superficie de la segunda partícula o la superficie de sensor plano. Si la segunda molécula de unión está provista de un enlazador largo y rígido, la primera molécula de unión se puede anclar directamente en la superficie de la primera partícula. También es posible que tanto la primera y segunda molécula de unión estén provistas de un enlazador largo y rígido a fin de establecer la distancia ventajosa. En el contexto de la presente invención, se ha de entender que se debe evitar una situación como se representa en la fig. 12 (panel derecho), donde tanto la primera como segunda molécula de unión no están provistas de una estructura de enlazador,

puesto que tal disposición únicamente daría como resultado una longitud de extensión promedio mínima como se define en el presente documento, lo que sería insuficiente para lograr el incremento concebido en la cinética de unión.

En modos de realización específicos, la primera molécula de unión se ancla en la superficie de la partícula por medio de una molécula de enlazador largo y rígido. En un modo de realización específico adicional, la segunda molécula de unión no se ancla en la superficie de la partícula por medio de una molécula de enlazador largo y rígido.

En modos de realización específicos de la presente invención, el acoplamiento, unión o anclaje de la primera y/o segunda molécula de unión a la partícula, por ejemplo, partícula magnética, o superficie de partícula, o a la superficie de sensor plano, puede ser una unión directa o indirecta.

El término "unión directa" como se usa en el presente documento quiere decir que la primera molécula de unión tiene una conexión inmediata con la partícula, por ejemplo, partícula magnética, sin la presencia de funcionalidades o moléculas intermedias, de entrecruzamiento o conectoras.

El término "unión indirecta" como se usa en el presente documento quiere decir que la molécula de unión no está anclada directamente en la superficie de la partícula, por ejemplo, partícula magnética, sino que puede estar enlazada indirectamente por medio de moléculas intermedias, de entrecruzamiento o conectoras adicionales, tales como, por ejemplo, otras moléculas de unión, moléculas de enlazador o estructuras cargadas. Por ejemplo, se pueden usar avidina, derivados de estreptavidina, (estrept)avidina, proteínas relacionadas con avidina, entidades similares a avidina, tales como tamavidina 1 y 2, bradavidina, neutravidina, etc. como conector entre una partícula, por ejemplo, partícula magnética, y una molécula de interacción que comprenda un resto de unión compatible, tal como biotina.

En un modo de realización específico, una partícula, por ejemplo, partícula magnética, se puede recubrir o cubrir con un conector de avidina o estreptavidina. Los ejemplos preferentes adicionales de pares de interacción útiles como moléculas conectoras son biotina/avidina, cualquier par anticuerpo/antígeno, por ejemplo, anti-FITC, FITC, anti-Texas Red/Texas Red, anti-digoxigenina/digoxigenina, y hebras complementarias de ácido nucleico como se menciona anteriormente en el presente documento. Mediante la presente invención se concibe, en particular, el uso de hebras complementarias de ácido nucleico, a causa del alto grado de multiplexación debida a las casi ilimitadas combinaciones específicas. También se apreciará por el experto en la técnica que tales moléculas conectoras que consisten en o comprenden una secuencia de ácido nucleico se pueden integrar fácilmente en una estructura de enlazador.

Un "estructura de superficie" de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier estructura que comprende moléculas o una red de moléculas adecuada para cubrir una superficie tal como una superficie de sensor plano o una superficie de partícula. De esta manera, la estructura de superficie concebida sirve para el reconocimiento, unión y posterior detección de las primeras partículas que han capturado una molécula diana de interés.

Un "sensor plano" como se usa en el presente documento, define una zona en la que tiene lugar o se detecta un acontecimiento de sensor real. Típicamente, el sensor plano está situado en el fondo del recipiente de muestra. El sensor plano puede servir para la detección del número de partículas unidas, que está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en las muestras. Los ejemplos de tales sensores planos y sensores correspondientes, que se pueden usar en el contexto de la presente invención se proporcionan en Bruls *et al.*, 2009, Lab Chip, 9, 3504-3510.

El término "segunda molécula de unión" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de unión, que está comprendida en la estructura de superficie y que está anclada directa o indirectamente en la superficie de sensor plano como se describe en el presente documento o la superficie de la segunda partícula como se describe en el presente documento.

La segunda molécula de unión puede ser el mismo tipo de molécula que la primera molécula de unión o puede ser una molécula diferente. En modos de realización preferentes de la presente invención, la primera y segunda molécula de unión son el mismo tipo o clase de moléculas. En modos de realización específicos de la presente invención, la segunda molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo, preferentemente un anticuerpo como se define anteriormente en el presente documento. En modos de realización preferentes particulares de la presente invención, la segunda proteína de unión puede reconocer específicamente y unirse a la molécula diana en una muestra, sin embargo, en un epítipo sitio de unión diferente de la molécula diana que ser reconocida por la primera molécula de unión. En un modo de realización preferente adicional, la segunda molécula de unión puede ser un segundo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo como se define anteriormente en el presente documento, que reconoce una primera molécula de unión, por ejemplo, un primer anticuerpo, que puede ser un anticuerpo como se define anteriormente en el presente documento.

El término "dicha primera partícula puede unir directa o indirectamente dicha segunda molécula de unión de la superficie" como se usa en el presente documento quiere decir que la primera partícula que está funcionalizada con una primera molécula de unión se une a la segunda molécula de unión en virtud de la unión a la molécula diana. En

cambio, cualquier otra unión de la primera partícula a la estructura de superficie, que no está mediada por la molécula diana como se define en el presente documento, se considera una unión no específica.

5 De esta manera, "unir directamente" en este contexto quiere decir que la primera molécula de unión, que actúa como una molécula de captura, reconoce y une la molécula diana, formando así un complejo de captura, y que, a su vez, se une y se reconoce por la segunda molécula de unión de la estructura de superficie. En este sentido, "unir indirectamente" quiere decir que la primera partícula se une a la segunda molécula de unión por medio de uno o varios complejos de captura. También es posible que varias molécula diana-complejos o agregados de moléculas de unión medien la unión indirecta de la primera partícula a la segunda molécula de unión de la estructura de superficie, mientras que la unión todavía se considera específica, ya que está mediada por la molécula diana.

15 El término "molécula de enlazador" como se describe en el presente documento, puede ser cualquier estructura adecuada para proporcionar el anclaje de la primera molécula de unión y/o la segunda molécula de unión a la superficie. El experto en la técnica estará al corriente de los medios y procedimientos para acoplar una molécula de enlazador a una superficie de partícula o una superficie de sensor plano. De acuerdo con un modo de realización específico adicional de la presente invención, la distancia de extremo a extremo incrementada requerida para una cinética de unión potenciada como se describe en el presente documento se puede lograr proporcionando la estructura de superficie de la superficie de sensor plano con una molécula de enlazador que tiene una extensión promedio suficientemente larga.

20 Con este propósito, la superficie y/o la molécula de enlazador puede comprender un resto de engarce que pueda acoplar un enlazador a una superficie. El "resto de engarce" como se usa en el presente documento se ha de entender como un conector entre una molécula de enlazador como se define en el presente documento y la superficie o una o más moléculas de superficie directamente sobre la superficie de partícula. De esta manera, es de pertinencia particular cualquier molécula de entrecruzamiento o conectora como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar avidina, derivados de estreptavidina, (estrept)avidina, proteínas relacionadas con avidina, entidades similares a avidina, tales como tamavidina 1 y 2, bradavidina, neutravidina, etc. para engarzar una molécula de enlazador y una superficie o estructura de superficie como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el resto de engarce puede comprender biotina, mientras que la superficie está recubierta o funcionalizada con estreptavidina. Los medios y procedimientos para recubrir una superficie con estreptavidina son conocidos por el experto en la técnica o pueden proceder de libros de texto o fuentes bibliográficas adecuadas.

35 Los ejemplos preferentes adicionales de pares de interacción adecuados como moléculas conectoras para el engarce son biotina/avidina, cualquier par anticuerpo/antígeno, por ejemplo, anti-FITC, FITC, anti-Texas Red/Texas Red, anti-digoxigenina/digoxigenina, hebras complementarias de ácido nucleico como se menciona anteriormente en el presente documento. El resto de engarce también puede comprender hebras complementarias de ácido nucleico, a causa del alto grado de multiplexación debida a las casi ilimitadas combinaciones específicas. También se apreciará por el experto en la técnica que tales moléculas conectoras que consisten en una secuencia de ácido nucleico se pueden integrar fácilmente en una estructura de enlazador.

40 Mediante la presente invención también se conciben restos de engarce que comprenden o que consisten en un grupo químico que puede estar enlazado covalentemente (por ejemplo, reticulado) mediante química de acoplamiento a una superficie o una molécula unida a una superficie. La reticulación es el procedimiento de juntar químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente, a menudo denominado bioconjugación. Típicamente, los reactivos de reticulación (o reticuladores) son moléculas que contienen dos o más extremos reactivos que pueden anclarse químicamente a grupos funcionales específicos sobre proteínas u otras moléculas, tales como grupos funcionales de proteínas, por ejemplo, amina primaria (-NH₂), carboxilos (-COOH), sulfhidrilos, o carbonilos (-CHO), o grupos reactivos reticuladores, tales como carbodiimida (por ejemplo, EDC), éster de NHS, imidoéster, éster de PFP, hidroximetilfosfina, maleimida, haloacetilo (bromo- o yodo-), piridildisulfuro, vinilsulfona, hidracida, diazirina, arilazida, o isocianato.

55 Mediante la presente invención también se concibe que la molécula de enlazador tenga una determinada longitud para actuar como una molécula de espaciador, es decir, para proporcionar una determinada distancia de la molécula de unión y la superficie de partícula. Se ha de entender que proporcionar tal distancia puede proporcionar otras ventajas varias:

60 Por ejemplo, una determinada distancia puede dar como resultado menos unión inespecífica de las partículas a otras moléculas y entre sí. Además, se puede minimizar la agrupación no específica de las partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, que normalmente tiene lugar.

De esta manera, las moléculas de enlazador de acuerdo con la presente invención pueden tener la función de una molécula conectora y/o la función de un espaciador. Con este propósito, estas moléculas poliméricas tienen preferentemente determinada longitud, resistencia y/o rigidez a fin de poder actuar como fibras poliméricas.

Mediante la presente invención también se concibe el uso de polímeros que se ensamblan en fibras, por ejemplo, mediante dimerización o multimerización de orden más alto. La ventaja concebida es que se puede incrementar la rigidez como se define en el presente documento. También se concibe el uso de "moléculas auxiliares" que ayudan a establecer una estructura de orden más alto que tienen la rigidez concebida, que, a su vez, da como resultado la longitud de extensión promedio del enlazador concebida. Un ejemplo concebido es una molécula de ácido nucleico monocatenario, que se puede ensamblar en una estructura de hélice dimérica, y que, a su vez, se puede ensamblar con una molécula auxiliar. Otros ejemplos concebidos para moléculas auxiliares son proteínas que pueden unir ácidos nucleicos, tales como a ADNss, ADNds o ambos (por ejemplo, proteínas de unión a ADN) o a ARNss, ARNds o ambos (por ejemplo, proteínas de unión a ARN). La unión de tales factores o proteínas se puede guiar preferentemente mediante motivos de unión específicos reconocidos por la proteína de unión, lo que puede estar presente en la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, ADNds o ADNss o ARNss. Una vez que tales factores de unión se unen en la molécula de ácido nucleico, se puede potenciar la rigidez del enlazador y puede conducir a enlazadores con una longitud de extensión promedio incrementada. Tal modificación del enlazador se puede llevar a cabo antes o durante un ensayo. En modos de realización específicos adicionales de la presente invención, las moléculas auxiliares, tales como proteínas de unión a ARN o ADN, pueden comprender dominios de interacción proteína-proteína, por ejemplo, los dominios SH3, PDZ, 14-3-3, SH2 o cualquier otro dominio adecuado conocido por el experto en la técnica. Los factores de unión secundarios, que comprenden dominios de interacción o dominios de reconocimiento compatibles, en consecuencia se pueden proporcionar permitiendo el ensamblado de complejos que comprenden ácidos nucleicos unidos por moléculas auxiliares, que, a su vez, se pueden unir mediante moléculas de interacción secundarias. En modos de realización adicionales, se pueden proporcionar estructuras de enlazador rígido en forma de polipéptidos poliméricos, por ejemplo, en base a la coformación y/o identidad molecular del colágeno, o proteínas similares a colágeno, tales como Scl1, Scl2, SclA o SclC. Estas moléculas se pueden combinar adicionalmente con otras moléculas de enlazador o grupos funcionales como se define en el presente documento.

En modos de realización específicos adicionales de la presente invención, las moléculas de enlazador polimérico pueden ser moléculas poliméricas que se pueden autoensamblar en condiciones adecuadas. En consecuencia, las moléculas poliméricas se pueden proporcionar junto con partículas, lo que conduce al ensamblado de los polímeros sobre la superficie de la partícula. El autoensamblado se puede controlar mediante parámetros adecuados, por ejemplo, la concentración de monómeros o unidades poliméricas necesaria para la polimerización, la concentración de factores de entrecruzamiento para monómeros o unidades poliméricas, el pH del entorno de reacción, la temperatura, la presencia de iones, la presencia de factores auxiliares, tales como proteínas, etc. En modos de realización adicionales, los polímeros autoensamblados se pueden desintegrar tras el cambio de tal condición adecuada, por ejemplo, por el cambio de pH, la reducción o incremento de la concentración de factores o monómeros, el cambio de temperatura, etc.

También es posible que la molécula de enlazador comprenda o consista en una estructura cargada como se define en el presente documento o esté integrada en una estructura de superficie estérica como se describe en el presente documento.

En modos de realización específicos adicionales de la presente invención, las moléculas de enlazador pueden ser moléculas similares a lineales, circulares o ramificadas, o una mezcla de las mismas.

Las moléculas de enlazador adecuadas en el contexto de la presente invención pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, polietilenglicol, polisacáridos, dendrímeros, dendrones, nanotubos, o cualquier derivado o combinación adecuada de los mismos.

Las moléculas de ácidos nucleicos como se define anteriormente en el presente documento ventajosamente se pueden usar como "moléculas de enlazador de ácido nucleico". Estas moléculas de enlazador pueden comprender moléculas de ácido nucleico bicatenario o/y monocatenario, preferentemente moléculas de ADN, o cualquier tipo de derivado de las mismas. Por ejemplo, el ADN puede estar en forma de, por ejemplo, ADN-A, ADN-B o ADN-Z o cualquier mezcla de estas formas. La molécula de enlazador también puede ser una molécula de APN, ACN, AHN, ANB o AAN, o cualquier mezcla o combinación de los mismos, o cualquier mezcla o combinación con otra molécula de enlazador como se define en el presente documento, por ejemplo, con cualquier tipo de ácido nucleico, tal como ADN o ARN.

El término "APN" se refiere a un ácido péptidonucleico, es decir, un polímero sintetizado artificialmente similar a ADN o ARN que se usa en la investigación biológica y tratamientos médicos, pero que no se conoce que se produzca de manera natural. La cadena principal de APN se compone típicamente de unidades de repetición de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces peptídicos. Los diversos sistemas de bases de purina y pirimidina se enlazan a la cadena principal mediante enlaces metilencarbonilo. Los APN se representan generalmente como péptidos, con el extremo N terminal en la primera (izquierda) posición y el extremo C terminal a la derecha. Aunque el ADN y el ARN tienen una cadena principal de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente, la cadena principal de APN se compone de unidades de repetición de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces peptídicos. En la técnica se conoce que los oligómeros de APN también muestran mayor especificidad al unirse a ADN complementarios. Los

detalles adicionales pueden proceder de cualquier fuente bibliográfica o libro de texto adecuado, por ejemplo, Nielsen PE, Egholm M (1999), An Introduction to Peptide Nucleic Acid, Curr. Issues Mol. Biol. 1 (2): 89-104.

5 El término "ACN" se refiere a un ácido aminociclohexitanonucleico. Además, el término se refiere a un ácido nucleico, es decir, una molécula de ácido nucleico que comprende, por ejemplo, 2'-desoxicarbaguanosina.

El término "AHN" se refiere a ácidos hexitolnucleicos, es decir, análogos de ADN que están contruidos a partir de bases nucleicas estándar y una cadena principal de 1, 5-anhidrohexitol fosforilada.

10 El término "ANB" se refiere a ácidos nucleicos bloqueados. Típicamente, un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido de ARN modificado y, por tanto, inaccesible. El resto de ribosa de un nucleótido de ANB se puede modificar con un entrecruzamiento extra que conecte los carbonos 2' y 4'. Tal entrecruzamiento bloquea la ribosa en una conformación estructural 3'-endo. La conformación de ribosa bloqueada potencia el apilamiento de bases y la organización previa de la cadena principal. Esto puede incrementar significativamente la estabilidad térmica, es decir, la temperatura de fusión del oligonucleótido.

15 El término "AAN" se refiere a ácidos arabinoico-nucleicos o derivados de los mismos. Un derivado de AAN preferente en el contexto de la presente invención es un 2'-desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleósido (2'F-AAN).

20 En determinados modos de realización de la presente invención, puede estar presente una molécula de enlazador de ácido en forma bicatenaria o híbrida, es decir, que comprenda una hebra y una hebra opuesta complementaria o antiparalela de una molécula de ácido nucleico asociada mediante apareamiento de bases entre las hebras, o una hebra sentido o antisentido de una molécula de ácido nucleico. El término "hebra sentido" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que comprende la secuencia, que es la misma que la de una copia de ARN mensajero que está traducido o se puede traducir en una proteína. El término, en el contexto de la presente invención, se refiere adicionalmente a moléculas que comprenden una hebra de una molécula de ácido nucleico híbrido, que no es idéntica a su hebra opuesta complementaria. En consecuencia, el término "hebra antisentido" como se usa en el presente documento se refiere a la molécula que comprende la hebra complementaria u opuesta con respecto a la hebra sentido como se define anteriormente. En modos de realización específicos adicionales, una molécula de enlazador de ácido nucleico puede ser una molécula de ácido ribonucleico bicatenario o híbrido. De forma alternativa, la molécula de enlazador de ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico monocatenario o una molécula de ácido ribonucleico monocatenario.

35 En modos de realización específicos, la molécula de enlazador es una molécula de ácido ribonucleico, o cualquier mezcla de un ácido ribonucleico con cualquiera de las demás moléculas de ácido nucleico mencionadas o con cualquier otra molécula de enlazador como se define en el presente documento, preferentemente, una molécula de ARN, o cualquier tipo de derivado de la misma. Por ejemplo, el ARN puede estar en forma de, p-ARN, es decir, piranosil-ARN o formas modificadas estructuralmente como ARN de horquilla o un ARN de tallo-bucle.

40 El ácido nucleico, incluyendo moléculas de ácido ribonucleico, puede ser de diferentes composiciones de bases y/o longitudes como se define en el presente documento. La longitud de la molécula de enlazador se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, puesto que si las moléculas de ácido nucleico se usan como enlazadores puede proporcionar una carga neta específica a la partícula, cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador de ácido nucleico puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula de enlazador de ácido nucleico no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

50 En un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, la molécula de enlazador es o comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADNds o bicatenario, ARNds o bicatenario, APN, un híbrido APN-ADN, y un híbrido ARN-ADN.

55 Un aspecto ventajoso, que también se concibe mediante modos de realización preferentes de la presente invención, es que los APN y APN/ADN o híbridos APN/ADN no se reconocen fácilmente por tanto las nucleasas como proteasas, lo que los hace resistentes a la degradación enzimática.

60 En otros modos de realización de la presente invención, los ácidos nucleicos adecuados también pueden comprender o consistir en moléculas de ADN monocatenario de diferentes composiciones de bases y/o longitudes. Por ejemplo, las moléculas monocatenarias pueden englobar la repetición de la secuencia de bases, ser completamente aleatorias, o ser de origen natural, o ser de una única base, por ejemplo AAA, etc., TTT, etc., CCC, etc., o GGG, etc.; o comprender tramos de tales regiones monobase, por ejemplo, comprender únicamente A y C, o C y T.

Los péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser enlazadores adecuados debido a su forma, rigidez y confirmación. Los enlazadores de moléculas peptídicas pueden ser de diferentes composiciones de aminoácidos y/o longitudes. La longitud de un enlazador de moléculas peptídicas puede variar entre aproximadamente 3 aminoácidos hasta aproximadamente 35 aminoácidos. También se conciben otras longitudes o cualquier valor de longitud en el intervalo indicado. Por ejemplo, la molécula de enlazador peptídico puede tener una longitud de 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 o más aminoácidos. La composición de aminoácidos puede variar entre composiciones de monoaminoácidos, por ejemplo, únicamente uno de los aminoácidos de origen natural o cualquier derivado de los mismos o aminoácidos disponibles sintéticamente, y composiciones de aminoácidos completamente aleatorias que comprenden o se seleccionan a partir de todos los aminoácidos conocidos. También se conciben composiciones que comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 o más aminoácidos diferentes. Los aminoácidos pueden estar presentes en tramos de aminoácidos idénticos o proporcionarse en forma de patrones o motivos, o se pueden distribuir aleatoriamente.

En modos de realización específicos, la longitud del enlazador de moléculas peptídicas se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, puesto que si las moléculas peptídicas se usan como enlazadores puede proporcionar una carga neta específica a la partícula, cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador peptídica puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula de enlazador peptídica no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

Las moléculas de enlazador proteicas o polipeptídicas pueden ser de diferentes composiciones de aminoácidos y/o longitudes. La longitud de la molécula proteica o polipeptídica puede variar entre aproximadamente 35 aminoácidos hasta aproximadamente 500 aminoácidos o más. También se conciben otras longitudes o cualquier valor de longitud en el intervalo indicado. Por ejemplo, la molécula peptídica puede tener una longitud de 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 aminoácidos o más.

En modos de realización específicos, la longitud del enlazador de la molécula de enlazador proteico o polipeptídico se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define anteriormente en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, puesto que si las moléculas proteicas o polipeptídicas se usan como enlazadores puede proporcionar una carga neta específica a la partícula, cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador proteica o polipeptídica puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula polipeptídica o proteica no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

Las moléculas glucídicas pueden ser enlazadores adecuados debido a su forma, rigidez y confirmación. Tales hidratos de carbono pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes. La longitud de la molécula puede variar entre aproximadamente 5 átomos de C hasta aproximadamente 100 átomos de C o más. También se conciben otras longitudes o cualquier valor de longitud en el intervalo indicado. Por ejemplo, la molécula glucídica puede tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 átomos de C o cualquier otro número de átomos de C entre los valores indicados.

En modos de realización específicos, la longitud de la molécula de enlazador glucídica se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, puesto que si las moléculas glucídicas se usan como enlazadores puede proporcionar una carga neta específica a la partícula, cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador glucídica puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula glucídica no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

Los lípidos pueden ser moléculas de enlazador adecuadas debido a su forma, rigidez y confirmación. Los lípidos constituyen un amplio grupo de moléculas que se produce de forma natural incluyendo, pero sin limitarse a, grasas, ceras, stiroles, vitaminas solubles en grasas (tales como las vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos. Tales lípidos se construyen típicamente a partir de un grupo de cabeza y cola de lípido. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidiletanolamina, fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina de huevo, dioleoilfosfatidiletanolamina. Son particularmente preferentes los fosfolípidos MPPC, DPPC, DPPE-PEG2000 o Liss Rhod PE. Los lípidos pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes. La longitud de la molécula puede variar entre aproximadamente 5 átomos de C hasta aproximadamente 100 átomos de C o más. También se conciben otras longitudes o cualquier valor de longitud en el intervalo indicado. Por ejemplo, la molécula lipídica puede tener una

longitud de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 átomos de C o cualquier otro número de átomos de C entre los valores indicados.

En modos de realización específicos, la longitud de la molécula de enlazador lipídica se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, puesto que si las moléculas lipídicas se usan como enlazadores puede proporcionar una carga neta específica a la partícula, cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador lipídica puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula lipídica no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

En un modo de realización preferente adicional, la estructura de enlazador también puede comprender o consistir en un polímero no biológico. El término "polímero no biológico" como se usa en el presente documento se refiere a un polímero que es no de una fuente biológica (biopolímero) y se sintetiza químicamente. Los polímeros adecuados para este propósito se han descrito en la técnica (por ejemplo, por Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E., Biomaterials Science, 2.º ed.; Eds.; Elsevier: Londres, 2004). Los ejemplos de polímeros no biológicos adecuados son polímeros biológicamente degradables, tales como poli(ácido glicólico) (PGA) o poli(ácido láctico) (PLA), poli(caprolactona) (PCL, poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP), polidioxanona (PDS), o poli(etilenglicol) (PEG) o copolímeros de los mismos también denominados heteropolímeros que proceden de dos (o más) especies monoméricas. El término "polímero de bloque" como se usa en el presente documento se refiere a copolímeros que comprenden dos o más subunidades de homopolímero enlazadas por enlaces covalentes. Los copolímeros de bloque con dos o tres bloques distintos se denomina copolímeros de dibloque y copolímeros de tribloque, respectivamente. Los copolímeros de bloque preferentes incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEP-PPO), poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) poli(óxido de etileno) (PEP-PPO-PEO), poli(óxido de etileno) -bloque-poli(L-lactida) (PEG-PLLA), poli(óxido de etileno)-bloque-poli(caprolactona) (PEG-PCL), poli(etilenglicol)-bloque-poli(α -hidroxiácido) (PEG-PHA) o Pluronic P-105.

Se puede usar las moléculas de polietilenglicol, en particular, como "moléculas de enlazador de polietilenglicol" en el contexto de la presente invención debido su forma, rigidez potencial y confirmación. Los polietilenglicoles concebidos mediante la presente invención pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes. Las variantes de polietilenglicol (PEG) preferentes incluyen moléculas de PEG polidisperso o monodisperso. El PEG polidisperso es particularmente preferente. El PEG puede estar ramificado, por ejemplo, con 3-10 cadenas de PEG que provienen de un grupo de núcleo central, pueden ser PEG de estrella que tienen de 10 a 100 cadenas de PEG que provienen de un grupo de núcleo central, o pueden ser PEG de peine que tienen múltiples cadenas de PEG injertadas en un polímero diferente o cadena principal de PEG lineal. De acuerdo con los pesos moleculares promedio de PEG, los PEG concebidos pueden ser PEG 10.000, PEG 12.000, PEG 15.000, PEG 20.000 o PEG que tienen pesos moleculares más altos. El PEG particularmente preferente es un PEG más grande de PEG 10.000.

También se pueden usar moléculas de PEG más pequeñas, tales como, por ejemplo, PEG 400, PEG 600, PEG 800, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, o PEG 8000 como parte de estructuras de enlazador, por ejemplo, en combinación con una o más moléculas de enlazador como se define en el presente documento.

En modos de realización específicos, la longitud de las moléculas de enlazador de polietilenglicol se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la presencia, tamaño o longitud de moléculas de estructura cargadas como se define en el presente documento, la carga neta específica total concebida de la partícula, en particular, si se usan derivados de moléculas de polietilenglicol que llevan cargas eléctricas o cualquier distancia de extremo a extremo concebida entre la molécula de unión y la superficie de partícula, o cualquier flexibilidad, rigidez o estabilidad concebidas de la molécula de enlazador. En determinados modos de realización de la presente invención, la molécula de enlazador de polietilenglicol, en particular, un derivado de la misma o versión modificada de la misma, puede ser una molécula cargada o no cargada. El término "molécula de polietilenglicol no cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una carga neta de la molécula de aproximadamente 0.

"Los dendrímeros" o "moléculas de enlazador dendrimético" pueden estar repetidamente ramificados, moléculas grandes prácticamente esféricas. Tales dendrímeros pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes, y/o grado de ramificación. La longitud se puede hacer dependiente de la carga neta específica total concebida, distancia de extremo a extremo concebida entre la moléculas de unión y la superficie de partícula, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número de moléculas cargadas por partícula. Los dendrímeros como se concibe mediante la presente invención pueden comprender especies de bajo peso molecular o de alto peso molecular. Los dendrímeros de acuerdo con la presente invención están preferentemente no cargados, es decir, las moléculas muestran una carga neta de 0.

Mediante la presente invención también se concibe el uso de dendrímeros de acuerdo con la presente invención como una parte de un enlazador. Con este propósito, los dendrímeros, en determinados modos de realización, pueden comprender grupos funcionales sobre la superficie molecular, por ejemplo, grupos hidrófilos, o, de forma alternativa, pueden tener funcionalidad interna. Los dendrímeros, como se concibe para los propósitos de la presente invención, pueden ser dendrímeros de 1.º, 2.º, 3.º, 4.º o una generación más alta. Por ejemplo, los dendrímeros preferentes incluyen dendrímero de Newkome o arbolol, y poliamidoamina (PAMAM). Se apreciará por un experto en la técnica que los dendrímeros conducen a estructuras que se pueden usar ventajosamente para proporcionar una estructura de superficie voluminosa y estérica sobre la superficie de partícula o superficie plana en la que la molécula de enlazador como se describe anteriormente en el presente documento es una parte de la misma o está incluida en la misma. Las variantes adicionales que se van a usar en el contexto de la presente invención, así como procedimientos de síntesis, etc. serán conocidos por el experto en la técnica o pueden proceder de documentos adecuados, tales como "Dendrimers and other dendritic polymers", Frechet y Tomalia, J. Wiley.

Se entiende que los "dendrones" o "moléculas de enlazador dendrónico" contienen grupos químicamente determinables individuales de dendrímeros, es decir, un punto focal de un dendrímero como se define anteriormente en el presente documento. Los dendrones de acuerdo con la presente invención están preferentemente no cargados, es decir, las moléculas muestran una carga neta de 0. En modos de realización particulares de la presente invención, los dendrones se pueden usar como una parte de un enlazador como se define en el presente documento.

El término "nanotubo" como se usa en el presente documento se refiere a nanotubos de carbono, es decir, alótropos de carbono con una nanoestructura cilíndrica. Tales nanotubos pueden ser nanotubos de pared individual o nanotubos de paredes múltiples. La presente invención también concibe moléculas de enlazador de la familia estructural del fullereno de diferentes tipos, formas y complejidad, por ejemplo, esféricas, o formas elipsoides de pelota de fútbol, fullereno en forma de pelota de fútbol, o una combinación de nanotubos con pelotas de fútbol, etc. Los nanotubos de acuerdo con la presente invención u otras moléculas de enlazador adecuadas de enlazador conocidos por el experto en la técnica están preferentemente no cargados, es decir, las moléculas muestran una carga neta de 0.

La molécula de enlazador de acuerdo con la presente invención preferentemente tiene longitud y consistencia determinadas a fin de poder incrementar la probabilidad de unión de la partícula a una superficie para dar como resultado una cinética de unión mejorada. En los enlazadores o espaciadores de la técnica anterior solamente se han considerado para la conexión de una molécula de unión a superficies y en términos de accesibilidad de las moléculas de unión. Sin embargo, la longitud de un enlazador, especialmente con respecto a una extensión máxima desde la partícula, no se describe previamente. Por lo tanto, mediante la presente solicitud se concibe proporcionar moléculas de enlazador adecuadas que tengan una determinada longitud que sean adecuadas para extender el punto de anclaje de la molécula de unión como se define en el presente documento lejos de la superficie de partícula o la superficie de sensor plano. Como se puede ver en la fig. 4, el enfoque concebido hace accesible un número incrementado de orientaciones en las que una partícula se puede unir a la superficie.

De esta manera, mediante la presente invención también se concibe una partícula como se define en el presente documento en la que la molécula de unión o de captura se ancla en la superficie de partícula por medio de una molécula de enlazador que tiene una longitud de extensión promedio determinada como se define en el presente documento. En un ejemplo específico de la presente invención, el uso de una molécula de ADNds largo y rígido como un enlazador da como resultado una extensión promedio significativa de la molécula de unión desde la superficie. El enfoque concebido da como resultado una potenciación significativa de la cinética de unión de una partícula con el sensor plano o superficie de partícula como se define en el presente documento. Como se puede inferir de las figs. 6 y 7, se pudo demostrar que el número de partículas unidas es una función de la longitud de enlazador. En estos ejemplos, se incubaron partículas recubiertas con estreptavidina de 500 nm y 1000 nm con enlazador de ADNds de longitud variable. Cada molécula de enlazador de ADNds contenía una molécula de biotina en un extremo y una molécula de Texas Red en el otro extremo y la superficie de sensor plano se recubrió con anticuerpos anti-Texas Red. Los gráficos de acuerdo con las figs. 6 y 7 muestran el incremento del número de partículas unidas con longitud (pb) en incremento de la molécula de enlazador de ADNds. La longitud óptima más grande de 700 pb para partículas de 500 nm corresponde a una longitud de contorno de más de 240 nm y una longitud de extensión promedio de más de 140 nm. Como se puede ver en la fig. 7, la longitud de enlazador óptima es 1000 pb correspondientes a una longitud de contorno de 340 nm para una partícula más grande (por ejemplo, 1000 nm) y una longitud de extensión promedio de aproximadamente 170 nm. De esta manera, la longitud de enlazador óptima es dependiente del tamaño de partícula y, en determinados modos de realización de la presente invención, se adaptan al tamaño de partícula o diámetro de partícula, por ejemplo, basándose en los resultados experimentales descritos en la parte de ejemplos a continuación en el presente documento.

El término "longitud de extensión promedio" como se usa en el presente documento se define como la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$, que se puede describir de acuerdo con el modelo de cadena vermiforme como:

$$\langle R^2 \rangle = 2 Pl [1 - (P / l) (1 - e^{-lP})],$$

en la que P es la longitud de persistencia del polímero y l es la longitud de contorno del enlazador.

- 5 El término "longitud de contorno" como se usa en el presente documento se refiere a la longitud de contorno de una cadena polimérica como la longitud en la máxima extensión físicamente posible.

Se pueden modelar eficazmente varios polímeros biológicamente importantes como cadenas vermiformes, incluyendo ARN y ADN bicatenario, ARN no estructurado y polipéptidos no estructurados. El modelo de cadena vermiforme de Kratky-Porod es adecuado para modelar polímeros semiflexibles a fin de aproximar las distancias de extremo a extremo y longitudes de persistencia. Sin embargo, el experto en la técnica está al corriente de otros numerosos modelos teóricos, por ejemplo, como se describe a continuación en el presente documento, para aproximar distancia de extremo a extremo y longitudes de persistencia.

- 15 El término "longitud de persistencia, P" como se usa en el presente documento se refiere a una propiedad mecánica básica que cuantifica la dureza o rigidez de un polímero o una cadena y se define como la longitud sobre la que se pierden las correlaciones en la dirección de la la tangente. En química, también se puede definir como la suma promedio de las proyecciones de todos los enlaces $j \geq i$ en un enlace i en una cadena indefinidamente larga (Flory, Paul J. (1969), Statistical Mechanics of Chain Molecules, Nueva York: Interscience Publishers). Cuando el ángulo θ entre un vector que es tangente al polímero en la posición 0 (cero) y un vector tangente en una distancia L lejos de la posición de 0, el valor esperado del coseno del ángulo desciende exponencialmente con la distancia,

$$\langle \cos\theta \rangle = e^{-L/P}$$

- 25 donde P es la longitud de persistencia y los corchetes angulares indican el promedio de todas las posiciones de partida. Los polímeros flexibles, tales como PEG, se pueden describir usando el modelo de Flory (recorrido aleatorio).

La longitud de persistencia también se puede definir usando la resistencia a la flexión B_s , el módulo de Young E y la sección de la cadena polimérica como se describe Mofrad, M.R.K, "Cytoskeletal mechanics: models and measurements", Cambridge Univ Press, 2006.

$$P_l = \frac{B_s}{k_B T}$$

$$B_s = EI$$

- 35 En el caso de una varilla rígida y uniforme I, se puede expresar como:

$$I = \frac{\pi a^4}{4}$$

donde a es el radio.

- 40 En la ciencia de los polímeros, la longitud de persistencia también se puede definir como la mitad de la longitud de Kuhn, es decir, la longitud de segmentos hipotéticos que la cadena puede considerar como libremente unidos. La longitud de persistencia iguala la proyección promedio del vector de extremo a extremo en la tangente al contorno de cadena en un extremo de cadena en el límite de longitud de cadena infinita.

- 45 Como se puede ver en la fig. 5, la longitud de una molécula de enlazador no es un criterio suficiente para generar una distancia de extremo a extremo alta, es decir, para posicionar la molécula de unión lejos de la superficie de partícula o superficie de sensor plano. La fig. 5 muestra ejemplarmente un bosquejo que compara la extensión de un anticuerpo anclado a la superficie por medio de un enlazador de PEG (izquierda) frente a un enlazador de ADNds (derecha), teniendo ambos la misma longitud de contorno. Sin embargo, el uso de moléculas o polímeros que sean muy largos en términos de longitud de contorno puede dar como resultado un pliegamiento de la molécula y finalmente una estructura

globular con una extensión menor. De esta manera, se concibe una extensión potenciada de la molécula de unión desde la superficie o una distancia de extremo a extremo incrementada que se puede lograr proporcionando un enlazador largo, así como rígido, como se describe en el presente documento. En el ejemplo como se ilustra en la fig. 5, la longitud de extensión promedio de una molécula de ADNds de 170 nm, que se considera tan rígida como se define en el presente documento, es 10 veces más grande que la longitud de extensión promedio de una molécula de PEG de la misma longitud de contorno. Sin embargo, también es posible usar enlazadores muy flexibles con una longitud de contorno grande con la condición de que la extensión promedio resultante sea suficientemente grande para proporcionar el efecto concebido.

Mediante la presente solicitud también se concibe proporcionar condiciones adecuadas bajo las que la longitud de extensión promedio como se define en el presente documento se incrementa a fin de dar como resultado una cinética de unión potenciada. En modos de realizaciones particularmente preferentes de la presente invención, los ejemplos de enlazador largo y rígido adecuado son moléculas basadas en ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, debido a la alta rigidez, en un enlazador de ADNds de 700 pb $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$ sería igual ~ 140 nm, un enlazador de 1000 pb daría como resultado $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$ de alrededor de ~ 170 nm.

En modos de realización específicos de la presente invención, las moléculas de enlazador pueden tener una longitud de extensión promedio de al menos aproximadamente 60 nm, preferentemente hasta aproximadamente 500 nm, preferentemente de al menos aproximadamente 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm 95 nm o 100 nm, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm, 190 nm, o 200 nm, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 220 nm, 250 nm, 270 nm, o 300 nm, lo más preferentemente de al menos 320 nm, 350 nm, 370 nm, o 400 nm. En modos de realización adicionales, la longitud de extensión promedio de la molécula de enlazador también puede ser más grande de 400 nm. La molécula de enlazador también puede tener cualquier otra longitud de extensión promedio adecuada entre los valores indicados.

En modos de realización específicos de la presente invención, la longitud de extensión promedio óptima de la molécula de enlazador es al menos 1/10, preferentemente al menos 1/9, preferentemente 1/8, más preferentemente de al menos 1/4, y lo más preferentemente 2/3 del diámetro de una partícula como se describe en el presente documento.

En un modo de realización preferente adicional, la longitud de extensión promedio es al menos un 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, o 19 %, más preferentemente un 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, o un 29 %, incluso más preferentemente un 30 %, 31 %, 32 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, lo más preferentemente un 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, o un 50 % del diámetro de una partícula como se describe en el presente documento.

En modos de realización particularmente preferentes, una partícula de un diámetro de aproximadamente 500 nm puede comprender moléculas de enlazador que muestran una longitud de extensión promedio de aproximadamente un 25 a un 30 %, más preferentemente de aproximadamente un 27 % del diámetro de partícula. En modos de realización preferentes adicionales, una partícula de un diámetro de aproximadamente 1000 nm puede comprender moléculas de enlazador que muestran una longitud de extensión promedio de aproximadamente un 15 a un 20 %, más preferentemente de aproximadamente un 17 % del diámetro de partícula.

Mediante la presente invención también se concibe proporcionar condiciones de detección o cambios en las condiciones de detección, tales como un desplazamiento del pH o un desplazamiento de la temperatura, lo que conduce a un cambio conformacional de la molécula de enlazador y/o un cambio en las características de rigidez de la molécula de enlazador. Por ejemplo, una molécula de enlazador con una longitud de contorno alta, pero rigidez baja, que está plegada se puede extender mediante el enfoque concebido. También es posible añadir un compuesto, composición, molécula, disolvente, y/o ion adicional que pueda interactuar o reaccionar con la molécula de enlazador para dar como resultado una rigidez incrementada de la molécula de enlazador y a una extensión promedio potenciada de la molécula de enlazador como anteriormente se define en el presente documento.

También es posible forzar una extensión incrementada en virtud del incremento de la densidad superficial de la molécula de enlazador. Se aprecia que aunque disminuye la longitud de extensión promedio de polímeros flexibles debido a la formación de estructuras globulares, un incremento de la densidad de la molécula de enlazador sobre la partícula o superficie de sensor plano puede dar como resultado un solapamiento de moléculas de modo que las moléculas de enlazador se puedan estabilizar entre sí como se puede ver en la fig. 8. Sin embargo, los resultados mostrados en la fig. 9 demuestran que flexibilidad del enlazador es un aspecto importante que contribuye a una cinética de unión potenciada. Los diagramas en la fig. 9 demuestran que disminuye la cinética de unión como resultado de una movilidad disminuida tras una sobrecarga de la superficie con más moléculas de ADNds. De esta manera, se concibe una molécula de enlazador largo y rígido que todavía puede conservar una determinada movilidad suficiente para realizar las diferentes orientaciones de la molécula de enlazador a fin de conseguir el incremento concebido de la cinética de unión. En consecuencia, el número y/o longitud de moléculas de enlazador se puede adaptar a las propiedades de las partículas, en particular, el tamaño de partícula.

65

Como se usa en el presente documento "rigidez" o "rígido" también denominada "dureza" define la propiedad de un cuerpo sólido para resistir la deformación. Se aprecia que rigidez de una molécula de enlazador contribuye esencialmente a la longitud de extensión promedio. De esta manera, la "flexibilidad" como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de un cuerpo sólido, que se puede deformar fácilmente. De esta manera, en el contexto de la presente invención, una molécula, polímero, o enlazador flexible tiene una rigidez baja como se define en el presente documento, que puede dar como resultado una doblez y plegamiento de la molécula.

En un modo de realización específico de la presente invención la rigidez de una molécula de enlazador se determina por medio de la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$, donde $\langle R^2 \rangle$ como se define anteriormente. En consecuencia, en determinados modos de realización, la rigidez se puede medir en términos de la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador o longitud de extensión promedio en comparación con su longitud de contorno como se define en el presente documento. De esta manera, por ejemplo, una longitud de contorno de una molécula de enlazador, que es esencialmente idéntica a la longitud de extensión promedio de una molécula de enlazador indica una rigidez alta de la molécula de enlazador. Por otro lado, una longitud de contorno de una molécula de enlazador, que es significativamente más grande que la longitud de extensión promedio de dicho enlazador indica una rigidez baja de la molécula de enlazador.

En modos de realización preferentes de la presente invención, la rigidez y longitud de la molécula de enlazador se selecciona de modo que la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$ es al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, o 15 %, preferentemente aproximadamente un 20 %, 25 %, o 30 %, 35 %, incluso más preferentemente aproximadamente un 40 %, 45 %, o 50 %, lo más preferentemente aproximadamente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o un 75 % con respecto al diámetro de partícula.

En otro modo de realización preferente de la presente invención la rigidez y longitud de dicha molécula de enlazador se selecciona de modo que la distancia de extremo a extremo de la media cuadrática del enlazador $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$ es al menos aproximadamente un 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, o un 19 %, más preferentemente un 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, o un 29 %, incluso más preferentemente un 30 %, 31 %, 32 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, lo más preferentemente un 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, o un 50 % con respecto al diámetro de partícula.

En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, se puede lograr un incremento más alto de la sensibilidad y cinética de unión cuando ambas estructuras de superficie, en concreto, la superficie de la partícula y la superficie de sensor plano, comprenden un enlazador largo y rígido como se describe anteriormente en el presente documento.

Mediante la presente solicitud también se concibe que el enlazador se proporcione a una partícula antes de un ensayo que anterior a la captura de una molécula diana. La fig. 10 muestra partículas que se cargan previamente con moléculas de unión ancladas en la superficie por medio de una molécula de enlazador largo y rígido como se define anteriormente en el presente documento.

En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, la estructura de superficie de la superficie de sensor plano se forma después de que la segunda molécula de unión que está anclada en un enlazador largo ha reconocido la molécula diana que ha unido la primera molécula de unión. Como se ilustra en la fig. 11, la segunda molécula de unión se ancla en una molécula de enlazador. El otro extremo de la molécula de enlazador comprende una molécula para engarzar la molécula de enlazador a la superficie. Por ejemplo, una molécula ejemplar para este propósito es biotina, que se puede unir a estreptavidina sobre la superficie de sensor plano. El efecto concebido de este enfoque se muestra en la fig. 12, en el que únicamente tiene lugar la unión específica en virtud de la unión de la segunda molécula que se une con un enlazador largo, lo que conduce a una distancia de extremo a extremo incrementada de partícula y superficie de sensor plano.

En modos de realización preferentes adicionales de la presente invención, la primera y/o segunda partícula como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente una estructura de superficie repulsiva. El término "estructura de superficie repulsiva" como se usa en el presente documento se refiere a una estructura que se puede anclar directa o indirectamente a la superficie de una partícula como se describe en el presente documento. Una estructura de superficie repulsiva en el significado de la presente invención comprende moléculas, polímeros o y/o una malla de moléculas que pueden conferir una fuerza repulsiva. El término "fuerza repulsiva" como se usa en el presente documento se refiere a fuerzas, que conducen a una repulsión de moléculas o partículas. Mediante la presente invención se concibe preferentemente la repulsión de partículas magnéticas. En general, una fuerza repulsiva entre partículas puede ser el resultado de fuerzas interparticulares, tales como repulsión por volumen excluido, repulsión electrostática, fuerzas entrópicas, o fuerzas estéricas entre las superficies cubiertas con polímero. El término "repulsión por volumen excluido" quiere decir la imposibilidad de cualquier solapamiento entre partículas sólidas o, si es aplicable, entre partículas sólidas, incluyendo las estructuras de superficie presentes en las partículas. Se observa "repulsión electrostática" entre partículas cuando las partículas llevan una carga eléctrica neta. Si dos partículas llevan la misma carga neta, es decir, tanto carga positiva como negativa, se repelerán entre sí. El término "fuerzas entrópicas" se refiere las fuerzas que se basan en la segunda ley de la termodinámica, que describe la tendencia de un

sistema de avanzar hacia un estado en el que se maximiza la entropía. Esto puede dar lugar a fuerzas repulsivas eficaces entre esferas sólidas, por ejemplo, partículas magnéticas. El término "fuerza repulsiva estérica" se basa en un efecto estérico. Se ha de entender que por a nivel atómico, los efectos estéricos surgen del hecho de que cada átomo en una molécula ocupa una determinada cantidad de espacio. Si los átomos se acercan entre sí, el coste asociado en energía es alto debido al solapamiento de nubes de electrones (repulsión de Pauli o Born) y puede afectar a la forma preferente o conformación y reactividad de la molécula. De ahí que el impedimento estérico o efectos estéricos se puedan ver como nubes de electrones de átomos individuales y, en principio, se puedan definir como un resultado de repulsión electrostática a nivel atómico.

La expresión "en el que dicha estructura de superficie repulsiva transmite un efecto de empuje sobre dichas partículas hacia dicha superficie de sensor" como se usa en el presente documento quiere decir que todo un ensamblado de partículas se empuja hacia la superficie de sensor. Este efecto de empuje total se basa en o está provocado por efectos de empuje electrostático de estructuras de superficie repulsiva de una partícula, por ejemplo, un efecto de empuje electrostático entre dos o más partículas, o efectos de empuje estérico de estructuras de superficie repulsiva de una partícula, por ejemplo, un efecto de empuje estérico entre dos o más partículas, o una combinación de ambos, un efecto de empuje electrostático y un efecto de empuje estérico de una partícula, por ejemplo, entre dos o más partículas. Por ejemplo, el efecto de empuje total se puede hacer dependiente del número de partículas en el ensayo, el número de partículas en la proximidad de la superficie de sensor, la carga total de dos o más partículas, la proporción de empuje electrostático frente a estérico, y parámetros adicionales conocidos por el experto en la técnica. Estos parámetros se puede ajustar y/o modificar de acuerdo con las necesidades específicas y requerimientos de los modos de realización del dispositivo o de ensayos llevados a cabo como se describe en el presente documento.

En un modo de realización preferente adicional de la presente invención, el efecto de empuje total como se define anteriormente en el presente documento se determina midiendo el incremento de la interacción superficial. El término "incremento de la interacción superficial" como se usa en el presente documento se refiere a un incremento en la cantidad o número de partículas que están presentes en o cercanas a la superficie de sensor como resultado de las fuerzas de repulsión entre partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, de acuerdo con la presente invención. En otras palabras, el incremento de interacción superficial, de esta manera, quiere decir el incremento de la interacción de partículas con la superficie de sensor. El incremento de interacción superficial se puede medir por medio de la cantidad del tiempo que las partículas pasan en estrecho contacto con la superficie de sensor. El término "estrecho contacto" quiere decir que las partículas están cerca o en la superficie para generar una señal cuando están suficientemente próximas a la superficie de sensor, por ejemplo, una señal luminosa, usando procedimientos de medida apropiados. Los procedimientos adecuados para la medida de partículas cerca o en la superficie de sensor son conocidos por el experto en la técnica y, por ejemplo, se han descrito en Bruls *et al.*, Lab Chip, 2009, 9. 2504-3510.

En modos de realización preferentes de la presente invención, el incremento de interacción superficial se determina midiendo la amplitud de señal durante el ensayo. Sin estar limitado a los mismos, un ejemplo concebido de determinar el incremento de interacción superficial es la medida de la amplitud de señal por medio de reflexión interna total frustrada (RITF) como se describe en el presente documento. La amplitud de señal por RITF resultante corresponde entonces al número de partículas presentes en el campo evanescente.

El incremento de interacción superficial se calcula a partir de la amplitud de señal resultante de la medida que usa partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, funcionalizadas con una estructura de superficie repulsiva como se define anteriormente en el presente documento en relación con la amplitud de señal resultante de la medida que usa partículas no funcionalizadas, por ejemplo, partículas magnéticas, es decir, partículas sin ninguna estructura de superficie repulsiva. Por ejemplo, si el incremento de la superficie de contacto se incrementa en un factor de dos, es decir, la amplitud de señal que usa partículas magnéticas funcionalizadas con una estructura de superficie repulsiva es el doble de la señal de amplitud de partículas no funcionalizadas, por ejemplo, partículas magnéticas, el incremento en la interacción superficial es de un 100 %.

En modos de realización preferentes de la presente invención, el incremento de la interacción superficial entre partículas y la superficie de sensor, puede ser al menos aproximadamente un 1 %. Por ejemplo, el incremento de interacción superficial puede ser un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 140 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 280 %, 300 %, 320 %, 340 %, 360 %, 380 %, 400 %, 420 %, 440 %, 460 %, 480 %, 500 % o más de un 500 %.

En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, una estructura de superficie repulsiva puede ser una estructura cargada o un recubrimiento estérico presente en la partícula, por ejemplo, partícula magnética.

Un "recubrimiento estérico" como se usa en el presente documento se refiere a una estructura de superficie, que puede estar presente en una partícula en forma de un recubrimiento, y que proporciona repulsión entre partículas. Un efecto importante concebido por la presente invención es que la presencia de tal recubrimiento estérico dará como resultado una repulsión incrementada mutua de las partículas, repulsión que, a su vez, conduce a la formación de una fuerza de empuje, dando como resultado, de esta manera, un empuje de las partículas hacia el sensor plano sin la

necesidad de incrementar la concentración de partículas como se describe en la técnica (efecto de empuje). De esta manera, el enfoque concebido tiene el efecto de que la superficie de contacto de las partículas se incrementa con la fuerza de repulsión de las partículas, lo que conduce, de esta manera, a una tasa de reacción incrementada y, finalmente, a cambios en la señal incrementados al final del ensayo.

La presente invención describe una manera de cómo este efecto se puede lograr, en concreto, proporcionando una malla de moléculas sobre la superficie de las partículas que pueda actuar como recubrimiento estérico o barrera para impedir la unión no específica de moléculas no relacionadas, o, que mantenga otras moléculas o partículas en una determinada distancia. Se apreciará por el experto en la técnica que las partículas que tienen tal recubrimiento estérico, por ejemplo, en forma de un recubrimiento que comprende una maya de moléculas, puede ejercer una repulsión estérica determinada.

El recubrimiento sobre las partículas puede ser tal que forman una red o malla de moléculas. Por lo tanto, una capa de un recubrimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender entidades o unidades pequeñas, que tienen propiedades químicas, físicas y/o biológicas similares. Preferentemente, una capa de recubrimiento como se describe en el presente documento puede comprender moléculas biológicas o químicas que puedan formar polímeros de una longitud determinada. Los polímeros adecuados son, por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos, polietilenglicol, polisacáridos, dendrímeros, dendrones, nanotubos, o una mezcla de los mismos. Preferentemente, estas entidades poliméricas están comprendidas en moléculas de espaciador o enlazador. En modos de realización específicos de la presente invención, el recubrimiento puede comprender una capa de superficie individual o una estructura de armazón multicapa.

El término "moléculas de espaciador" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas, que tienen principalmente la función de un espaciador. Con este propósito, estas moléculas poliméricas tienen determinada longitud y resistencia a fin de poder actuar como fibras poliméricas.

En modos de realización específicos de la presente invención, las moléculas de espaciador pueden tener una longitud de hasta aproximadamente 500 nm, por ejemplo, hasta aproximadamente 450, 400, 350, 300, 250 nm, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 nm.

En modos de realización específicos adicionales de la presente invención, las moléculas de espaciador pueden ser moléculas similares a lineales, circulares o ramificadas, o una mezcla de las mismas. Si están ramificadas, pueden estar ramificadas en diferentes grados, por ejemplo, mostrar 2, 3, 4, 4 o más los niveles jerárquicos. La presente invención concibe adicionalmente una combinación de diferentes tipos, por ejemplo, lineal y ramificado, diferentes grados de ramificación, diferentes longitudes de espaciador, etc. de moléculas de espaciador en una red, capa o estructura de armazón. En modos de realización alternativos de la presente invención, la molécula de espaciador o mezcla moléculas de espaciador proporcionan una red o malla uniforme, es decir, una red o malla equidistante con aberturas de esencialmente el mismo tamaño. También se concibe que la malla esté provista de aberturas. Es particularmente preferente si la malla es tan uniforme, de modo que las propiedades funcionales de la malla con respecto a la accesibilidad de las moléculas y la libertad de movimiento de moléculas son uniformes. Estos parámetros se pueden ajustar mediante las longitudes, grado de ramificación, etc. de las moléculas de espaciador.

En modos de realización preferentes adicionales, la molécula de enlazador es más larga que la estructura de superficie. El término "más larga" como se usa en el presente documento quiere decir que la longitud de extensión promedio de la molécula de enlazador es más grande que la longitud de extensión promedio de la estructura de superficie. La diferencia en la longitud de extensión promedio puede ser un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 500 %, 1000 % o más.

En modos de realización específicos adicionales de la presente invención, el las moléculas espaciador se pueden ser directa o indirectamente interrelacionar para formar una malla tridimensional de moléculas. Tal interrelación puede estar basada en grupos funcionales en los extremos de una molécula o puede estar situada en el centro de una molécula, por ejemplo, en el caso de que se conciba la ramificación. El control de la interrelación, su grado, etc. se puede implementar de acuerdo con los principios y procedimientos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, a partir de un libro de texto cualificado, tal como "Bioconjugate techniques", Hermanson, 2^o ed. Academic Press, Elsevier o "Dendrimers and other dendritic polymers" Frechet y Tomalia, J. Wiley.

Por ejemplo, las moléculas de espaciador adecuadas en el contexto de la presente invención pueden ser, por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos, polietilenglicol (PEG), polisacáridos, dendrímeros, dendrones, o nanotubos como se define en el presente documento, o cualquier derivado adecuado o combinaciones de los mismos. El grupo de moléculas de espaciador puede comprender adicionalmente tensioactivos basados en hidrocarburos, colesterol, glucolípidos, ácidos biliares, saponinas, ácidos grasos, copolímeros de bloque anfipáticos sintéticos, productos naturales como fosfolípidos de yema de huevo.

Un ejemplo preferente de una molécula de espaciador adecuada para recubrimientos estéricos es una molécula de polietilenglicol (PEG). Las moléculas de polietilenglicol pueden formar una malla densa y voluminosa de moléculas

sobre una superficie. También se apreciará por el experto en la técnica que las moléculas de PEG se pueden interrelacionar para formar un recubrimiento estérico adecuado como se describe anteriormente en el presente documento. Las moléculas adecuadas para interrelacionar moléculas de PEG son moléculas conectoras como se describe en el presente documento. La longitud se puede hacer dependiente del espesor total concebido de la capa de recubrimiento resultante, la longitud concebida de la molécula de enlazador, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número concebido de moléculas de estructura por partícula.

Mediante la presente invención también se concibe el número de moléculas de polietilenglicol ancladas en la partícula. Se entiende que cuantas más moléculas se anclan en la partícula, más alta será la densidad y espesor de la capa de recubrimiento, lo que conduce a una repulsión partícula-partícula a través del efecto estérico. De esta manera, se entiende que la repulsión estérica de la partícula depende del espesor de la capa de recubrimiento, que depende del número de moléculas de PEG sobre las partículas magnéticas, la longitud de la molécula de PEG y el número de uniones entre las moléculas de PEG. El número de moléculas por partícula puede ser al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente al menos aproximadamente 100, 150, 200, 250, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 500, o 1000.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas de polietilenglicol ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento. En modos de realización específicos, el número de moléculas de polietilenglicol por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, incluso más preferentemente hasta aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000. En modos de realización adicionales, el número de moléculas de polietilenglicol por partícula se puede ajustar en aproximadamente 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, 150000, o más. El número de moléculas de polietilenglicol por partícula adicionalmente se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular de las moléculas de polietilenglicol o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica.

En modos de realización adicionales, la cobertura superficial de una partícula por moléculas de polietilenglicol puede estar en aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la superficie total de la partícula o cualquier valor entre estos valores.

En modos de realización adicionales, un recubrimiento estérico como se define en el presente documento transmite un radio hidrodinámico de una partícula de acuerdo con la presente invención de al menos aproximadamente un 105 % del radio de una partícula como se define en el presente documento. El término "radio hidrodinámico de una partícula" como se usa en el presente documento se refiere al radio eficaz de una partícula hidratada que comprende un recubrimiento estérico en solución, o el tamaño aparente de la partícula que comprende un recubrimiento estérico en solución. Preferentemente, un recubrimiento estérico se refiere a una multitud, por ejemplo, la totalidad, de las moléculas que contribuyen al efecto estérico como se describe en el presente documento. El radio hidrodinámico de una partícula que comprende un recubrimiento estérico como se define en el presente documento puede ser al menos aproximadamente un 105 % del radio de una partícula como se define en el presente documento, en particular, del radio de una partícula que no comprende tal recubrimiento estérico. Por ejemplo, el radio hidrodinámico de una partícula que comprende un recubrimiento estérico como se define en el presente documento puede ser aproximadamente un 105 %, 110 %, 120 %, 125 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 250 % o cualquier valor entre estos valores o más del radio de una partícula como se define en el presente documento, por ejemplo, una partícula magnética, en particular de una partícula que no comprende tal recubrimiento estérico.

En otros modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, las partículas pueden comprender una estructura cargada a fin de generar una fuerza de repulsión entre las partículas. El término "estructura cargada" como se usa en el presente documento se refiere a una entidad, que contribuye a la carga neta de una partícula de acuerdo con la presente invención. Las estructuras cargadas de acuerdo con la presente invención pueden tener una carga neta que puede ser tanto positiva como negativa. Se entiende que una estructura cargada no está limitada a un tipo específico o forma de moléculas. Por ejemplo, una estructura cargada puede comprender un polímero de un tipo de moléculas o de dos o más tipos diferentes de moléculas, un complejo de diferentes moléculas o entidades, o un compuesto que comprende varias moléculas que tienen diferentes cargas, por ejemplo, diferentes cargas positivas, diferentes cargas negativas, o (diferentes) cargas positivas y negativas, dando como resultado una carga neta total positiva o negativa. Las herramientas y procedimientos para el cálculo de cargar son conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, a partir de M.J.S., The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry, McGraw-Hill, and Inc., 1969; o Stewart, R., The Proton: Applications to Organic Chemistry, Academic Press, Inc., 1985, 72.

En modos de realización específicos de la presente invención, la estructura cargada se puede anclar directa o indirectamente en la partícula para dar como resultado una carga neta específica de la partícula. La carga neta específica puede ser positiva o negativa. También es posible que diferentes estructuras cargadas se anclen en la misma partícula para dar lugar a una mezcla de estructuras cargadas. En el contexto de la presente invención, una estructura cargada puede cubrir la superficie de la partícula para proporcionar una molécula totalmente cargada que tiene una carga neta específica. Es conocido por un experto en la técnica que la carga neta de una nanopartícula se puede determinar, por ejemplo, por medio de la medida del potencial zeta.

Una ventaja concebida es que la repulsión incrementada debida a la presencia de cargas incrementadas sobre la partícula, preferentemente una partícula magnética, conduce a una repulsión electrostática incrementada, que, a su vez, minimiza la agrupación no específica de las partículas. La reducción de la agrupación no específica puede ayudar a reducir el nivel base sin el uso de un tensioactivo, conduciendo de esta manera a la mejora del nivel de blanco en ensayos de detección optomagnética, como se describe en el presente documento y, de esta manera, mejora el límite de detección. Otro efecto importante concebido mediante la presente invención es que la presencia de una carga incrementada sobre las partículas, que bien sea una carga positiva como una carga negativa, dará como resultado una repulsión electrostática mutua incrementada de las partículas, que, a su vez, conduce a la formación de una fuerza "de empuje" electrostático, dando como resultado, de esta manera, un empuje de las partículas hacia el sensor plano sin la necesidad de incrementar la concentración de partículas como se describe en la técnica. El enfoque concebido tiene el efecto de que la superficie de contacto de las partículas se puede incrementar con la carga de las partículas, lo que conduce, de esta manera, a una tasa de reacción incrementada y, finalmente, a cambios en la señal incrementados al final del ensayo.

En modos de realización preferentes adicionales, la presencia incrementada de una carga sobre las partículas se puede lograr bien proporcionando una molécula de enlazador como se describe en el presente documento que comprende o consiste en una estructura cargada, o proporcionando una estructura cargada anclada en las partículas además de una molécula de enlazador.

En modos de realización específicos de la presente invención, las estructuras cargadas pueden cubrir toda la superficie de una partícula para proporcionar una molécula totalmente cargada que tiene una carga neta específica. En modos de realización alternativos, las estructuras cargadas pueden cubrir únicamente porciones, zonas o sectores de una partícula, por ejemplo, un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % o menos de la superficie total de una partícula, o cualquier valor entre estos valores.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas de estructura cargadas ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con una carga neta total concebida de la partícula. Se entiende que la carga neta total de la partícula varía, por ejemplo, se incrementa o disminuye con el número de moléculas cargadas que están ancladas en la partícula. En consecuencia, el potencial zeta (mV), se puede incrementar (negativamente) con la cantidad en incremento de partículas, así como con la longitud en incremento de las moléculas. De esta manera, es posible que la suma de cargas presente en una partícula contribuya a la carga neta total. También se aprecia adicionalmente que la carga neta total de la partícula es una función, entre otros, del número de moléculas presentes en las partículas magnéticas y la longitud de la molécula, su carga positiva o negativa, etc. En modos de realización específicos, el número de moléculas de estructura cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, or 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, 150000, o más. El número de las moléculas de estructura cargadas por partícula puede ser diferente o se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular o química de las moléculas de estructura cargadas, el uso concebido, por ejemplo, un ensayo, o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica.

Las estructuras cargadas adecuadas a fin de obtener este efecto de empuje electrostático como se describe en el presente documento pueden comprender una estructura biológica o química o compuesto que pueda contribuir a una carga neta específica, tal como un ácido nucleico, un ácido ribonucleico, un péptido, un polipéptido o proteína, un hidrato de carbono, un lípido, o un polisacárido, o cualquier derivado adecuado o combinaciones de los mismos. También se conciben un hidrogel, y una estructura cargada polimérica. Es preferente el uso de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico.

Las "moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico" puede ser cualquier molécula de ácido nucleico, o un derivado o análogo del mismo. Por ejemplo, tales moléculas de estructura cargadas pueden comprender moléculas de ADN o ARN bicatenario y/o monocatenario, o cualquier tipo de derivado de los mismos. Tales moléculas de estructura cargadas pueden comprender adicionalmente o consistir en una molécula de APN, ACN, AHN, ANB o AAN

como se define anteriormente en el presente documento, o cualquier mezcla o combinación de las mismas, por ejemplo, una combinación de una cualquiera de ADN, ARN, APN, ACN, AHN, ANB y AAN o una mezcla de nucleótidos de ANB con bases de ADN o ARN, o cualquier mezcla o combinación con cualquier otra molécula de estructura cargada como se define en el presente documento. En el contexto de las estructuras cargadas basadas en ácido nucleico, los ácidos nucleicos o análogos de los mismos pueden estar provistos adicionalmente de unidades o grupos químicos que llevan una carga. Por ejemplo, se pueden incluir o añadir grupos fosfato, derivados de nitrógeno cargados o derivados de azufre cargados. Además, se pueden acumular cargas proporcionando moléculas híbridas de las que al menos una molécula comprende cargas, por ejemplo, un híbrido que comprende ADN.

En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, las partículas, por ejemplo partículas magnéticas, pueden estar funcionalizadas con estructuras cargadas, por ejemplo, ácido nucleico bicatenario o monocatenario, en particular, ADNds, que puede tener una duración variable. En consecuencia, la carga en las partículas se puede medir en virtud de su potencial zeta. Mediante la presente invención se concibe que la superficie de contacto de las partículas se incrementa con la carga de las partículas, lo que conduce, de esta manera, a una tasa de reacción incrementada y, finalmente, a cambios en la señal incrementados al final del ensayo. En determinados modos de realización de la presente invención, puede estar presente una estructura cargada, tal como un ácido nucleico en forma bicatenaria o híbrida, es decir, que comprenda una hebra y una hebra opuesta complementaria o antiparalela de una molécula de ácido nucleico asociada mediante apareamiento de bases entre las hebras, o una hebra sentido o antisentido de una molécula de ácido nucleico. De forma alternativa, la estructura cargada puede comprender un ácido nucleico monocatenario o una molécula de ácido ribonucleico monocatenario.

En un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, la estructura cargada comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en ADNds o bicatenario, ARNds o bicatenario, APN, un híbrido APN-ADN, y un híbrido ARN-ADN. Un aspecto ventajoso, que también se concibe mediante modos de realización preferentes de la presente invención, es que los APN y APN/ADN o híbridos APN/ADN no se reconocen fácilmente por tanto las nucleasas como proteasas, lo que los hace resistentes a la degradación enzimática.

En otros modos de realización de la presente invención, las moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico adecuadas también pueden comprender o consistir en moléculas de ADN monocatenario de diferentes composiciones de bases y/o longitudes. Por ejemplo, las moléculas monocatenarias pueden englobar la repetición de la secuencia de bases, ser totalmente aleatorias, o ser de origen natural, o ser de una única base.

Las moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico o combinaciones de las mismas como se define anteriormente en el presente documento pueden ser de diferentes composiciones de bases y/o longitudes. La longitud de la molécula puede variar entre aproximadamente 5 nucleótidos hasta aproximadamente 5000 nucleótidos, preferentemente entre aproximadamente 50 nucleótidos hasta aproximadamente 3000 nucleótidos, entre aproximadamente 100 nucleótidos hasta aproximadamente 2000 nucleótidos incluso más preferentemente, lo más preferentemente entre aproximadamente 400 nucleótidos hasta aproximadamente 1000 nucleótidos. También se conciben otras longitudes o cualquier valor de longitud en el intervalo indicado. Por ejemplo, la molécula puede tener una longitud de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 nucleótidos o más, o cualquier número de nucleótidos entre los valores mencionados.

La longitud de las moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico se puede hacer dependiente de la carga neta específica total concebida, la longitud concebida de la molécula de enlazador, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número concebido de moléculas de estructura cargadas por partícula. Los procedimientos adecuados para el cálculo de cargas netas serán conocidos por el experto en la técnica, o pueden proceder de fuentes bibliográficas adecuadas.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con una carga neta total concebida de la partícula. Se entiende que la carga neta total de la partícula varía, por ejemplo, se incrementa o disminuye con el número de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico que están ancladas en la partícula. En modos de realización específicos, el número de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, incluso más preferentemente hasta aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000. En modos de realización adicionales, el número de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico por partícula se puede ajustar en aproximadamente 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, o 150000. El número de moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico por partícula adicionalmente se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción

entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular de las moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. En modos de realización adicionales, la cobertura superficial de una partícula por moléculas de estructura cargadas basadas en ácido nucleico puede estar en aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la superficie total de la partícula o cualquier valor entre estos valores.

Por ejemplo, las moléculas peptídicas, moléculas polipeptídicas o moléculas proteicas como se define anteriormente en el presente documento también pueden ser o comprender estructuras cargadas adecuadas debido a la presencia de entidades cargadas en los aminoácidos. En la técnica se describe que los grupos funcionales amina y ácido carboxílico que se encuentran en los aminoácidos les permiten tener propiedades anfipróticas. Los grupos ácido carboxílico ($-\text{CO}_2\text{H}$) se pueden desprotonar para volverse carboxilatos negativos ($-\text{CO}_2^-$) y los grupos alfa amino (NH_2) se pueden protonar para volverse grupos alfa amonio positivos ($^+\text{NH}_3$). El experto en la técnica también conoce que a valores de pH mayores que el pKa del grupo ácido carboxílico predomina el ion carboxilato negativo. A valores de pH más bajos que el pKa del grupo alfa amonio, el nitrógeno está predominantemente protonado como un grupo alfa amonio cargado positivamente. El experto en la técnica está adicionalmente al corriente del hecho de que la carga neta de un aminoácido depende del pH y el valor de pKa. Las herramientas y procedimientos para calcular la carga neta de un aminoácido, péptidos, polipéptidos o proteínas serán conocidos por el experto en la técnica o pueden proceder de referencias bibliográficas de cualificadas, tales como la herramienta Compute pI/MW que permite el cálculo del pI (punto isoeléctrico) y Mw (peso molecular), para una lista de entradas de UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot o TrEMBL) o para secuencias introducidas por usuarios Gasteiger E., *et al.*; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). Tales estructuras cargadas proteicas, polipeptídicas o peptídicas pueden ser de diferentes composiciones de aminoácidos y/o longitudes. La longitud se puede hacer dependiente de la carga neta específica total concebida, la longitud concebida de la molécula de enlazador, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número concebido de moléculas de estructura cargadas por partícula. Se entiende que la carga neta total de la partícula es una función del número de moléculas proteicas o peptídicas en la partícula, por ejemplo, partícula magnética, y la longitud de la molécula.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas proteicas, polipeptídicas o peptídicas cargadas ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con una carga neta total concebida de la partícula. En modos de realización específicos, el número de moléculas peptídicas, polipeptídicas o proteicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, aún más preferentemente hasta aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000. En modos de realización adicionales, el número de moléculas peptídicas, polipeptídicas o proteicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, 150000, o más. El número de moléculas peptídicas, polipeptídicas o proteicas cargadas por partícula adicionalmente se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular de las moléculas polipeptídicas o proteicas cargadas o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. En modos de realización adicionales, la cobertura superficial de una partícula por moléculas peptídicas, polipeptídicas o proteicas cargadas puede estar en aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la superficie total de la partícula o cualquier valor entre estos valores.

En modos de realización adicionales, una estructura cargada puede ser o comprender una molécula glucídica, por ejemplo, como se define anteriormente en el presente documento, que comprende una entidad cargada que puede contribuir a una carga neta total en la partícula. Tales hidratos de carbono pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes. La longitud se puede hacer dependiente de la carga neta específica total concebida, la longitud concebida de la molécula de enlazador, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número concebido de moléculas de estructura cargadas por partícula.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas glucídicas cargadas ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con una carga neta total concebida de la partícula. En modos de realización específicos, el número de moléculas glucídicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, incluso más preferentemente hasta aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000. En modos de realización adicionales, el número de moléculas glucídicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400,

2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, 150000, o más. El número de moléculas glucídicas cargadas por partícula adicionalmente se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular de las moléculas glucídicas cargadas o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. En modos de realización adicionales, la cobertura superficial de una partícula por moléculas glucídicas cargadas puede estar en aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la superficie total de la partícula o cualquier valor entre estos valores.

Una estructura cargada adecuada adicionalmente puede ser cualquier molécula lipídica, por ejemplo, como se define anteriormente en el presente documento, que comprende una entidad cargada que puede contribuir a una carga neta total en la partícula. La carga en los lípidos, especialmente fosfolípidos, se determina típicamente por la carga del grupo de cabeza. Los ejemplos preferentes de grupos de cabeza adecuados que pueden conferir una carga neta de la molécula lipídica son grupos de cabeza seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (GP), o cualquier combinación de los mismos.

Tales lípidos pueden ser de diferentes composiciones y/o longitudes. La longitud se puede hacer dependiente de la carga neta específica total concebida, la longitud concebida de la molécula de enlazador, la flexibilidad concebida, rigidez o estabilidad de la molécula de enlazador y/o el número concebido de moléculas de estructura cargadas por partícula.

En modos de realización adicionales de la presente invención, puede variar el número de moléculas lipídicas cargadas ancladas en la partícula como se define anteriormente en el presente documento, por ejemplo, de acuerdo con una carga neta total concebida de la partícula. En modos de realización específicos, el número de moléculas lipídicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90, más preferentemente hasta aproximadamente 100, 150, 200, 250, incluso más preferentemente hasta aproximadamente 300, 350, 400, o 450, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000. En modos de realización adicionales, el número de moléculas lipídicas cargadas por partícula se puede ajustar en aproximadamente 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000, 100000, 110000, 120000, 150000, o más. El número de moléculas lipídicas cargadas por partícula adicionalmente se puede hacer dependiente del tamaño o diámetro de la partícula, la zona en la que un anclaje es posible o adecuado, la proporción entre el tamaño o diámetro de la partícula y la longitud de la partícula, la identidad molecular de las moléculas lipídicas cargadas o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. En modos de realización adicionales, la cobertura superficial de una partícula por moléculas lipídicas cargadas puede estar en aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de la superficie total de la partícula o cualquier valor entre estos valores.

Un "hidrogel" que comprende una estructura cargada se refiere a una estructura tridimensional de una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas, en ocasiones encontrada como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Típicamente, los hidrogeles son altamente absorbentes, es decir, puede contener por encima de un 99,9 % de agua, polímeros naturales o sintéticos y puede retener grandes cantidades de agua con conservación de la estructura de red. Los hidrogeles también pueden poseer un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su significativo contenido en agua. Como resultado del alto contenido en agua, en general, los hidrogeles se consideran materiales biocompatibles, lo que los hace particularmente interesantes y para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Los ingredientes comunes de los hidrogeles pueden comprender, por ejemplo, poli(alcohol vinílico), poli(acrilato de sodio), polímeros de acrilato y copolímeros de acrilato con una abundancia de grupos hidrófilos. También se conciben materiales de hidrogel natural, tales como materiales que incluyen agarosa, metilcelulosa, hialuronano y otros polímeros de origen natural. Es adicionalmente preferente que los hidrogeles adicionalmente comprendan, comprendan o consistan en elementos cargados, tales como polímeros cargados o cualquier otra molécula o resto cargado, que se pueda usar como recubrimiento cargado de la superficie de partícula. Un estructura de hidrogel homogénea puede contribuir ventajosamente a una carga neta total de la partícula, lo que conduce a una repulsión electrostática de las partículas. En un modo de realización específico, las moléculas de enlazador y otros componentes del recubrimiento o estructura de superficie se pueden incluir en un sistema de entramado de hidrogel acuoso, que puede proporcionar adicionalmente una determinada de las moléculas. El experto en la técnica sabrá como seleccionar los polímeros cargados adecuados a fin de obtener un hidrogel con una carga neta total. Además, serán conocidos en la técnica medios y procedimientos para producir hidrogeles adecuados y anclarlos en la superficie de partícula. Los hidrogeles como se describe anteriormente en el presente documento también pueden comprender una molécula polimérica cargada como se describe en el presente documento.

En modos de realización adicionales, una estructura cargada también puede ser una "molécula polimérica cargada". El término "molécula polimérica cargada" o "polímero cargado" como se usa en el presente documento se refiere a un polímero o copolímero que comprende una pluralidad de unidades de repetición seleccionadas de unidades de repetición cargadas negativa o positivamente. De esta manera, tal polímero o copolímero funciona como apolielectrolito. Se entiende que la carga puede proceder de grupos cargados negativa o positivamente en la la unidad de repetición. Es es particularmente preferente un grupo cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en un grupo de amonio cuaternario, un grupo amina primaria, un grupo amina secundaria, un grupo amina terciaria, un grupo de fosfonio cuaternario, un grupo de fosfonio terciario, un grupo amida, un grupo de nitrógeno heteroaromático, y un grupo sulfonio.

Los polímeros resultantes cargados positivamente también se denominan polímeros catiónicos. La carga positiva de una molécula polimérica cargada puede impedir ventajosamente la formación de polímeros enrollados. Esto les permite contribuir más a la viscosidad en su estado estirado, a causa de que el polímero estirado ocupa más espacio.

Los polímeros cargados negativamente preferentes incluyen, pero no se limitan a, un grupo éster sulfato, un grupo éster carboxilato, un grupo éster fosfato, un grupo sulfona, un grupo sulfuro, un grupo disulfuro, un grupo éster orto, un grupo anhídrido, y un grupo beta-cetosulfona, o cualquier combinación de los mismos.

Los polielectrolitos se han utilizado en la formación de nuevos tipos de materiales conocidos como multicapas de polielectrolitos (PEM). Estas películas finas se construyen usando una técnica de depósito capa por capa (LbL). Durante depósito LbL, se sumerge de un lado a otro un sustrato de crecimiento adecuado (normalmente cargado) entre baños diluidos de soluciones de polielectrolitos positiva y negativamente cargadas. Durante cada inmersión, se adsorbe una pequeña cantidad de polielectrolito y la carga superficial se revierte, lo que permite la formación gradual y controlada de películas reticuladas de capas de polication-polianión. Se apreciará que tales multicapas de polielectrolitos son adecuadas para proporcionar las partículas de la presente invención con una carga neta total positiva o negativa.

En un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, la molécula de enlazador como se define en el presente documento y/o la estructura de superficie repulsiva como se define en el presente documento no se puede escindir mediante DNasa. En modos de realización particularmente preferentes de la presente invención, la molécula de enlazador como se define en el presente documento y/o la estructura de superficie repulsiva como se define en el presente documento no se puede escindir mediante RNasa. Además o de forma alternativa, la molécula de enlazador como se define en el presente documento y/o la estructura de superficie repulsiva como se define en el presente documento puede no escindirse mediante una enzima de restricción que pueda fragmentar una molécula de ácido nucleico bicatenario. Tal ausencia de escisión mediante DNasa, RNasa, o una enzima de restricción, se puede lograr proporcionando moléculas de enlazador o estructuras de superficie repulsiva que no representen un sustrato o motivo de reconocimiento para una enzima DNasa. Típicamente, se podría lograr el efecto usando análogos de ADN, tales como moléculas de APN, ACN, AHN, ANB o AAN como se define en el presente documento, o usando moléculas poliméricas, tales como PEG.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de enlazador como se define en el presente documento comprende adicionalmente al menos un espaciador flexible corto. En consecuencia, mediante la presente invención se concibe que las estructuras de enlazador como se definen en el presente documento, preferentemente enlazadores largos rígidos como se definen en el presente documento, lleven un espaciador flexible corto en uno o en ambos extremos. Un diseño de enlazador preferente se muestra en la fig. 13. Se aprecia que debido a la presencia de tal espaciador flexible se añade determinada flexibilidad a la molécula de enlazador rígido. De esta manera, las estructuras de espaciador flexible pueden servir como una articulación flexible, que contribuye a la movilidad de la molécula de enlazador mientras que conserva su rigidez total. Como mostrada en la fig. 4, el número de orientaciones posibles se incrementa o se facilita mediante tal espaciador flexible. El espaciador flexible puede ser cualquier molécula flexible, por ejemplo, una molécula polimérica, un grupo químico peptídico, etc.

En un modo de realización particularmente preferente, el espaciador flexible corto comprende un ácido nucleico monocatenario, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN monocatenario como se define en el presente documento, o cualquier otra forma de ácido nucleico monocatenario como se define en el presente documento o como es conocido por el experto en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de la presencia o cantidad de una molécula diana en una muestra que comprende las etapas de

- (a) poner en contacto la muestra y una primera molécula de unión anclada en una primera partícula en un dispositivo como se describe anteriormente en el presente documento, y
- (b) poner en contacto la muestra con
 - i) una segunda molécula de unión que se pueda anclar en una superficie plana o en una segunda partícula, en el que la primera molécula de unión y/o la segunda molécula de unión se pueden unir específicamente a dicha molécula diana, y opcionalmente

ii) una molécula análoga diana anclada en la superficie plana o en la segunda partícula; en el que la molécula diana puede interferir con la unión de la primera molécula de unión a la molécula análoga diana; y
(c) detectar el número de primeras partículas unidas a la superficie plana o a la segunda partícula,

5 en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

Mediante la presente invención se conciben formatos de ensayo, que pueden ser tanto típicos competitivo o no competitivo ensayos para la detección de la presencia y/o cantidad de un molécula diana. Se apreciará por el experto en la técnica que el dispositivo como se describe en el presente documento, así como el procedimiento de acuerdo con la presente invención, son adecuados para llevar a cabo tal análisis.

En el formato de ensayo no competitivo concebido, tanto la primera como segunda molécula de unión se pueden unir específicamente a la molécula diana. Es posible que en la primera etapa, la primera molécula de unión presente en una primera partícula pueda reconocer y se pueda unir a la diana. En una segunda etapa, la primera partícula que ha unido la molécula diana se puede dirigir por difusión o accionamiento magnético a una segunda molécula de unión presente en una segunda partícula o en una superficie de sensor plano. La unión a la superficie o de bien la segunda partícula como el sensor plano está mediada por la unión de la segunda molécula de unión a la diana. También se conciben una o más etapas de lavado donde las partículas inespecíficamente unidas se eliminan de la superficie. En modos de realización específicos de la presente invención, tales etapas de lavado tienen lugar por medio de accionamiento magnético pulsado. Posteriormente se detecta el número de partículas unidas, bien en virtud del número de agrupaciones de partículas o por medio de partículas unidas a la superficie de sensor plano como se define anteriormente en el presente documento. El número determinado de partículas unidas se corresponde directamente con el número de moléculas diana presentes en la muestra.

También se conciben formatos de ensayo basados en ensayos competitivos, que requieren típicamente la presencia de un competidor o análogo diana. El término "molécula análoga diana" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula, que compite con la molécula diana por la unión a la primera molécula de unión como se define en el presente documento. En tal caso, la molécula diana puede interferir en la unión de la primera molécula de unión a la molécula análoga diana. Mediante la presente invención se conciben formatos de ensayo de competición o inhibición, donde la primera proteína de unión puede unir una molécula análoga diana anclada en la superficie de la superficie plana o una partícula como se define anteriormente en el presente documento. Se puede impedir esta unión si una molécula diana como se describe en el presente documento está presente en la muestra y si esta molécula diana se une primero al anticuerpo. Por ejemplo, se puede detectar una pequeña molécula de fármaco usando el procedimiento concebido si un análogo de la molécula de fármaco, por ejemplo, se inmoviliza en la superficie de sensor plano. Si ningún fármaco está presente en la muestra, todas las partículas con la molécula de unión que reconocen la molécula diana se pueden unir a la molécula análoga diana en la superficie. Sin embargo, en presencia de moléculas de fármaco (diana), que interfieren en esta unión, las moléculas de unión antifármaco no se pueden unir o se unen menos al análogo diana en la superficie. En tal caso, la cantidad de partículas en la superficie está relacionada inversamente con la cantidad de moléculas diana.

Mediante la presente invención se concibe adicionalmente el uso específico de partículas magnéticas como se define anteriormente en el presente documento, que se pueden accionar por aplicación de un campo magnético de tal modo que se pueda acelerar el procedimiento analítico. También se concibe mediante la presente invención, que el uso de un campo magnético pueda reducir la señal de fondo que se debe a la eliminación de partículas inespecíficamente unidas. En la fig. 1 se ilustra un sistema optomagnético ejemplar adecuado para el procedimiento de detección de acuerdo con la presente invención.

En un modo de realización preferente adicional de la presente invención, se aplica una fuerza magnética para acercar las partículas en estrecha proximidad con la superficie plana o entre sí para facilitar la agrupación de las partículas.

El término "que se puede unir a la superficie plana o segunda partícula" quiere decir que la segunda molécula de unión no se une necesariamente de manera constante a la superficie plana o segunda partícula o se ancla de una manera predeterminada, lo que quiere decir que ya está anclada en la superficie al comienzo del ensayo. Se ha de entender que el anclaje de la segunda molécula de unión a la superficie, tanto directamente como por medio de una molécula de enlazador como se define anteriormente en el presente documento, puede tener lugar en cualquier punto temporal durante el ensayo. Se apreciará por un experto en la técnica que un punto temporal selectivo de anclaje hace accesible un amplio intervalo de posibilidades para efectuar un ensayo. De esta manera, mediante la presente invención se concibe un complejo enlazador-segunda molécula de unión que puede actuar como un módulo separado independiente de su unión a la superficie. Por ejemplo, se representa tal complejo en la fig. 11. Se apreciará inmediatamente por un experto en la técnica que un complejo enlazador-segunda molécula de unión que no esté fijado o anclado de manera constante en la superficie plana puede tener varias ventajas. Una ventaja concebida es que el complejo enlazador-segunda molécula de unión no anclado se puede difundir libre y rápidamente, potenciando, de esta manera, la unión al complejo de captura por medio de la unión a la molécula diana. El término "complejo de captura" describe un estado en el que la primera molécula de unión o de captura que está anclada directa o

indirectamente a la primera partícula que ha capturado la molécula diana. En este ejemplo, la unión del módulo enlazador/segunda molécula de unión a la molécula diana que fue capturada por la primera molécula de unión puede tener lugar de manera independientemente del tiempo, por ejemplo, tener lugar antes de su anclaje a la superficie.

5 En modos de realización particularmente preferentes, el anclaje de dicha segunda molécula de unión a la superficie plana o la segunda partícula tiene lugar antes o después de la unión de la segunda molécula de unión a la molécula diana. En modos de realización específicos de la presente invención, se permite que la segunda molécula de unión se ancle en la superficie, preferentemente por medio de una molécula de enlazador como se define en el presente documento, en una primera etapa del ensayo o antes del comienzo del ensayo, que es el punto temporal cuando se
10 añade la muestra como se define anteriormente en el presente documento. En tal caso, el complejo de captura que se forma primero y se une en una etapa posterior a una estructura de superficie preformada que comprende la segunda molécula de unión anclada en la superficie.

15 En modos de realización preferentes adicionales de la presente invención, el módulo enlazador-segunda molécula de unión se une primero al complejo de captura en virtud de su unión específica a la molécula diana y todo el complejo de captura enlazador-segunda molécula de unión se guía posteriormente a la superficie plana o superficie de la segunda partícula para enlazar el complejo de captura a la superficie. La idea concebida se ilustra en la fig. 11. En este ejemplo, la distancia ventajosa se genera mediante un enlazador largo anclado en el segundo anticuerpo, mientras que la primera molécula de unión se ancla directamente en la superficie de la primera partícula. En otras palabras, la segunda
20 molécula de unión que ha anclado un enlazador largo rígido genera el efecto que conduce a una cinética de unión potenciada. Este ejemplo específico demuestra que se puede maximizar la velocidad de reconocimiento del complejo de captura por la segunda molécula de unión debido al anclaje de tipo módulo como se describe anteriormente en el presente documento. De forma importante, un aspecto principal sobre la técnica es que la presencia de un enlazador largo y rígido como se describe anteriormente en el presente documento conduce a la distancia requerida para
25 potenciar la cinética de unión. De esta manera, el ejemplo demuestra que el principio de un enlazador largo y rígido para obtener una cinética de unión potenciada no está limitado en modo alguno al enlazador para el anclaje de la primera molécula de unión a la primera partícula.

30 Sin embargo, también es posible que ambas moléculas de unión se acoplen a un enlazador largo a fin de incrementar o acrecentar adicionalmente la distancia ventajosa entre la primera partícula y la superficie plana o la superficie de la segunda molécula de unión.

35 En otro modo de realización preferente de la presente invención, la detección de partículas unidas, por ejemplo, partículas magnéticas, tiene lugar por medio de reflexión interna total frustrada (RITF) o por medio de la medida de la luz dispersada desde dichas partículas unidas cerca de la superficie o por medio de la detección óptica de formación de agrupaciones.

40 Son particularmente preferentes los dispositivos de detección basados en una detección óptica de partículas, especialmente partículas magnéticas. Los detalles correspondientes pueden proceder del dispositivo ejemplar de la fig. 1, que comprende una fuente de luz y un sistema de detección de luz, y constituye un modo de realización específico de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos ópticos usados para la detección, miden típicamente un cambio en la señal luminosa que quiere decir una diferencia en la luz reflejada desde las partículas magnéticas y que se puede detectar por medios ópticos. Por ejemplo, tales procedimientos pueden incluir técnicas, tales como la detección de luz dispersada o la detección basada en la reflexión interna total (RIT) o reflexión interna
45 total frustrada (FTIR). Preferentemente, el cambio en la señal luminosa se refiere a las únicas partículas magnéticas que están unidas en virtud de la unión de la segunda molécula de unión a la superficie del sensor. Los detalles serán conocidos por el experto en la técnica, o pueden proceder de referencias adecuadas, tales como Bruls *et al.*, Lab Chip, 2009, 9. 2504-3510.

50 Como se usa en el presente documento, el término "reflexión interna total" describe una condición presente en determinados materiales cuando la luz penetra en un material a partir de otro material con un índice de refracción más alto a un ángulo de incidencia mayor de un ángulo específico. El ángulo específico al que esto tiene lugar depende de los índices de refracción de ambos materiales, también denominado ángulo crítico, y se puede calcular matemáticamente (ley de Snell, ley de refracción). En ausencia de partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, no
55 tiene lugar la refracción y el haz de luz de la fuente de luz se refleja totalmente. Si una partícula, por ejemplo, partícula magnética, está próxima a la superficie o está en contacto con la superficie, se dice que los rayos de luz se frustran por la partícula y la reflexión en ese punto ya es total.

60 Se puede calcular la señal, que se puede definir como la disminución de la señal reflejada de manera totalmente interna. La señal es más o menos linealmente dependiente de la concentración de partículas sobre la superficie (densidad superficial n). La señal se puede expresar como:

$$S = \beta \tilde{n}$$

en la que S es el cambio en la señal medida en % y β es un factor de conversión de densidad superficial a cambio en la señal.

- 5 En un modo de realización preferente de la presente invención, la detección de partículas unidas, por ejemplo, partículas magnéticas, tiene lugar por medio de reflexión interna total frustrada (RITF) o por medio de la medida de la luz dispersada desde dichas partículas unidas cerca de la superficie.

10 También se conciben procedimientos basados en la medida de agrupaciones de partículas, como se describe en Bruls *et al.*, 2009, Lab Chip, 9, 3504-3510. En otro modo de realización preferente de la presente invención, la detección se puede llevar a cabo por medio de la detección de agrupaciones que comprenden al menos dos partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, y al menos una molécula diana. Por ejemplo, una partícula, por ejemplo una partícula magnética, como se define anteriormente en el presente documento se puede agrupar adicionalmente con al menos una partícula adicional, por ejemplo, partícula magnética, tras la presencia de menos una molécula diana que se va a detectar, que puede entrecruzar o combinar ambas partículas. En modos de realización específicos, la agrupación de partículas comprende una primera y segunda partícula como se describe en el presente documento. En un modo de realización particularmente preferente, la detección se puede llevar a cabo en un sistema optomagnético, en el que dichas partículas se accionan magnéticamente y se detectan ópticamente en una muestra de fluido estacionario, que comprende las etapas de (i) captura de molécula diana, por ejemplo, como se define anteriormente en el presente documento, (ii) accionamiento magnético, y (iii) detección.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una partícula como se define en el presente documento, por ejemplo, un partícula magnética, para detectar una molécula diana en una muestra, por ejemplo, una muestra como se define anteriormente en el presente documento.

30 En un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, la molécula diana como se menciona en el contexto del dispositivo, procedimiento o uso como se describe anteriormente en el presente documento es troponina cardíaca I (cTnI), NT-proBNP u hormona paratiroidea. La presente invención también se dirige a la detección de moléculas diana adicionales o clases o moléculas diana. La troponina cardíaca I (cTnI) es particularmente preferente.

Ejemplos

35 *Ejemplo 1 - Usando ADNds largo como un enlazador*

La longitud (extensión) del enlazador se analizó en un conjunto de experimentos. Para este fin, se usó como enlazador ADNds largo, que es una molécula muy rígida y, por lo tanto, también da como resultado una extensión lejana de la superficie. En particular, se incubaron partículas recubiertas con estreptavidina de 500 nm con ADNds de longitud variable. Cada molécula de ADN contenía un resto de biotina en un extremo de la molécula de ADN, una molécula de Texas Red en el otro extremo de la molécula. La solución que contenía partículas y ADN se inyectaron en un cartucho y se unieron a la superficie de sensor, recubierta con anticuerpos anti-Texas Red usando atracción magnética. Después de una etapa de lavado magnético que eliminó las partículas no unidas de la superficie, se determinó la cantidad de partículas que se unieron a la superficie.

45 Se descubrió que la cinética de unión de una partícula a la superficie se potenciaba significativamente. Por ejemplo, para las nanopartículas magnéticas con un diámetro promedio de ~500 nm, se observó una longitud óptima de ADNds de ~700 pares de bases (pb), correspondiente a una longitud de contorno de ~240 nm y una extensión promedio de ~140 nm (véase la fig. 6).

50 Se llevó a cabo un experimento similar con partículas recubiertas con estreptavidina de 1000 nm. Como se puede ver en la fig. 7, la longitud de enlazador óptima de 1000 pb (correspondiente a una longitud de contorno de ~340 nm) también es prácticamente el doble de larga. A partir de estas medidas, la longitud de contorno de ADN óptima parece ser prácticamente 2/3 del radio de partícula.

55 *Ejemplos 2 - Efecto de la densidad superficial del enlazador sobre la cinética de unión*

60 El efecto de la densidad superficial de enlazador sobre la cinética de unión se sometió a prueba en un formato de ensayo usando una partícula de 500 nm, recubierta con estreptavidina que se une a una "molécula diana" individual, una hebra de ADNds con una biotina en un extremo y una molécula de Texas Red anclada en el otro extremo (véase la fig. 9, panel izquierdo, diamante), que está disponible para unirse a una superficie de sensor recubierta con anticuerpos anti-Texas Red. Posteriormente, diferentes cantidades de ADNds no funcional de la misma longitud (pero sin la molécula de Texas Red) se unieron asimismo a la partícula y se comparó la capacidad de las partículas para unirse a la superficie de sensor.

En un experimento adicional, se cargó una partícula con ADNds de 1999 pb. La fig. 9, panel medio, muestra la cantidad relativa de partículas que se unen tras la carga con ADN no funcional, en comparación con una partícula con únicamente una molécula de ADN "funcional".

- 5 En un experimento adicional, se cargó una partícula con ADNds de 497 pb. La fig. 9, panel inferior, muestra la cantidad relativa de partículas que se unen tras la carga con ADN no funcional, en comparación con una partícula con únicamente una molécula de ADN "funcional".

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para detectar una molécula diana en una muestra que comprende
- 5 (a) un recipiente de muestra para la medida de la molécula diana en una muestra,
 (b) una primera partícula, en el que dicha primera partícula está funcionalizada con una primera molécula de unión que se puede unir específicamente a dicha molécula diana, y
 (c) una estructura de superficie que comprende una segunda molécula de unión que se puede unir a la molécula diana, en el que dicha estructura de superficie cubre un sensor plano o está presente en una segunda partícula, en el que
 10 dicha primera partícula puede unir directa o indirectamente dicha segunda molécula de unión de la estructura de superficie; en el que dicha primera y/o segunda molécula de unión se ancla en la superficie de partícula de dicha primera y/o segunda partícula y/o la superficie de sensor plano por medio de una molécula de enlazador largo y rígido; en el que la longitud y la consistencia de dicha molécula de enlazador se selecciona de manera que de lugar a una longitud de extensión promedio de dicho enlazador de más de 60 nm; y en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha primera y/o segunda partícula es una partícula magnética.
- 20 3. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que el diámetro de dicha primera y/o segunda partícula es al menos de aproximadamente 100 nm y en el que dicha longitud de extensión promedio es al menos un 10 % del diámetro.
4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una molécula de enlazador rígido tiene una longitud de extensión promedio de al menos un 20 % de la longitud de contorno de dicha molécula de enlazador.
- 25 5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha primera molécula de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo, un aptámero, un ligando o un ácido nucleico complementario.
6. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha molécula de enlazador es o comprende una molécula de ácido nucleico o un polímero no biológico, siendo o comprendiendo preferentemente la molécula de enlazador una molécula seleccionada del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico bicatenario, tales como ADNds, una molécula de APN, un híbrido APN-ADN y un híbrido ARN-ADN.
- 30 7. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha primera partícula comprende adicionalmente una estructura de superficie repulsiva que se ancla directamente en la superficie de dicha partícula, en el que dicha estructura de superficie repulsiva cubre la superficie de la partícula para dar como resultado una carga neta específica y/o una repulsión estérica de la partícula, y en el que dicha estructura de superficie repulsiva transmite un efecto de empuje sobre dichas partículas hacia dicha superficie de sensor, en el que preferentemente la molécula de enlazador es más larga que dicha estructura de superficie repulsiva.
- 35 8. El dispositivo de la reivindicación 7, en el que dicha estructura de superficie repulsiva es una estructura cargada, que comprende preferentemente una molécula seleccionada del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico, tal como ADNds, APN, un híbrido APN-ADN, un híbrido ARN-ADN, un hidrogel y un polímero; o un recubrimiento estérico.
- 40 9. El dispositivo de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha molécula de enlazador y/o dicha estructura de superficie repulsiva no se puede escindir mediante DNasa y/o una enzima de restricción que pueda fragmentar una molécula de ácido nucleico bicatenario.
- 45 10. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha molécula de enlazador comprende adicionalmente al menos un espaciador flexible corto, preferentemente un espaciador flexible corto que comprende ácido nucleico monocatenario.
- 50 11. Procedimiento de detección de la presencia o cantidad de una molécula diana en una muestra que comprende las etapas de
- 55 (a) poner en contacto la muestra y una primera molécula de unión anclada en una primera partícula en un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 a 10; y
 (b) poner en contacto la muestra con
- 60 i) una segunda molécula de unión que se pueda unir a la molécula diana y anclar en una superficie plana o en una segunda partícula, en el que la primera molécula de unión y/o la segunda molécula de unión se pueden unir específicamente a dicha molécula diana, y opcionalmente
 ii) una molécula análoga diana anclada en la superficie plana o en la segunda partícula; en el que la molécula diana puede interferir con la unión de la primera molécula de unión a la molécula análoga diana; y

(c) detectar el número de primeras partículas unidas a la superficie plana o a la segunda partícula, en el que el número de agrupaciones de partículas o de partículas unidas está relacionado directa o inversamente con la cantidad de moléculas diana presentes en la muestra.

5 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que se aplica una fuerza magnética para acercar las partículas en estrecha proximidad con dicho soporte sólido o entre sí para facilitar la agrupación de las partículas.

10 13. El procedimiento de la reivindicación 11 o 12, en el que el anclaje de dicha segunda molécula de unión a la superficie plana o la segunda partícula tiene lugar antes o después de la unión de la segunda molécula de unión a la molécula diana.

14. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en los que dicha molécula diana es troponina cardíaca I (cTnI), NT-proBNP u hormona paratiroidea.

FIGURA 1

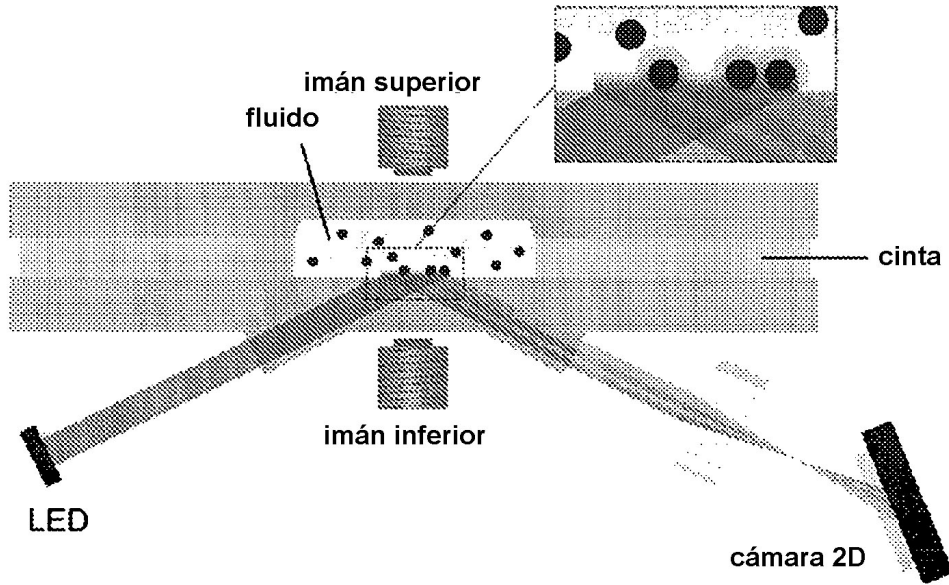


FIGURA 2

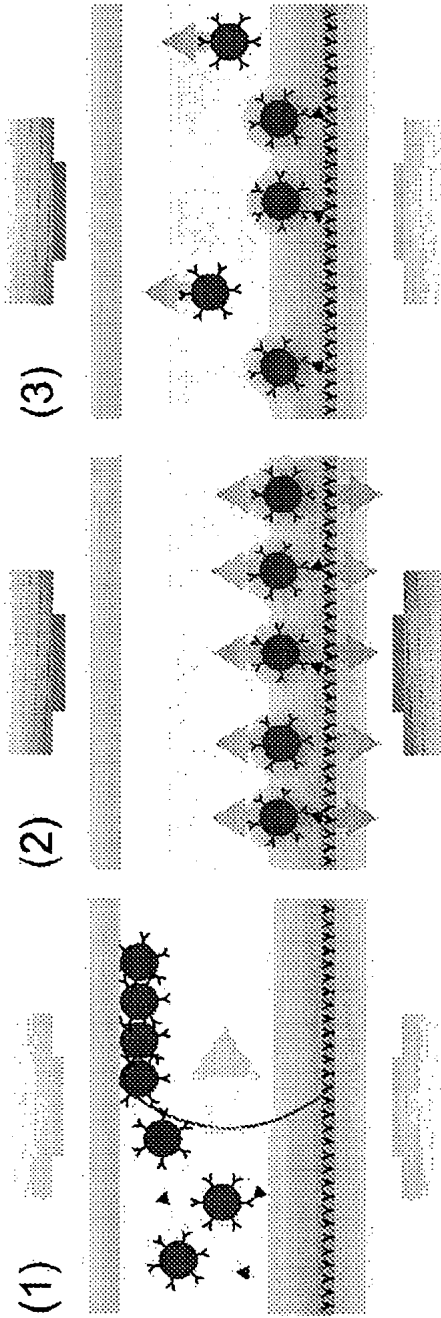


FIGURA 3



FIGURA 4

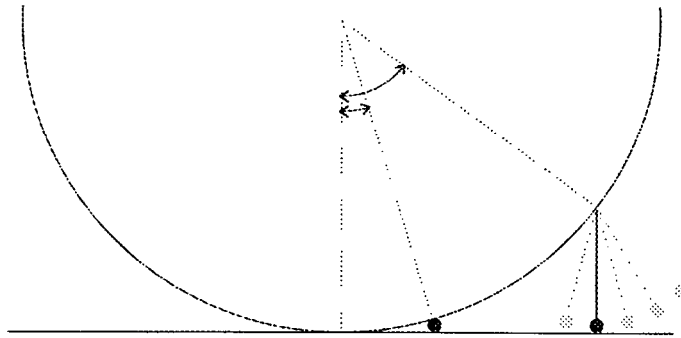


FIGURA 5

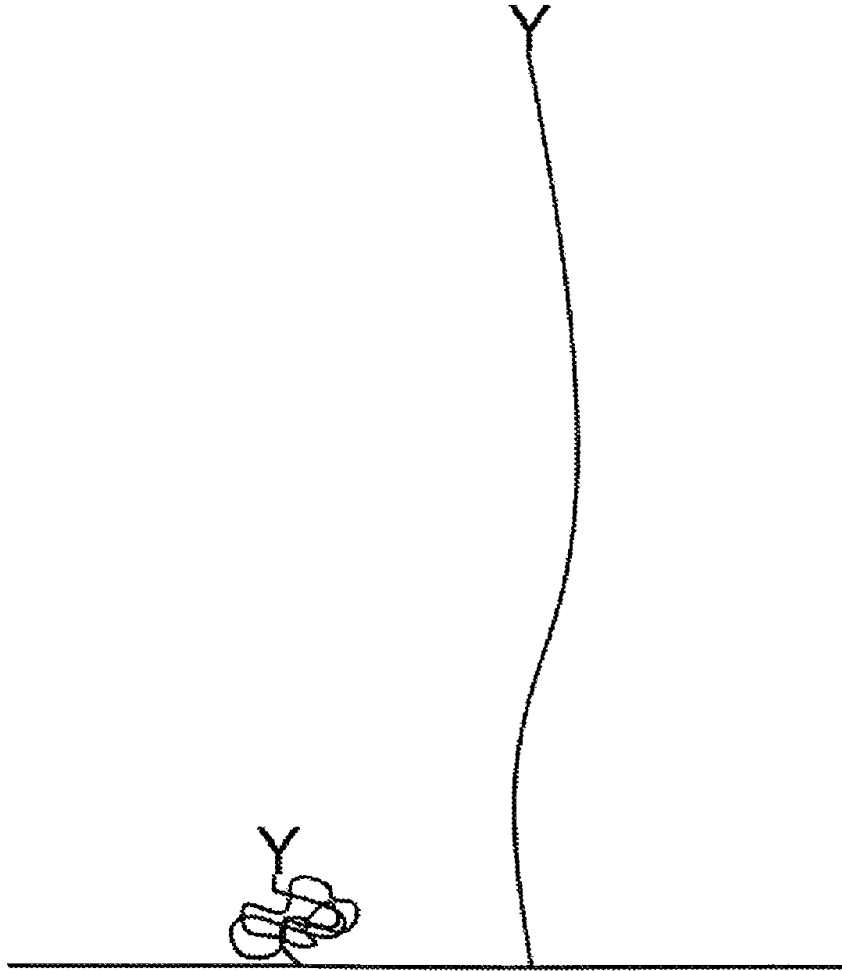


FIGURA 6

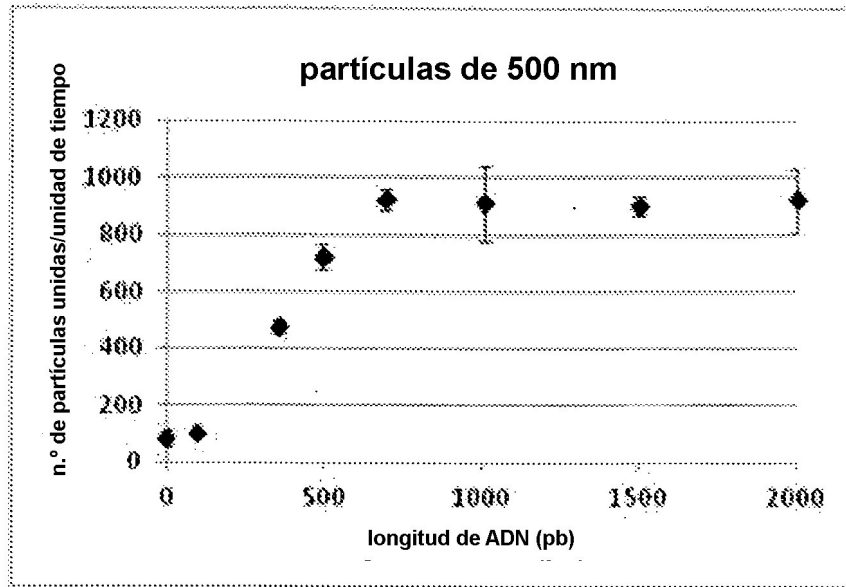


FIGURA 7

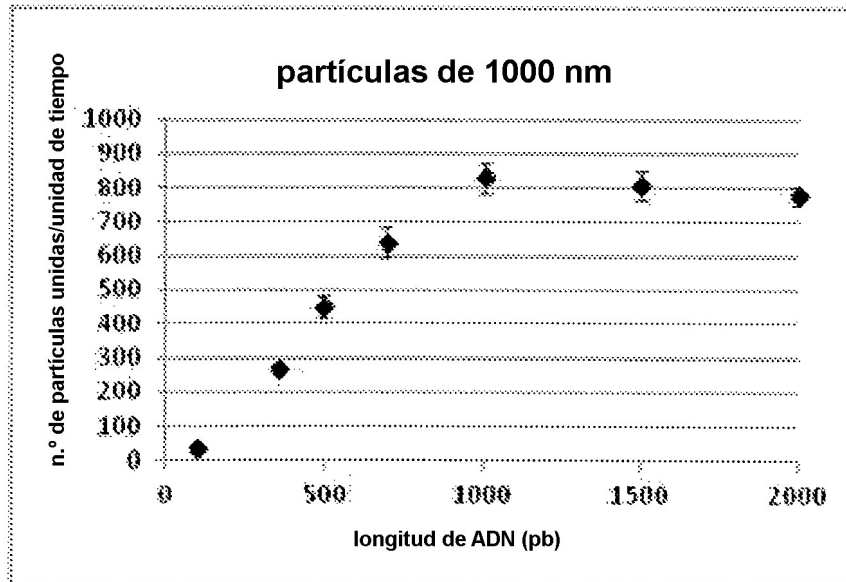


FIGURA 8

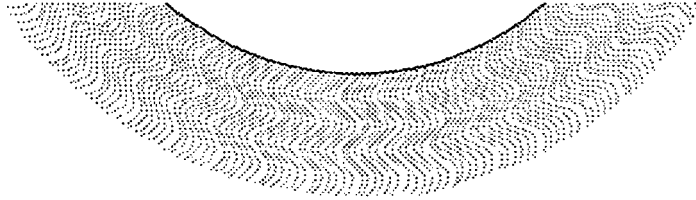


FIGURA 9

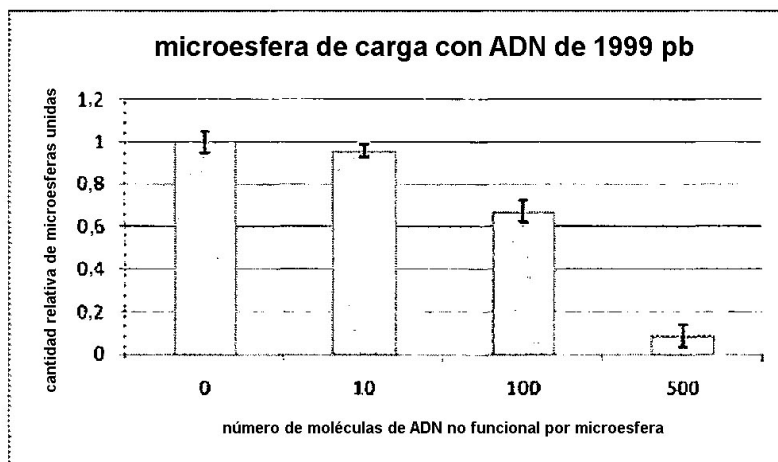
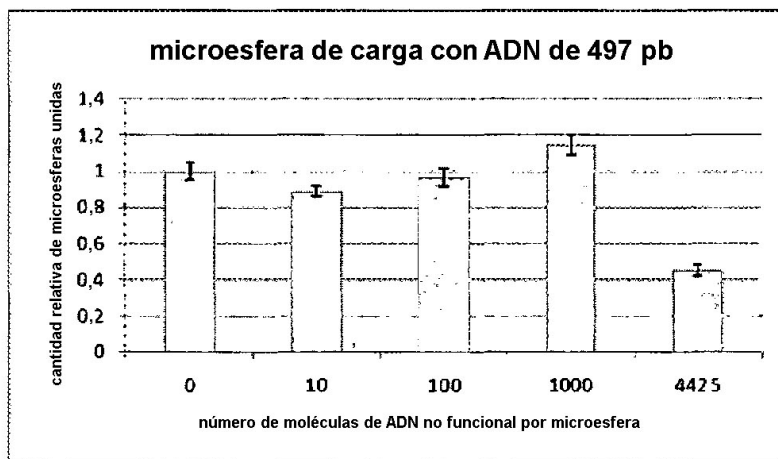
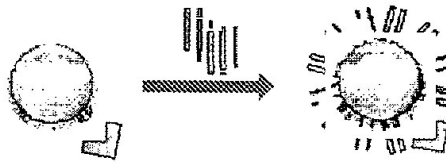


FIGURA 10

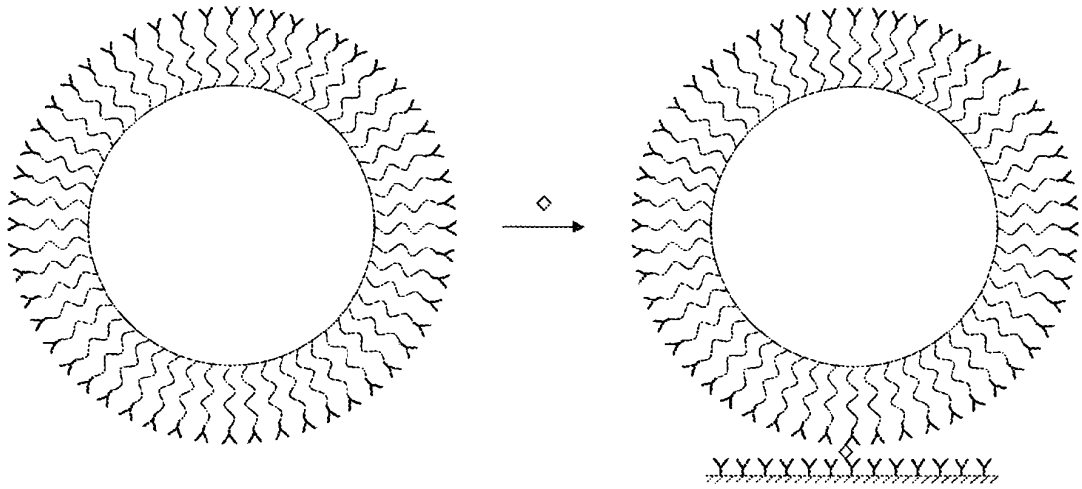


FIGURA 11

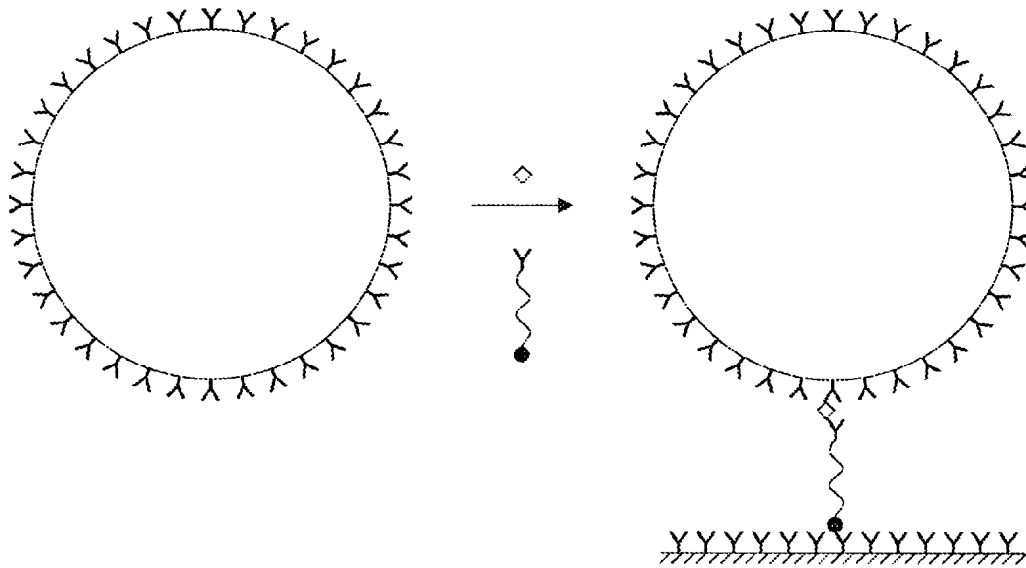


FIGURA 12

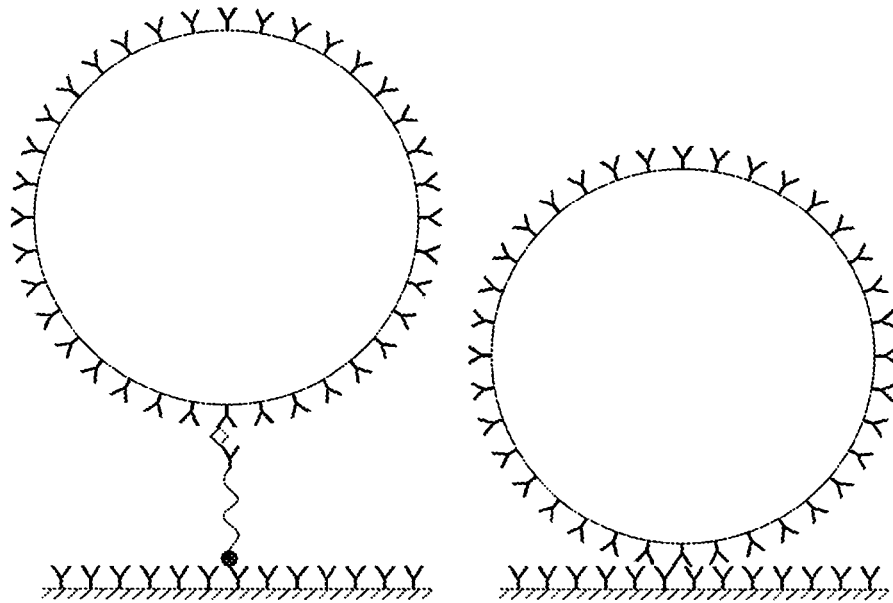


FIGURA 13

