

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 902**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2014 PCT/US2014/036861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14182634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2014 E 14733761 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2994751**

54 Título: **Un método de detección de objetivos biológicos usando un nanoporo y un agente de unión a proteínas de fusión**

30 Prioridad:

06.05.2013 US 201361820083 P

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

20.03.2019

73 Titular/es:

**TWO PORE GUYS, INC. (100.0%)
2161 Delaware Ave. B
Santa Cruz, CA 95060, US**

72 Inventor/es:

**MORIN, TREVOR J.;
HELLER, DANIEL y
DUNBAR, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 704 902 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

Un método de detección de objetivos biológicos usando un nanoporo y un agente de unión a proteínas de fusión

5 **Antecedentes**

La detección de partículas de nanoescala, tales como células tumorales circulantes, bacterias y virus, tiene una utilidad clínica inmersiva. Los métodos disponibles actualmente incluyen la inmunohistoquímica y la detección basada en ácidos nucleicos, y se requiere típicamente la proliferación celular antes de que una detección sensible pueda llevarse a cabo.

La detección y cuantificación molecular también son importantes, y pueden llevarse a cabo con varios métodos dependiendo del tipo de molécula. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden detectarse en virtud de su complementariedad de secuencia a una sonda o cebador, a través de la hibridación y/o amplificación, o en menos ocasiones con una proteína que reconoce la secuencia. Una proteína, por otro lado, se detecta comúnmente con un anticuerpo que reconoce específicamente y se une a la proteína. Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), a este respecto, es altamente comercializado y se usa comúnmente.

También existen métodos para detectar y cuantificar varias otras moléculas grandes o pequeñas, tales como carbohidratos, compuestos químicos, iones y elementos.

Los métodos y sistemas para la detección altamente sensible a moléculas así como partículas, tales como las células tumorales y los organismos patógenos, tienen aplicaciones amplias, en particular clínicamente, para la detección de patógenos y el diagnóstico de enfermedades, por ejemplo.

25 **Sumario**

La presente invención proporciona un método para detectar una molécula o partícula diana sospechosa de estar presente en una muestra, que comprende:

(a) poner en contacto la muestra con (i) una molécula de fusión que comprende un ligando capaz de unirse a la molécula o partícula diana y un dominio de unión, y (ii) un armazón polimérico que comprende al menos un motivo de unión al cual es capaz de unirse el dominio de unión, bajo condiciones que permiten que la molécula o partícula diana se enlacen al ligando y el dominio de unión se enlace al motivo de unión, en donde el polímero es al menos uno de un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido peptidonucleico (ANP), un híbrido de ADN/ARN, y un polipéptido;

(b) cargar el polímero en un dispositivo que comprende un poro que separa un espacio interior del dispositivo en dos volúmenes, y configurar el dispositivo para pasar el polímero a través del poro de un volumen al otro volumen, en donde el dispositivo comprende electrodos para aplicar un diferencial de voltaje entre los dos volúmenes, en donde el dispositivo comprende además un sensor adyacente al poro configurado para identificar objetos que pasan a través del poro, y en el que el poro tiene (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro; y

(c) determinar, con el sensor, si la molécula de fusión unida al motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana, detectando de este modo la presencia de la molécula o partícula diana en la muestra.

En algunos aspectos, la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un compuesto químico, un ion y un elemento.

En algunos aspectos, la partícula diana se selecciona del grupo que consiste en complejos de proteínas y en agregados de proteínas, complejos de proteínas/ácidos nucleicos, virus, bacterias, células y agregados celulares fragmentados o totalmente ensamblados.

En algunos aspectos, la etapa (a) del método para evaluar si una molécula o partícula diana está presente en una muestra se realiza antes de la etapa (b). En algunos aspectos, la etapa (b) se realiza antes de la etapa (a).

En algunos aspectos, el método comprende además la aplicación de una condición sospechosa de alterar la unión entre la molécula o partícula diana y el ligando y realizar de nuevo la determinación. En algunos aspectos, la condición se selecciona del grupo que consiste en eliminar la molécula o partícula diana de la muestra, añadir un agente que compita con la molécula o partícula diana o el ligando para la unión, y cambiar el pH, la sal o la temperatura.

En algunos aspectos, el motivo de unión comprende una modificación química para la unión al dominio de unión. En algunos aspectos, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en acetilación, metilación, sumolación, glicosilación, fosforilación y oxidación.

El polímero comprende un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido peptidonucleico (ANP), un híbrido de ADN/ARN o un polipéptido.

En algunos aspectos, el dominio de unión se selecciona del grupo que consiste en una hélice-giro-hélice, un dedo de zinc, una cremallera de leucina, una hélice alada, una hélice-giro-hélice alada, una hélice-bucle-hélice y una caja HMG.

5 En algunos aspectos, el dominio de unión se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos bloqueados (LNA), PNA, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN por sus siglas en inglés), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR por sus siglas en inglés), y aptámeros.

10 En algunos aspectos, el ligando es una proteína. En algunos aspectos, el ligando se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un epítipo, una hormona, un neurotransmisor, una citocina, un factor de crecimiento, una molécula de reconocimiento celular y un receptor.

15 En algunos aspectos, el dominio de unión y el ligando se enlazan, a través de un enlace covalente, un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, un enlace metálico, fuerza de van der Waals, interacción hidrofóbica o interacción de apilamiento planar, o se traducen como un polipéptido continuo, para formar la molécula de fusión.

En algunos aspectos, el método comprende además poner en contacto la muestra con un marcador detectable capaz de unirse a la molécula o partícula diana o complejo diana/ligando.

20 En algunos aspectos, el polímero comprende al menos dos unidades del motivo de unión.

25 En algunos aspectos, el polímero comprende al menos dos diferentes motivos de unión: la muestra está en contacto con al menos dos moléculas de fusión comprendiendo cada una un dominio de unión diferente capaz de unirse a cada motivo de unión y un ligando diferente capaz de unirse a una molécula o partícula diana diferente; y el sensor se configura para identificar si la molécula de fusión unida a cada motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana.

En algunos aspectos, el dispositivo comprende electrodos para aplicar un diferencial de voltaje entre los dos volúmenes.

30 En algunos aspectos, el dispositivo comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior, en donde la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro.

35 En un aspecto, el primer poro y el segundo poro tienen aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro. Tales poros pueden ser adecuados para detectar moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. En un aspecto, el primer poro y el segundo poro son tan largos como aproximadamente 50.000 nm de diámetro, que pueden ser adecuados para detectar partículas más largas como células tumorales y bacterianas.

40 En algunos aspectos, los poros están separados aproximadamente entre 10 nm y aproximadamente 1000 nm.

En algunos aspectos, cada una de las cámaras comprende un electrodo para conectarse a una fuente de alimentación.

45 En algunos aspectos, el método comprende además mover el polímero en una dirección inversa después de que el motivo de unión pase a través del poro, para identificar, de nuevo, si la molécula de fusión unida a cada motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana.

50 También se proporcionan kits, paquetes o mezclas para detectar la presencia de una molécula o partícula diana. En algunos aspectos, el kit, paquete o mezcla comprende (a) una molécula de fusión que comprende un ligando capaz de unirse a la molécula o partícula diana y un dominio de unión, (b) un armazón polimérico que comprende al menos un motivo de unión al cual se puede unir el dominio de unión, en donde el polímero es al menos uno de un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido peptidónucleico (ANP), un híbrido de ADN/ARN, y un polipéptido; y (c) un dispositivo que comprende un poro que separa un espacio interior del dispositivo en dos volúmenes, en donde el dispositivo se configura para permitir que el polímero pase a través del poro desde un volumen hasta el otro volumen, y el poro tiene (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro, y en donde el dispositivo comprende además un sensor adyacente al poro configurado para identificar si el motivo de unión está (i) unido a la molécula de fusión mientras que el ligando se une a la molécula o partícula diana, (ii) se une a la molécula de fusión mientras que el ligando no se une a la molécula o partícula diana, o (iii) no se une a la molécula de fusión.

60 En algunos aspectos, el kit, paquete o mezcla comprende además una muestra sospechosa de contener la molécula o partícula diana. En algunos aspectos, la muestra comprende además un marcador detectable capaz de unirse a la molécula o partícula diana o el complejo ligando/molécula o partícula diana.

Breve descripción de los dibujos

65 Se proporcionan como realizaciones de esta divulgación dibujos que se ilustran solo a modo de ejemplificación, y no

como limitación, en los que:

la figura 1 ilustra la detección de una molécula o partícula diana con una realización del método actualmente divulgado;

la figura 2 proporciona la ilustración de un ejemplo más específico en el que se usa un ADN bicatenario como el almacén polimérico y una proteína de envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el ligando, para la detección de un anticuerpo anti-VIH;

la figura 3 muestra que se puede detectar una unión entre una molécula o partícula diana y una molécula de fusión puesto que tiene un perfil actual diferente en comparación con la molécula de fusión sola o el ADN solo, cuando pasa a través de un nanoporo;

la figura 4 ilustra la capacidad de multiplexación de la presente tecnología mediante la inclusión de diferentes motivos de unión en el almacén polimérico; y

las figuras 5(I)-(III) ilustran un dispositivo de nanoporo con al menos dos poros que separan múltiples cámaras.

Específicamente, la figura 5(I) es un esquema de un chip de poro doble y una configuración electrónica de amplificador doble para control del voltaje independiente (V_1 o V_2) y medición de corriente (I_1 o I_2) de cada poro. Tres cámaras, AC, se muestran y están separadas volumétricamente excepto por los poros comunes.

La figura 5(II) es un esquema donde eléctricamente, V_1 y V_2 se aplican principalmente a través de la resistencia de cada nanoporo, mediante la construcción de un dispositivo que minimiza todas las resistencias de acceso para desacoplar eficazmente I_1 y I_2 .

En la figura 5(III), los voltajes de competencia se usan para el control, con flechas que muestran la dirección de cada fuerza de voltaje.

Algunas o todas las figuras son representaciones esquemáticas para ejemplificación; por lo tanto, no representan necesariamente los tamaños relativos reales o las ubicaciones de los elementos mostrados. Las figuras se representan con el propósito de ilustrar una o más realizaciones con el entendimiento explícito de que no se utilizarán para limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones que se detallan a continuación.

Descripción detallada

A lo largo de esta solicitud, el texto se refiere a varias realizaciones de las presentes composiciones, y métodos. Las diversas realizaciones descritas pretenden proporcionar una variedad de ejemplos ilustrativos y no deben interpretarse como descripciones de especies alternativas. En su lugar, debe señalarse que las descripciones de varias realizaciones proporcionadas en el presente documento pueden ser de alcance superpuesto. Las realizaciones descritas en el presente documento son meramente ilustrativas y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "un electrodo" incluye una pluralidad de electrodos, incluyendo mezclas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que los dispositivos y métodos incluyen los componentes o etapas mencionados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir dispositivos y métodos, significará excluir otros componentes o etapas de cualquier significado esencial para la combinación. "Que consiste en" significará que excluye otros componentes o etapas. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, distancia, tamaño, temperatura, tiempo, voltaje y concentración, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que los componentes descritos en el presente documento son meramente ejemplares y que equivalentes de los mismos son conocidos en la técnica.

DetECCIÓN MOLECULAR

La presente divulgación proporciona métodos y sistemas para la detección y cuantificación molecular. Además, los métodos y sistemas pueden también configurarse para medir la afinidad de una molécula que se une con otra molécula. Además, dicha detección, cuantificación y medición puede llevarse a cabo de forma multiplexada, aumentando enormemente su eficiencia.

La figura 1 proporciona una ilustración de una realización de los métodos y sistemas divulgados. Más específicamente, el sistema incluye un ligando 104 que es capaz de unirse a una molécula diana 105 para ser detectado o cuantificado. El ligando 104 puede ser parte de, o estar enlazado a, un resto de unión (denominado "dominio de unión") 103 que es capaz de unirse a un motivo de unión 101 específico en un armazón polimérico 109. Conjuntamente, el ligando 104 y el dominio de unión 103 forman una molécula de fusión 102.

Por lo tanto, si todos están presentes en una solución, la molécula de fusión 102 se une, en un extremo, a un armazón polimérico 109 (o simplemente "polímero") a través del reconocimiento y unión específicos entre el motivo de unión 101 y el dominio de unión 103, y en el otro extremo, a la molécula diana 105 en virtud de la interacción entre el ligando 104 y la molécula diana 105. Tales uniones causan la formación de un complejo que incluye el polímero 109, la molécula de fusión 102 y la molécula diana 105.

El complejo formado puede ser detectado por un dispositivo 108 que incluye un poro 107 que separa un espacio interior del dispositivo en dos volúmenes, y un sensor adyacente al poro 107 configurado para identificar objetos que pasan a través del poro 107. Este dispositivo se denomina a lo largo de este documento como un "nanoporo". En algunas realizaciones, el nanoporo 108 también incluye medios, tales como electrodos conectados a fuentes de energía, para mover el polímero 109 desde un volumen a otro, a través del poro 107. Como el polímero 109 puede cargarse o modificarse para contener cargas, un ejemplo de dichos medios genera un potencial o diferencial de voltaje a través del poro 107 para facilitar y controlar el movimiento del polímero 109.

Cuando una muestra incluye el complejo formado se carga en el nanoporo 108, el nanoporo 108 se puede configurar para pasar el polímero 109 a través del poro 107. Cuando el motivo de unión 101 está dentro del poro o adyacente al poro 107, el estado de unión del motivo 101 puede ser detectado por el sensor.

El "estado de unión" de un motivo de unión, como se utiliza en el presente documento, se refiere a si el motivo de unión está unido a una molécula de fusión con un dominio de unión correspondiente, y si la molécula de fusión también está unida a una molécula diana. Esencialmente, el estado de unión puede ser uno de los tres estados potenciales: (i) el motivo de unión está libre y no está unido a una molécula de fusión (véase 305 en la figura 3); (ii) el motivo de unión se une a una molécula de fusión que no se une a una molécula diana (véase 306 en la figura 3); o (iii) el motivo de unión se une a una molécula de fusión que se une a una molécula diana (véase 307 en la figura 3).

La detección del estado de unión de un motivo de unión puede realizarse por varios métodos. En un aspecto, en virtud de los diferentes tamaños del motivo de unión en cada estado, cuando el motivo de unión pasa a través del poro, los diferentes tamaños dan como resultado diferentes corrientes eléctricas a través del poro. En un aspecto como se muestra en la figura 3, las señales de corriente medidas 301, cuando 305, 306 y 307 pasan a través del poro, son señales 302, 303 y 304, respectivamente. A este respecto, no se requiere ningún sensor separado para la detección, ya que los electrodos, que están conectados a las fuentes de energía y pueden detectar la corriente, pueden servir para la función de detección. Uno o ambos de los electrodos, por lo tanto, sirven como un "sensor."

En algunos aspectos, un agente 106 como se muestra en la figura 1 se añade al complejo para ayudar a la detección. Este agente es capaz de unirse a la molécula diana o al complejo ligando/molécula diana. En un aspecto, el agente incluye una carga, ya sea negativa o positiva, para facilitar la detección. En otro aspecto, el agente añade tamaño para facilitar la detección. En otro aspecto, el agente incluye un marcador detectable, tal como un fluoróforo.

En este contexto, una identificación del estado (iii) indica que se ha formado un complejo polímero-molécula de fusión-molécula diana. En otras palabras, se detecta la molécula diana.

Detección de partículas

La presente divulgación también proporciona, en algunos aspectos, métodos y sistemas para detectar, cuantificar y medir partículas tales como células y microorganismos, incluyendo virus, bacterias y agregados celulares.

En algunos aspectos, el poro que separa el dispositivo en dos volúmenes tiene un tamaño que permite a las partículas, tales como los virus, las bacterias, las células o los agregados celulares, pasar a través del mismo. Un ligando que es capaz de unirse a una partícula diana para ser detectado o cuantificado puede incluirse en la solución en el dispositivo de modo que el ligando puede unirse a la única partícula diana y el armazón polimérico a través de un dominio de unión y un motivo de unión para formar un complejo. Muchas de estas partículas tienen marcadores únicos en sus superficies que pueden ser reconocidos específicamente por un ligando. Por ejemplo, las células tumorales pueden tener antígenos tumorales expresados en la superficie celular y las células bacterianas pueden tener endotoxinas fijadas a la membrana celular.

Cuando el complejo formado en una solución cargada en el dispositivo de nanoporo se mueve junto con el armazón polimérico para pasar a través del poro, el estado de unión del complejo dentro o adyacente al poro puede detectarse de modo que los microorganismos diana unidos a los ligandos pueden ser identificados usando métodos similares a los métodos de detección molecular descritos en otra parte de la divulgación.

Almacén polimérico

Un almacén polimérico adecuado para el uso en la presente tecnología es una molécula lineal o linealizada, que tiene una longitud que es varias magnitudes mayor que su anchura. Dicho almacén puede cargarse en un dispositivo de nanoporo y pasar a través del poro desde un extremo al otro.

Los ejemplos de polímeros incluyen ácidos nucleicos, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), o ácido peptidonucleico (APN) y proteínas o péptidos linealizados. En algunos aspectos, el ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario, o puede ser una molécula híbrida de ADN/ARN.

En un aspecto, el polímero es sintético o químicamente modificado. La modificación química puede ayudar a estabilizar el polímero, añadir cargas al polímero para aumentar la movilidad, mantener la linealidad o añadir o modificar la especificidad de unión. En algunos aspectos, la modificación química es la acetilación, metilación, sumolación, oxidación, fosforilación o glicosilación.

En algunos aspectos, el polímero está cargado eléctricamente. El ADN, ARN, APN y las proteínas se cargan típicamente en condiciones fisiológicas. Dichos polímeros pueden ser modificados adicionalmente para aumentar o disminuir la carga transportada. Otros polímeros pueden ser modificados para introducir cargas. Las cargas en el polímero pueden ser útiles para hacer que el polímero pase a través del poro de un dispositivo de nanoporo. Por ejemplo, un polímero cargado puede moverse a través del poro en virtud de una aplicación de un voltaje a través del poro.

En algunos aspectos, cuando se introducen cargas en el polímero, las cargas pueden añadirse en los extremos del polímero. En algunos aspectos, las cargas se extienden sobre el polímero.

En una realización, cada unidad del polímero cargado se carga al pH seleccionado. En otra realización, el polímero cargado incluye suficientes unidades cargadas para ser empujadas hacia y a través del poro por las fuerzas electrostáticas. Por ejemplo, un péptido que contiene suficientes entidades que pueden cargarse a un pH seleccionado (lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.) para usarse en los dispositivos y métodos descritos en el presente documento es un polímero cargado para los fines de esta invención. Asimismo, un copolímero que comprende ácido metacrílico y etileno es un polímero cargado para los fines de esta invención si hay suficientes grupos carboxilato cargados del resto de ácido metacrílico para usarse en los dispositivos y métodos descritos en el presente documento. En una realización, el polímero cargado incluye una o más unidades cargadas en o cerca de un término del polímero. En otra realización, el polímero cargado incluye una o más unidades cargadas en o cerca de ambos términos del polímero. Un ejemplo de copolímero es un ADN envuelto alrededor de una proteína (por ejemplo, ADN/nucleosoma). Otro ejemplo de un copolímero es una proteína linealizada conjugada con el ADN en el extremo N y C.

Motivos de unión y dominios de unión

Para ácidos nucleicos y polipéptidos tales como el almacén polimérico, un motivo de unión puede ser una secuencia de nucleótidos o péptidos que es reconocible por un dominio de unión, que es típicamente una porción funcional de una proteína, aunque un dominio de unión no tiene que ser un péptido. Para los ácidos nucleicos, por ejemplo, hay proteínas que reconocen específicamente y se unen a secuencias (motivos) tales como promotores, potenciadores, dímeros de timina-timina, y ciertas estructuras secundarias tales como un nucleótido doblado y secuencias con ruptura monocatenaria.

En algunos aspectos, el motivo de unión incluye una modificación química que causa o facilita el reconocimiento y unión mediante un dominio de unión. Por ejemplo, las secuencias de ADN metiladas pueden ser reconocidas por factores de transcripción, las ADN metiltransferasas o las enzimas reparadoras de la metilación.

Las moléculas, en particular, las proteínas, que son capaces de reconocer específicamente motivos de unión a nucleótidos son conocidas en la técnica. Por ejemplo, dominios de proteínas tales como hélice-giro-hélice, un dedo de zinc, una cremallera de leucina, una hélice alada, una hélice-giro-hélice alada, una hélice-bucle-hélice y una caja HMG, son conocidas por ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos.

En algunos aspectos, los dominios de unión pueden ser ácidos nucleicos bloqueados (LNA), PNA, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR), o aptámeros.

Molécula/Partículas diana y ligandos

En la presente tecnología, una molécula o partícula diana se detecta o cuantifica en virtud de su unión a un ligando en una molécula de fusión que se une a un almacén polimérico. Una molécula o partícula diana y un ligando de unión correspondiente pueden reconocerse y unirse entre sí. Para una partícula, puede haber moléculas o marcadores de superficie adecuados para que un ligando se una (por lo tanto, el marcador y el ligando forman un par de unión).

Ejemplos de pares de unión que permiten la unión entre una molécula diana o una molécula en una partícula incluyen, pero sin limitación, antígeno/anticuerpo (o fragmento de anticuerpo); hormona, neurotransmisor, citocina, factor de crecimiento o molécula de reconocimiento celular/receptor; y un ion o elemento/agente quelante o proteína de unión a iones, tal como una calmodulina. Los pares de unión pueden ser también ácidos nucleicos monocatenarios que tienen secuencias complementarias, enzimas y sustratos, miembros o complejos de proteínas que se unen entre sí, enzimas y cofactores, ácido nucleico/proteína.

Por lo tanto, cualquier molécula diana que necesite detección o cuantificación, tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, compuestos químicos, iones y elementos, pueden encontrar un ligando de unión correspondiente. Para la mayoría de proteínas y ácidos nucleicos, un anticuerpo o una secuencia complementaria puede prepararse fácilmente.

Asimismo, los ligandos de unión (tales como anticuerpos) se pueden encontrar o preparar fácilmente para partículas, tales como complejos de proteínas y agregados de proteínas, complejos de proteínas/ácidos nucleicos, virus, bacterias, células y agregados celulares fragmentados o totalmente ensamblados.

Molécula de fusión

Una "molécula de fusión" pretende significar una molécula o complejo que contiene dos regiones funcionales, un dominio de unión y un ligando. El dominio de unión es capaz de unirse a un motivo de unión en un armazón polimérico y el ligando es capaz de unirse a una molécula diana.

En algunos aspectos, la molécula de fusión se prepara enlazando dos regiones con un enlace o fuerza. Dicho enlace y fuerza pueden ser, por ejemplo, un enlace covalente, un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, un enlace metálico, fuerza de van der Waals, interacción hidrofóbica o interacción de apilamiento planar.

En algunos aspectos, la molécula de fusión, tal como una proteína de fusión, puede expresarse como una única molécula a partir de un nucleótido codificante recombinante. En algunos aspectos, la molécula de fusión es una molécula natural que tiene un dominio de unión y un ligando adecuado para el uso en la presente tecnología.

La figura 2 ilustra una realización más específica del sistema mostrado en la figura 1. En la figura 2, la molécula de fusión es una proteína quimérica que incluye una proteína o dominio de dedo de zinc 202 y una proteína de envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 203. La proteína de dedo de zinc 202 puede enlazarse a una secuencia de nucleótidos adecuada en el armazón polimérico, un ADN bicatenario 201; la proteína de envoltura del VIH 203 puede unirse a un anticuerpo anti-VIH 204 que puede estar presente en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre de un paciente) para su detección.

Cuando el ADN bicatenario 201 pasa a través de un poro 205 de un dispositivo de nanoporo 206, el dispositivo de nanoporo 206 puede detectar si una molécula de fusión está unida al ADN 201 y si la molécula de fusión unida se une a un anticuerpo anti-VIH 204.

Medición de la afinidad de unión

La presente tecnología se puede usar también para medir la afinidad de unión entre dos moléculas y para determinar otras dinámicas de unión. Por ejemplo, después de que el motivo de unión pase a través del poro de un dispositivo de nanoporo, el dispositivo puede ser reconfigurado para invertir la dirección de movimiento del armazón polimérico (como se describe a continuación) de modo que el motivo de unión pueda volver a pasar a través del poro.

Antes de que el motivo de unión vuelva a entrar en el poro, se pueden cambiar las condiciones en la muestra que se carga en el dispositivo de nanoporo. Por ejemplo, la condición puede ser una o más de eliminar la molécula diana de la muestra, añadir un agente que compita con la molécula diana o el ligando para la unión, y cambiar el pH, la sal o la temperatura.

En las condiciones cambiadas, el motivo de unión vuelve a pasar a través del poro. Por lo tanto, si la molécula diana todavía está unida a la molécula de fusión se puede detectar para determinar cómo impactan las condiciones cambiadas en la unión.

En algunos aspectos, una vez que el motivo de unión está en el poro, se retiene allí mientras se cambian las condiciones, y así se puede medir el impacto de las condiciones cambiadas *in situ*.

Como alternativa o además, el armazón polimérico puede incluir múltiples motivos de unión y cada uno de los motivos de unión puede unirse a una molécula de fusión que puede unirse a una molécula o partícula diana. Mientras que cada motivo de unión pasa a través del poro, las condiciones de la muestra pueden cambiar, permitiendo la detección de una unión cambiada entre el ligando y la molécula o partícula diana en una base continua.

Multiplexación

En algunos aspectos, en lugar de incluir múltiples motivos de unión del mismo tipo que se describió anteriormente, un
 5 armazón polimérico puede incluir múltiples tipos de motivos de unión, cada uno puede tener diferentes dominios de
 unión correspondientes. Mientras tanto, una muestra puede incluir múltiples tipos de moléculas de fusión, incluyendo
 cada una uno de dichos dominios de unión y un ligando para una molécula diana diferente o un microorganismo diana.

Con este ajuste, se puede usar un armazón polimérico para detectar múltiples tipos de moléculas diana o
 10 microorganismos diana. La figura 4 ilustra dicho método. En este caso, un ADN bicatenario 403 se usa como el
 armazón polimérico, el ADN bicatenario 403 incluyendo múltiples motivos de unión: dos copias de 404, dos copias de
 405, y una copia de 406.

Cuando el ADN pasa a través de un dispositivo de nanoporo 407 que tiene dos poros coaxiales, 401 y 402, se detecta
 15 el estado de unión de cada uno de los motivos de unión, en el que ambas copias del motivo de unión 404 se unen a
 una molécula diana correspondiente, ambas copias del motivo de unión 405 se unen a una molécula diana
 correspondiente; y la molécula de fusión unida al motivo de unión 406 no se une a una molécula diana correspondiente.

De esta manera, con un único polímero y un único dispositivo de nanoporo, la presente tecnología puede detectar
 20 diferentes moléculas diana o microorganismos diana. Además, al determinar cuántas copias de los motivos de unión
 se unen a las moléculas diana o microorganismos diana, y al ajustar las condiciones que impactan en las uniones, el
 sistema puede obtener una información dinámica de unión detallada.

Dispositivos de nanoporo

25 Un dispositivo de nanoporo, como se proporciona, incluye al menos un poro que separa un espacio interior del
 dispositivo en dos volúmenes y al menos un sensor adyacente al poro configurado para identificar objetos que pasan
 a través del poro.

El(los) poro(s) en el dispositivo de nanoporo es(son) de una escala nanométrica. En un aspecto, cada poro tiene un
 30 tamaño que permite que pase una molécula o microorganismo pequeño o grande. En un aspecto, cada poro tiene al
 menos aproximadamente 1 nm de diámetro hasta aproximadamente 100 nm de diámetro. Cada poro puede tener al
 menos aproximadamente 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm,
 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm o
 35 90 nm de diámetro.

En un aspecto, el poro no tiene más de aproximadamente 100 nm de diámetro. Como alternativa, el poro no tiene más
 de aproximadamente 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm,
 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm o 10 nm de diámetro.

40 En algunos aspectos, cada poro tiene al menos aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 10000 nm de
 diámetro, tal como al menos aproximadamente 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 2000 nm, 3000 nm o 5000 nm de diámetro.
 En este aspecto, el poro no tiene más de aproximadamente 10000 nm de diámetro. Como alternativa, el poro no tiene
 más de aproximadamente 9000 nm, 8000 nm, 7000 nm, 6000 nm, 5000 nm, 4000 nm, 3000 nm, 2000 nm o 1000 nm
 de diámetro.

45 En un aspecto, el poro tiene un diámetro que está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, o
 alternativamente entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 80 nm, o entre aproximadamente 3 nm y
 aproximadamente 70 nm, o entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 60 nm, o entre aproximadamente 5 nm
 y aproximadamente 50 nm, o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 40 nm, o entre aproximadamente
 50 15 nm y aproximadamente 30 nm.

En algunos aspectos, el(los) poro(s) en el dispositivo de nanoporo son de una escala superior para detectar
 microorganismos o células grandes. En un aspecto, cada poro tiene un tamaño que permite que pase una molécula o
 55 microorganismo grande. En un aspecto, cada poro es al menos aproximadamente 100 nm a aproximadamente
 10000 nm de diámetro. Cada poro puede tener al menos aproximadamente 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm,
 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1000 nm, 1100 nm, 1200 nm, 1300 nm, 1400 nm, 1500 nm, 1600 nm, 1700 nm, 1800 nm,
 1900 nm, 2000 nm, 2500 nm, 3000 nm, 3500 nm, 4000 nm, 4500 nm o 5000 nm de diámetro.

En un aspecto, el poro no tiene más de aproximadamente 10000 nm de diámetro. Como alternativa, el poro no tiene
 60 más de aproximadamente 9500 nm, 9000 nm, 8500 nm, 8000 nm, 7500 nm, 7000 nm, 6500 nm, 6000 nm, 5500 nm,
 5000 nm, 4500 nm, 4000 nm, 3500 nm, 3000 nm, 2500 nm, 2000 nm, 1500 nm o 1000 nm de diámetro.

En un aspecto, el poro tiene un diámetro que está entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 10000 nm, o
 65 alternativamente entre aproximadamente 200 nm y aproximadamente 9000 nm, o entre aproximadamente 300 nm y
 aproximadamente 8000 nm, o entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 7000 nm, o entre
 aproximadamente 500 nm y aproximadamente 6000 nm, o entre aproximadamente 1000 nm y aproximadamente

5000 nm, o entre aproximadamente 1500 nm y aproximadamente 3000 nm.

En algunos aspectos, el dispositivo de nanoporo incluye medios para mover un armazón polimérico a través del poro y/o medios para identificar objetos que pasan a través del poro. A continuación, se proporcionan detalles adicionales, cuando se describen en el contexto de un dispositivo de dos poros.

En comparación con un dispositivo de nanoporo de un solo poro, se puede configurar más fácilmente un dispositivo de dos poros para proporcionar buen control de la velocidad y dirección del movimiento del polímero a través de los poros.

En una realización, el dispositivo de nanoporo incluye una pluralidad de cámaras, cada cámara en comunicación con una cámara adyacente a través de al menos un poro. Entre estos poros, dos poros, a saber un primero y un segundo poros, se colocan para permitir que al menos una porción de un polímero se mueva fuera del primer poro y dentro del segundo poro. Además, el dispositivo incluye un sensor capaz de identificar el polímero durante el movimiento. En un aspecto, la identificación implica identificar componentes individuales del polímero. Preferentemente, cuando se emplea un único sensor, el único sensor no incluye dos electrodos colocados en ambos extremos de un poro para medir una corriente iónica a través del poro.

En un aspecto, el dispositivo incluye tres cámaras conectadas a través de dos poros. Los dispositivos con más de tres cámaras pueden diseñarse fácilmente para incluir una o más cámaras adicionales a cada lado de un dispositivo de tres cámaras o entre dos cualquiera de las tres cámaras. Asimismo, más de dos poros pueden incluirse en el dispositivo para conectar las cámaras.

En un aspecto, puede haber dos o más poros entre dos cámaras adyacentes, para permitir que múltiples polímeros se muevan desde una cámara hasta la siguiente simultáneamente. Dicho diseño puede mejorar el rendimiento del análisis del polímero en el dispositivo.

En algunos aspectos, el dispositivo incluye además medios para mover un polímero desde una cámara a otra. En un aspecto, el movimiento da como resultado la carga del polímero a través del primer poro y el segundo poro a la vez. En otro aspecto, los medios permiten además el movimiento del polímero, a través de ambos poros, en la misma dirección.

Por ejemplo, en un dispositivo de dos poros (un dispositivo de "dos poros") de tres cámaras, cada una de las cámaras puede contener un electrodo para conectarse a una fuente de alimentación para que se pueda aplicar un voltaje separado a través de cada uno de los poros entre las cámaras.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un dispositivo que comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior, en donde la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro.

En algunas realizaciones como se muestra en la figura 5(l), el dispositivo incluye una cámara superior 505 (Cámara A), una cámara intermedia 504 (Cámara B), y una cámara inferior 503 (Cámara C). Las cámaras se separan por dos capas o membranas de separación (501 y 502) teniendo cada una un poro separado (511 o 512). Además, cada cámara contiene un electrodo (521, 522 o 523) para conectarse a una fuente de alimentación. La anotación de la cámara superior, intermedia e inferior es en términos relativos y no indica que, por ejemplo, la cámara superior se coloque por encima de la cámara intermedia o inferior con respecto a la toma de tierra, o viceversa.

Cada uno de los poros 511 y 512 independientemente tiene un tamaño que permite que pase una molécula o microorganismo pequeño o grande. En un aspecto, cada poro tiene (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro. Cada poro puede tener al menos aproximadamente 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm o 100 nm de diámetro.

En un aspecto, el poro no tiene más de aproximadamente 100 nm de diámetro. Como alternativa, el poro no tiene más de aproximadamente 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm o 10 nm de diámetro.

En un aspecto, el poro tiene un diámetro que está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, o alternativamente entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 80 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 70 nm, o entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 60 nm, o entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm, o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 40 nm, o entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 30 nm.

En algunos aspectos, el poro tiene sustancialmente una forma redonda. "Sustancialmente redonda", tal como se usa

ES 2 704 902 T3

en el presente documento, se refiere a una forma que es al menos aproximadamente 80 o 90 % en forma de un cilindro. En algunas realizaciones, el poro es de forma cuadrada, rectangular, triangular, ovalada o hexagonal.

5 Cada uno de los poros 511 y 512 tiene independientemente una profundidad. En un aspecto, cada poro tiene una profundidad que es al menos aproximadamente 0,3 nm. Como alternativa, cada poro tiene una profundidad que es al menos aproximadamente 0,6 nm, 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 11 nm, 12 nm, 13 nm, 14 nm, 15 nm, 16 nm, 17 nm, 18 nm, 19 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm o 90 nm.

10 En un aspecto, cada poro tiene una profundidad que no es superior a aproximadamente 100 nm. Como alternativa, la profundidad no es superior a aproximadamente 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm o 10 nm.

15 En un aspecto, el poro tiene una profundidad que está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 100 nm, o alternativamente, entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 80 nm, o entre aproximadamente 3 nm y aproximadamente 70 nm, o entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 60 nm, o entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm, o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 40 nm, o entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 30 nm.

20 En un aspecto, los poros se separan con una distancia que es entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1000 nm. En un aspecto, la distancia es al menos aproximadamente 10 nm, o alternativamente, al menos aproximadamente 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm o 300 nm. En otro aspecto, la distancia no es superior a aproximadamente 1000 nm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm o 100 nm.

25 En otro aspecto más, la distancia entre los poros es entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 800 nm, entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 700 nm, entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 500 nm, o entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 300 nm.

30 Los dos poros se pueden colocar en cualquier posición siempre que permitan una comunicación fluida entre las cámaras y tengan el tamaño y la distancia prescritos entre ellos. En un aspecto, los poros se colocan de tal manera que no haya ningún bloqueo directo entre ellos. Aun así, en un aspecto, los poros son sustancialmente coaxiales, como se ilustra en la figura 5(l).

35 En un aspecto, como se muestra en la figura 5(l), el dispositivo, a través de los electrodos 521, 522, y 523 en las cámaras 503, 504 y 505, respectivamente, se conecta a una o varias fuentes de alimentación. En algunos aspectos, la fuente de alimentación incluye una fijación de voltaje o fijación de membrana (patch-clamp) para suministrar un voltaje a través de cada poro, que puede también medir la corriente a través de cada poro independientemente. A este respecto, la fuente de alimentación y la configuración del electrodo pueden establecer la cámara intermedia en una toma de tierra común para ambas fuentes de alimentación. En un aspecto, las fuentes de alimentación se configuran para aplicar un primer voltaje V_1 entre la cámara superior 505 (Cámara A) y la cámara intermedia 504 (Cámara B), y un segundo voltaje V_2 entre la cámara intermedia 504 y la cámara inferior 503 (Cámara C).

45 En algunos aspectos, el primer voltaje V_1 y el segundo voltaje V_2 son ajustables independientemente. En un aspecto, la cámara intermedia se ajusta para ser una toma de tierra con respecto a los dos voltajes. En un aspecto, la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar conductancia entre cada uno de los poros y el electrodo en la cámara intermedia. En un aspecto, la cámara intermedia comprende un medio para proporcionar una resistencia entre cada uno de los poros y el electrodo en la cámara intermedia. Mantener una resistencia de este tipo suficientemente pequeña con respecto a las resistencias de los nanoporos es útil para desacoplar los dos voltajes y corrientes a través de los poros, lo que es útil para el ajuste independiente de los voltajes.

50 El ajuste de los voltajes se puede usar para controlar el movimiento de las partículas cargadas en las cámaras. Por ejemplo, cuando ambos voltajes se ajustan a la misma polaridad, se puede mover una partícula cargada adecuadamente desde la cámara superior hasta la cámara intermedia y hasta la cámara inferior, o al revés, secuencialmente. En algunos aspectos, cuando los dos voltajes se ajustan a la polaridad opuesta, una partícula cargada puede moverse desde la cámara superior o inferior hasta la cámara intermedia y mantenerse allí.

60 El ajuste de los voltajes en el dispositivo puede ser particularmente útil para controlar el movimiento de una molécula grande, como un polímero cargado, que es lo suficientemente grande como para cruzar ambos poros a la vez. En dicho aspecto, la dirección y la velocidad del movimiento de la molécula se puede controlar por la magnitud y polaridad relativas de los voltajes como se describe a continuación.

65 El dispositivo puede contener materiales adecuados para contener muestras líquidas, en particular, muestras biológicas y/o materiales adecuados para la nanofabricación. En un aspecto, dichos materiales incluyen materiales dieléctricos tales como, pero sin limitación, silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, grafeno, nanotubos de carbono, TiO_2 , HfO_2 , Al_2O_3 , u otras capas metálicas, o cualquier combinación de estos materiales. En algunos aspectos, por

ejemplo, se puede utilizar una única lámina de membrana de grafeno de aproximadamente 0,3 nm de espesor como membrana portadora de poros.

5 Los dispositivos que son microfluídicos y que albergan implementaciones de chips microfluídicos de dos poros pueden fabricarse mediante una variedad de medios y métodos. Para un chip microfluídico compuesto por dos membranas paralelas, ambas membranas pueden ser perforadas simultáneamente por un único haz para formar dos poros concéntricos, aunque también es posible usar diferentes haces a cada lado de las membranas en concierto con cualquier técnica de alineamiento adecuada. En términos generales, el alojamiento asegura una separación sellada de las Cámaras A-C. En un aspecto como se muestra en la figura 5(II), el alojamiento podría proporcionar una
10 resistencia de acceso mínima entre los electrodos de voltaje 521, 522 y 523 y los nanoporos 511 y 512, para asegurar que cada voltaje se aplica principalmente a través de cada poro.

En un aspecto, el dispositivo incluye un chip microfluídico (marcado como "chip de doble núcleo") que comprende dos membranas paralelas conectadas mediante espaciadores. Cada membrana contiene un poro perforado por un único
15 haz a través del centro de la membrana. Además, el dispositivo tiene preferentemente un alojamiento de Teflon® para el chip. El alojamiento asegura una separación sellada de las Cámaras A-C y proporciona una resistencia de acceso mínimo para el electrodo para asegurar que cada voltaje se aplica principalmente a través de cada poro.

Más específicamente, las membranas portadoras de poros pueden fabricarse con rejillas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) con ventanas de silicio, nitruro de silicio o dióxido de silicio de 5-100 nm de espesor. Se pueden usar los espaciadores para separar las membranas, usando un aislante, tal como SU-8, fotorresistente, óxido PECVD, óxido ALD, alúmina ALD o un material metálico evaporado, tal como Ag, Au, o Pt, y ocupando un pequeño volumen dentro de la porción por lo contrario acuosa de la Cámara B entre las membranas. Un soporte se encuentra en un baño acuoso que comprende la fracción volumétrica más grande de la Cámara B. Las cámaras A y C son accesibles
20 por canales de mayor diámetro (para una baja resistencia de acceso) que conducen a los sellos de membrana.

Se puede utilizar un haz de electrones o iones enfocado para perforar los poros a través de las membranas, alineándolos naturalmente. Los poros también se pueden esculpir (encoger) hasta tamaños más pequeños aplicando un enfoque de haz correcto a cada capa. También se puede utilizar cualquier método de perforación de nanoporos
30 únicos para perforar el par de poros en las dos membranas, teniendo en cuenta la profundidad de perforación posible para un método dado y el espesor de las membranas. También es posible preperforar una profundidad prescrita y después un nanoporo a través del resto de las membranas para refinar aún más el espesor de la membrana.

En otro aspecto, se puede utilizar la inserción de nanoporos biológicos en nanoporos de estado sólido para formar un poro híbrido en uno o en ambos poros en el método de dos poros. El poro biológico puede aumentar la sensibilidad de las mediciones de la corriente iónica y es útil cuando solo se deben capturar y controlar los polinucleótidos monocatenarios en el dispositivo de dos poros, por ejemplo, para la secuenciación.
35

En virtud de los voltajes presentes en los poros del dispositivo, las moléculas cargadas pueden moverse a través de los poros entre las cámaras. La velocidad y la dirección del movimiento pueden controlarse por la magnitud y la polaridad de los voltajes. Además, como cada uno de los dos voltajes puede ajustarse independientemente, la dirección y velocidad del movimiento de una molécula cargada puede controlarse con precisión en cada cámara.
40

Un ejemplo se refiere a un armazón polimérico cargado, tal como ADN, que tiene una longitud que es más larga que la distancia combinada que incluye la profundidad de ambos poros más la distancia entre los dos poros. Por ejemplo, un ADNbc de 1000 pb tiene aproximadamente 340 nm de longitud, y sería sustancialmente más largo que los 40 nm abarcados por dos poros de 10 nm de profundidad separados por 20 nm. En una primera etapa, el polinucleótido se carga en la cámara superior o inferior. En virtud de su carga negativa bajo una condición fisiológica a un pH de aproximadamente 7,4, el polinucleótido puede moverse a través de un poro sobre el cual se aplica un voltaje. Por lo tanto, en una segunda etapa, dos voltajes, en la misma polaridad y a las mismas o similares magnitudes, se aplican a los poros para mover el polinucleótido a través de ambos poros secuencialmente.
45
50

Aproximadamente cuando el polinucleótido alcanza el segundo poro, uno o ambos de los voltajes pueden cambiarse. Dado que la distancia entre los dos poros se selecciona para ser más corta que la longitud del polinucleótido, cuando el polinucleótido alcanza el segundo poro, también está en el primer poro. Un cambio rápido de polaridad en el voltaje en el primer poro, por lo tanto, generará una fuerza que aleja al polinucleótido del segundo poro como se ilustra en la Figura 5 (111).
55

Suponiendo que los dos poros tienen una influencia voltaje-fuerza idéntica y $|V_1| = |V_2| + \delta V$, el valor $\delta V > 0$ ($o < 0$) puede ajustarse para un movimiento sintonizable en la dirección V_1 ($o V_2$). En la práctica, aunque la fuerza inducida por el voltaje en cada poro no será idéntica a $V_1 = V_2$, los experimentos de calibración pueden identificar el voltaje de polarización apropiado que resultará en fuerzas de tracción iguales para un chip de dos poros dado; y las variaciones alrededor de dicho voltaje de polarización se pueden usar después para el control direccional.
60

Si, en este punto, la magnitud de la fuerza inducida por el voltaje en el primer poro es inferior al de la fuerza inducida por el voltaje en el segundo poro, entonces el polinucleótido continuará cruzando ambos poros hacia el segundo poro,
65

pero a una velocidad inferior. A este respecto, se aprecia fácilmente que la velocidad y dirección del movimiento del polinucleótido puede controlarse por las polaridades y magnitudes de ambos voltajes. Como se describirá adicionalmente a continuación, este control preciso de movimiento tiene aplicaciones amplias.

5 Por consiguiente, en un aspecto, se divulga un método para controlar el movimiento de un polímero cargado a través de un dispositivo de nanoporo. El método implica (a) cargar una muestra que comprende un polímero cargado en una de las cámaras superior, intermedia o inferior del dispositivo de cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el dispositivo está conectado a fuentes de alimentación para proporcionar un primer voltaje entre la cámara superior y la cámara intermedia y un segundo voltaje entre la cámara intermedia y la cámara inferior; (b) establecer un primer
10 voltaje inicial y un segundo voltaje inicial para que el polímero se mueva entre las cámaras, ubicando así el polímero a través de los poros primero y segundo; y (c) ajustar el primer voltaje y el segundo voltaje de modo que ambos voltajes generen fuerza para alejar al polímero cargado de la cámara intermedia (modo de competencia de voltaje), en donde los dos voltajes son de magnitud diferente, en condiciones controladas, de modo que el polímero cargado se mueve a través de ambos poros en cualquier dirección y de manera controlada.

15 Para establecer el modo de competencia de voltaje en la etapa (c), la fuerza relativa ejercida por cada voltaje en cada poro debe determinarse para cada dispositivo de dos poros utilizado, y esto se puede realizar por experimentos de calibración observando la influencia de los valores de voltaje diferentes en el movimiento del polinucleótido, que puede medirse detectando las características de ubicación conocida y detectables en el polinucleótido, con ejemplos de
20 dichas características detalladas más adelante en esta divulgación. Si las fuerzas son equivalentes en cada voltaje común, por ejemplo, el uso del mismo valor de voltaje en cada poro (con polaridad común en las cámaras superior e inferior con respecto a la cámara intermedia conectada a tierra) crea un movimiento neto nulo en ausencia de agitación térmica (la presencia e influencia del movimiento browniano se describen a continuación). Si las fuerzas no son equivalentes en cada voltaje común, lograr fuerzas iguales implica la identificación y el uso de un voltaje mayor en el
25 poro que experimenta una fuerza más débil en el voltaje común. La calibración del modo de competencia de voltaje puede hacerse para cada dispositivo de dos poros y para polímeros o moléculas cargados específicos cuyas características influyen la fuerza al pasar a través de cada poro.

30 En un aspecto, la muestra que contiene el polímero cargado se carga en la cámara superior y el primer voltaje inicial se establece para empujar el polímero cargado de la cámara superior a la cámara intermedia y el segundo voltaje inicial se establece para empujar el polímero de la cámara intermedia a la cámara inferior. Asimismo, la muestra se puede cargar inicialmente en la cámara inferior y el polímero cargado puede empujarse a las cámaras intermedia y superior.

35 En otro aspecto, la muestra que contiene el polímero cargado se carga en la cámara intermedia; el primer voltaje inicial se establece para empujar el polímero cargado de la cámara intermedia a la cámara superior; y el segundo voltaje inicial se establece para empujar el polímero cargado desde la cámara intermedia hasta la cámara inferior.

40 En un aspecto, el primer voltaje y el segundo voltaje ajustados en la etapa (c) son aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10.000 veces tan alto, en magnitud, que la diferencia entre los dos voltajes. Por ejemplo, los dos voltajes pueden ser 90 mV y 100 mV, respectivamente. La magnitud de los dos voltajes, aproximadamente 100 mV, es aproximadamente 10 veces la diferencia entre ellos, 10 mV. En algunos aspectos, la magnitud de los voltajes es al menos aproximadamente 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 150
45 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces o 9000 veces tan alta como la diferencia entre ellos. En algunos aspectos, la magnitud de los voltajes no es más que aproximadamente 10000 veces, 9000 veces, 8000 veces, 7000 veces, 6000 veces, 5000 veces, 4000 veces, 3000 veces, 2000 veces, 1000 veces, 500 veces, 400 veces, 300 veces, 200 veces o 100 veces tan alta como la diferencia entre ellos.

50 En un aspecto, los ajustes en tiempo real o en línea al primer voltaje y el segundo voltaje en la etapa (c) se realizan mediante control activo o control de retroalimentación utilizando hardware y software específicos, a velocidades de reloj hasta cientos de megahertzios. El control automático del primer o segundo o ambos voltajes se basa en la retroalimentación de la primera o segunda o ambas mediciones de corriente iónica.

55 **Sensores**

En un aspecto, el dispositivo de nanoporo incluye además uno o más sensores para realizar la identificación del estado de unión de los motivos de unión.

60 Los sensores utilizados en el dispositivo pueden ser cualquier sensor adecuado para identificar una molécula o partícula, tal como un polímero. Por ejemplo, se puede configurar un sensor para identificar el polímero midiendo una corriente, un voltaje, un valor de pH, una característica óptica o tiempo de permanencia asociado con el polímero o uno o más componentes individuales del polímero. En un aspecto, el sensor incluye un par de electrodos colocados en dos lados de un poro para medir una corriente iónica a través del poro cuando una molécula o partícula, en
65 particular, un polímero, se mueve a través del poro.

En una realización, el sensor mide una característica óptica del polímero o un componente (o unidad) del polímero. Un ejemplo de dicha medición incluye la identificación de una banda de absorción única para una unidad particular mediante espectroscopía infrarroja (o ultravioleta).

- 5 Cuando se utilizan las mediciones del tiempo de permanencia, el tamaño de la unidad puede estar correlacionada con la unidad específica basándose en la longitud de tiempo que necesita para pasar a través del dispositivo de detección.

Aún más, el sensor puede incluir una enzima distal a este sensor, dicha enzima es capaz de separar la unidad terminal del polímero desde la penúltima unidad, proporcionando así una única unidad molecular del polímero. La única molécula, tal como un único nucleótido o un aminoácido, puede detectarse entonces con métodos tales como la espectrometría de masas. Los métodos para medir una única unidad son conocidos en la técnica e incluyen aquellos desarrollados por Cal Tech (véase, por ejemplo, spectrum.ieee.org/tech-talk/at-work/test-and-measurement/a-scale-for-weighing-single-molecules). Los resultados de dicho análisis se pueden comparar con aquellos del dispositivo de detección para confirmar la exactitud del análisis.

15 En algunas realizaciones, el sensor está funcionalizado con reactivos que forman distintos enlaces no covalentes con cada base de ADN. A este respecto, un hueco formado por el sensor puede ser más grande y así permitir una medición efectiva. Por ejemplo, cuando se usa con un sensor funcionalizado con reactivos, un hueco de 2,5 nm puede ser tan efectivo como un hueco de 0,8 nm.

20 La detección de túneles con un sensor funcionalizado se denomina "reconocimiento de túneles". Utilizando un microscopio de efecto túnel (STM por sus siglas en inglés) con reconocimiento de túneles, se puede identificar una base de ADN flanqueada por otras bases en un oligómero de ADN corto. El reconocimiento de túneles también puede proporcionar un "lector universal" diseñado para unirse con hidrógeno a cada una de las cuatro bases de ADN (A, C, G, T) en una única orientación, y también a la base 5-metil-citosina (mC) que se produce naturalmente debido a modificaciones epigenéticas.

25 Una limitación con el reconocimiento de túneles convencional es que puede detectar solo el ADN de difusión libre que se une de manera aleatoria en el hueco, o que se encuentra en el hueco durante el movimiento del microscopio, sin ningún método de captura explícita del hueco. Sin embargo, se pueden eliminar los inconvenientes colectivos de la configuración de STM cuando el reactivo de reconocimiento, una vez optimizado para la sensibilidad, se incorpora dentro de un hueco de tunelización de electrodos en un canal de nanoporo.

30 Por consiguiente, en una realización, el sensor comprende la modificación de la superficie mediante un reactivo. En un aspecto, el reactivo es capaz de formar un enlace no covalente con un nucleótido. En un aspecto particular, el enlace es un enlace de hidrógeno. Los ejemplos no limitantes del reactivo incluyen 4-mercaptobenzamida y 1-H-Imidazol-2-carboxamida.

35 Una ventaja significativa de los métodos en la presente tecnología es que se pueden diseñar, en principio, para proporcionar un seguimiento directo del progreso a través de las regiones homopoliméricas (repeticiones de bases). El seguimiento de las repeticiones es útil, por ejemplo, ya que las eliminaciones e inserciones de repeticiones de mononucleótidos específicas (7, 9 nt) en el ADN mitocondrial humano se han visto implicadas en varios tipos de cáncer. El seguimiento directo de las repeticiones de bases es difícil, si no imposible, con la detección de la corriente iónica.

40 En la detección de la corriente iónica, no hay una señal distinta por nucleótido de movimiento de ADNmc homopolimérico a través del poro. Por lo tanto, una plataforma de secuenciación de nanoporos ideal puede incluir un método de detección auxiliar que puede hacer un seguimiento del progreso del movimiento por nucleótido y al mismo tiempo lograr la sensibilidad de un único nucleótido. Las transiciones entre nucleótidos vecinos en oligómeros pueden observarse con el reconocimiento de túneles, por lo que es un candidato para la secuenciación que permite el seguimiento de las repeticiones de bases.

45 Por lo tanto, los métodos de la presente divulgación pueden proporcionar un control de la velocidad de suministro de ADN para uno o más sitios de reconocimiento de túneles, cada uno posicionado en uno o ambos canales de nanoporos y el control del voltaje puede asegurar que cada nucleótido reside en cada sitio durante una duración suficiente para la identificación robusta.

50 Los sensores en los dispositivos y métodos de la presente divulgación pueden comprender oro, platino, grafeno, o carbono, u otros materiales adecuados. En un aspecto particular, el sensor incluye partes hechas de grafeno. El grafeno puede actuar como un conductor y un aislante, por lo que las corrientes de túneles a través del grafeno y a través del nanoporo pueden secuenciar el ADN de translocación.

55 En algunas realizaciones, el hueco de túnel tiene una anchura de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm. En un aspecto, la anchura del hueco es al menos aproximadamente 1 nm, o alternativamente, al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15 nm. En otro aspecto, la anchura del hueco no es superior a aproximadamente 20 nm, o alternativamente, no superior a aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13,

12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 nm. En algunos aspectos, la anchura está entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 15 nm, entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 nm, entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 10 nm, entre aproximadamente 2,5 nm y aproximadamente 10 nm, o entre aproximadamente 2,5 nm y aproximadamente 5 nm.

- 5 En algunas realizaciones, el sensor es un sensor eléctrico. En algunas realizaciones, el sensor detecta un medio de detección fluorescente cuando la molécula diana o el marcador detectable que pasa a través tiene una firma fluorescente única. Una fuente de radiación en la salida del poro puede usarse para detectar esta firma.
- 10 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones anteriores, se pretende que la anterior descripción y ejemplos ilustren, y no limiten, el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una molécula o partícula diana sospechosa de estar presente en una muestra, que comprende:

5 (a) poner en contacto la muestra con (i) una molécula de fusión que comprende un ligando capaz de unirse a la molécula o partícula diana y un dominio de unión, y (ii) un armazón polimérico que comprende al menos un motivo de unión al cual es capaz de unirse el dominio de unión, bajo condiciones que permiten que la molécula o partícula diana se enlacen al ligando y el dominio de unión se enlace al motivo de unión, en donde el polímero es al menos uno de un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido peptidonucleico (ANP), un híbrido de ADN/ARN, y un polipéptido;

10 (b) cargar el polímero en un dispositivo que comprende un poro que separa un espacio interior del dispositivo en dos volúmenes, y configurar el dispositivo para pasar el polímero a través del poro de un volumen al otro volumen, en donde el dispositivo comprende electrodos para aplicar un diferencial de voltaje entre los dos volúmenes, en donde el dispositivo comprende además un sensor adyacente al poro configurado para identificar objetos que pasan a través del poro, y en el que el poro tiene (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro; y

15 (c) determinar, con el sensor, si la molécula de fusión unida al motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana, detectando de este modo la presencia de la molécula o partícula diana en la muestra.

20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

(i) la molécula diana está seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un compuesto químico, un ion y un elemento; o

25 (ii) la partícula diana está seleccionada del grupo que consiste en un complejo o agregado de proteínas, un complejo de proteínas/ácidos nucleicos, un virus fragmentado o totalmente ensamblado, una bacteria, una célula y un agregado celular.

30 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que:

(i) la etapa (a) está preformada antes de la etapa (b); o

(ii) la etapa (b) está preformada antes de la etapa (a).

35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la aplicación de una condición sospechosa de alterar la unión entre la molécula o partícula diana y el ligando y realizar de nuevo la determinación, opcionalmente

en donde la condición se selecciona del grupo que consiste en eliminar la molécula o partícula diana de la muestra, añadir un agente que compita con la molécula o partícula diana o el ligando para la unión, y cambiar el pH, la sal o la temperatura.

40 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el motivo de unión comprende una modificación química para la unión al dominio de unión, opcionalmente en donde la modificación química se selecciona del grupo que consiste en acetilación, mesilación, sumolación, glicosilación, fosforilación y oxidación.

45 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio de unión:

(i) se selecciona del grupo que consiste en una hélice-giro-hélice, un dedo de zinc, una cremallera de leucina, una hélice alada, una hélice-giro-hélice alada, una hélice-bucle-hélice y una caja de grupo de alta movilidad (caja HMG); o

50 se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos peptidonucleicos (APN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR por sus siglas en inglés), y aptámeros.

55 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un epítipo, una hormona, un neurotransmisor, una citocina, un factor de crecimiento, una molécula de reconocimiento celular y un receptor.

60 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio de unión y el ligando se enlazan, a través de un enlace covalente, un enlace de hidrógeno, un enlace iónico, un enlace metálico, una fuerza de van der Waals, una interacción hidrofóbica o interacción de apilamiento planar, o se traducen como un polipéptido continuo, para formar la molécula de fusión.

65 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además poner en contacto la muestra con un marcador detectable capaz de unirse a la molécula o partícula diana, o el complejo molécula o partícula diana/ligando.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polímero:

comprende al menos dos unidades del motivo de unión; y/o

5 comprende al menos dos diferentes motivos de unión; la muestra está en contacto con al menos dos moléculas de fusión comprendiendo cada una un dominio de unión diferente capaz de unirse a cada motivo de unión y un ligando diferente capaz de unirse a una molécula o partícula diana diferente; y el sensor se configura para identificar si la molécula de fusión unida a cada motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo comprende una cámara superior, una cámara intermedia y una cámara inferior,

10 en donde la cámara superior está en comunicación con la cámara intermedia a través de un primer poro, y la cámara intermedia está en comunicación con la cámara inferior a través de un segundo poro;

en donde el primer poro y el segundo poro tienen (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o

15 (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro; y están separados aproximadamente entre 10 nm y aproximadamente 1000 nm;

y en donde cada una de las cámaras comprende un electrodo para conectarse a una fuente de alimentación.

20 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además mover el polímero en una dirección inversa después de que el motivo de unión pase a través del poro, para identificar, de nuevo, si la molécula de fusión unida a cada motivo de unión está unida a la molécula o partícula diana.

25 13. Un kit, paquete o mezcla para detectar la presencia de una molécula o partícula diana, que comprende:

(a) una molécula de fusión que comprende un ligando capaz de unirse a la molécula o partícula diana y un dominio de unión;

30 (b) un armazón polimérico que comprende al menos un motivo de unión al cual se puede unir el dominio de unión, en donde el polímero es al menos uno de un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN), un ácido peptidonucleico (ANP), un híbrido de ADN/ARN, y un polipéptido; y

35 (c) un dispositivo que comprende un poro que separa un espacio interior del dispositivo en dos volúmenes, en donde el dispositivo está configurado para permitir que el polímero pase a través del poro desde un volumen hasta el otro volumen, y el poro tiene (i) aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro o (ii) aproximadamente 100 nm a aproximadamente 10000 nm de diámetro, en donde el dispositivo comprende electrodos para aplicar un diferencial de voltaje entre los dos volúmenes, y en donde el dispositivo comprende además un sensor adyacente al poro configurado para identificar si el motivo de unión está (i) unido a la molécula de fusión mientras que el ligando está unido a la molécula o partícula diana, (ii) se une a la molécula de fusión mientras que el ligando no se une a la molécula o partícula diana, o (iii) no se une a la molécula de fusión.

40 14. El kit, paquete o mezcla de la reivindicación 13, que comprende además una muestra sospechosa de contener la molécula o partícula diana, opcionalmente en donde la muestra comprende además un marcador detectable capaz de unirse a la molécula o partícula diana o el complejo ligando/molécula o partícula diana.

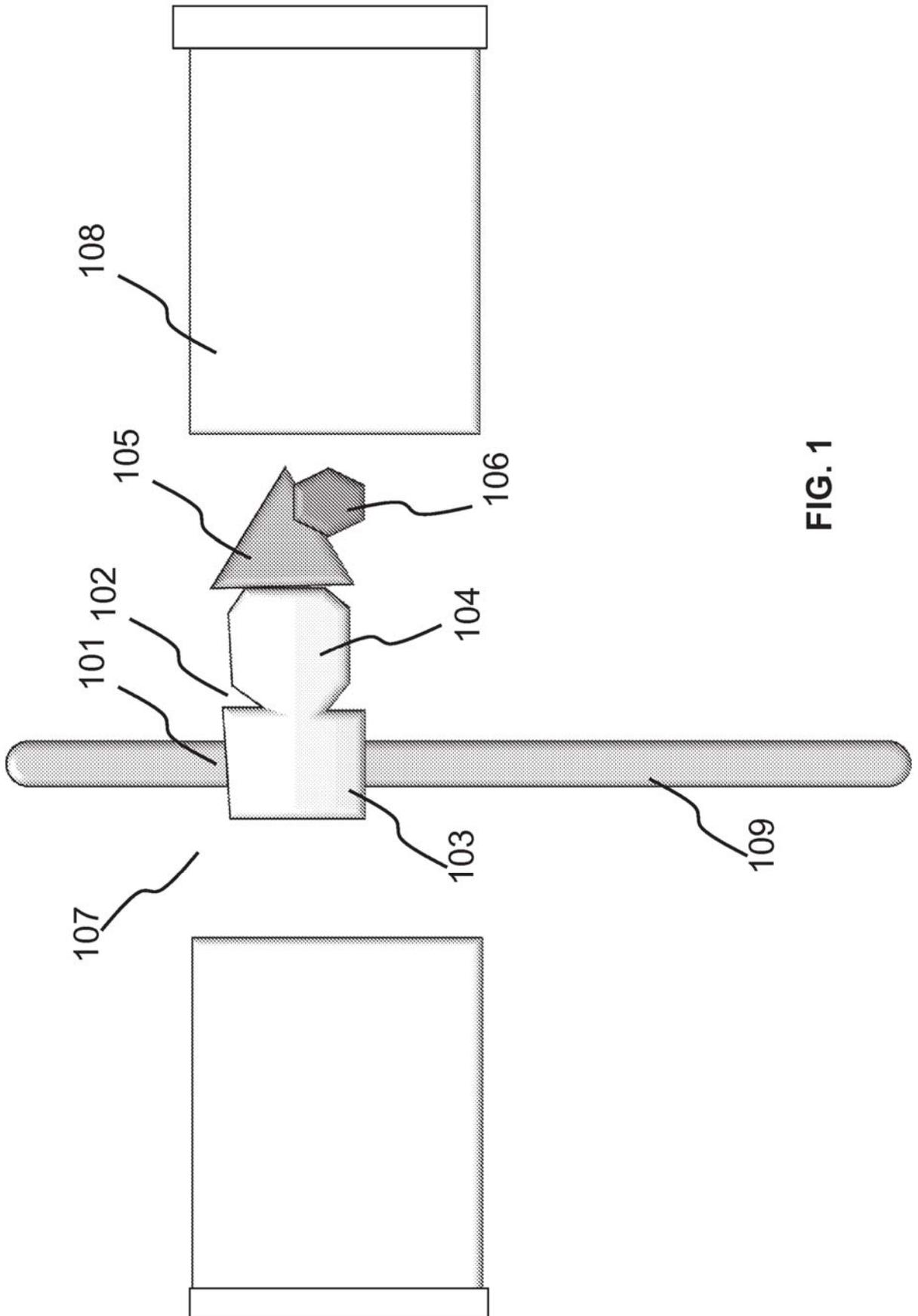


FIG. 1

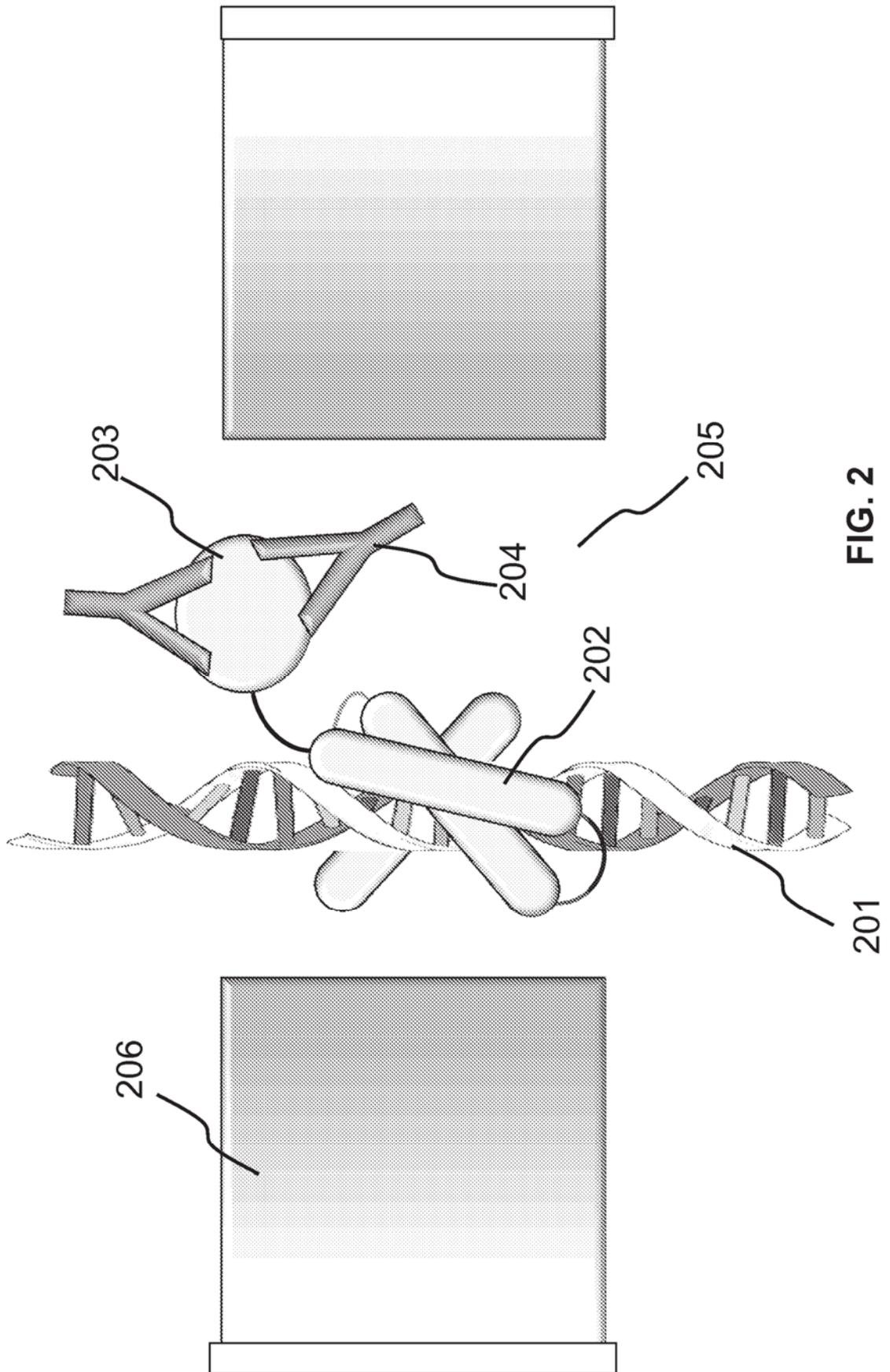


FIG. 2

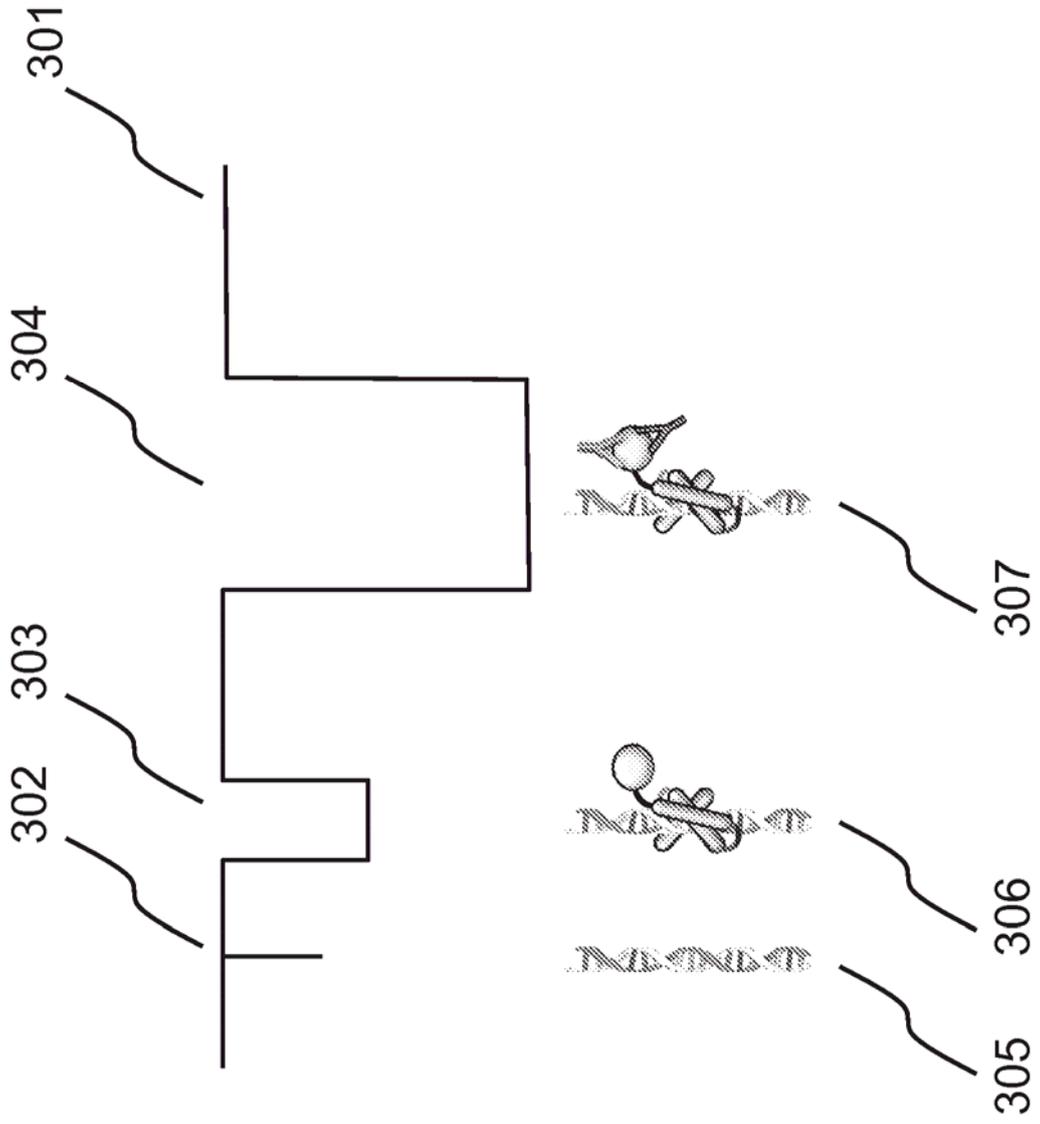
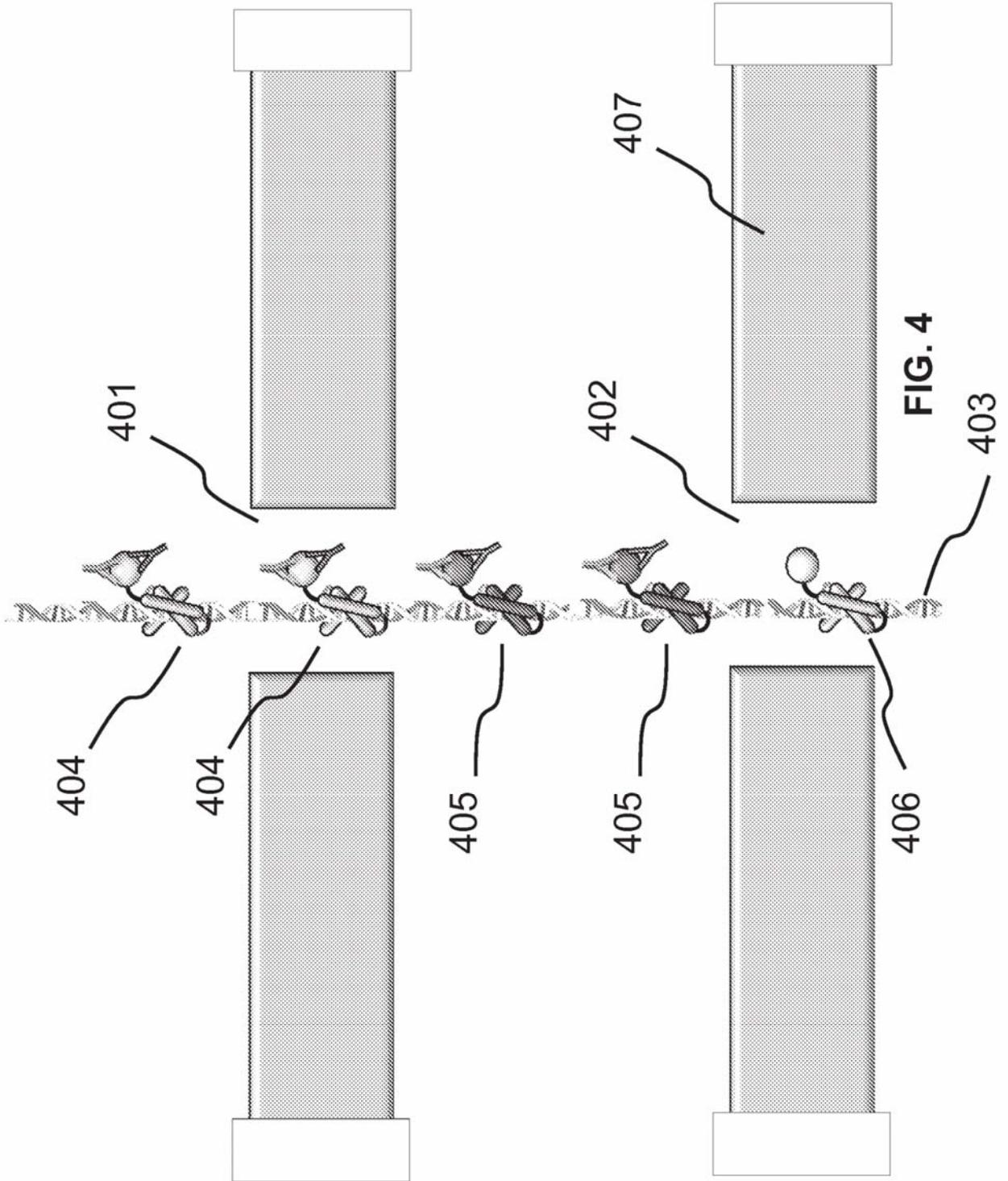
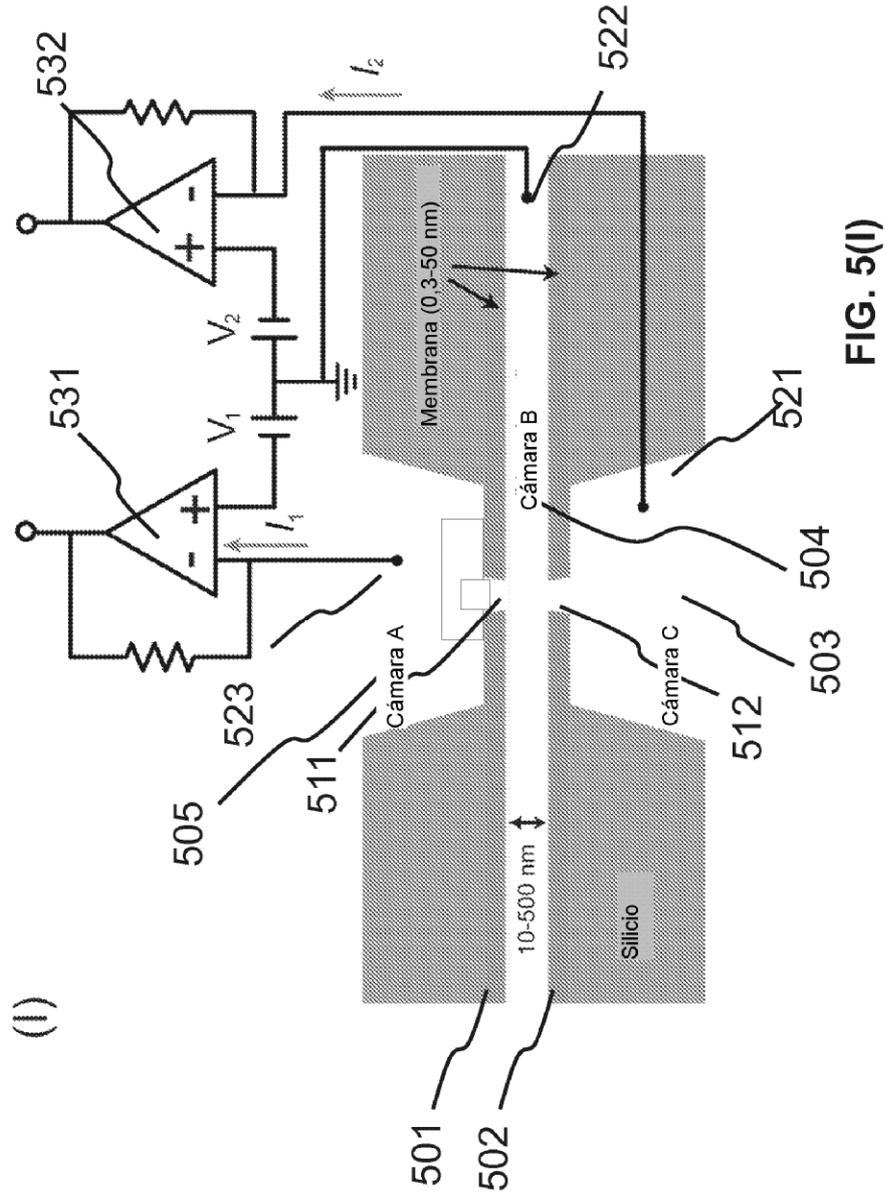


FIG. 3





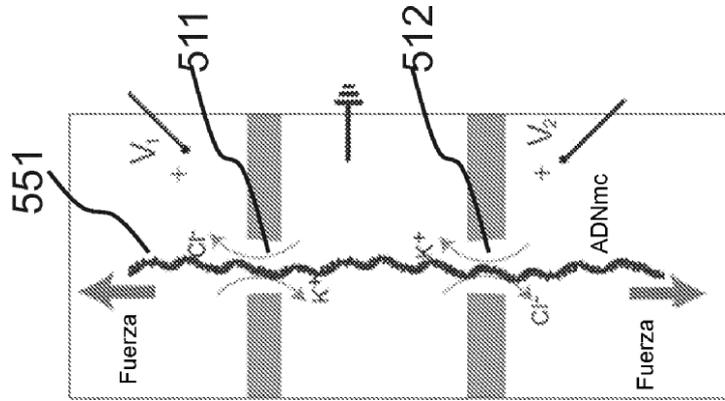


FIG. 5 (III)

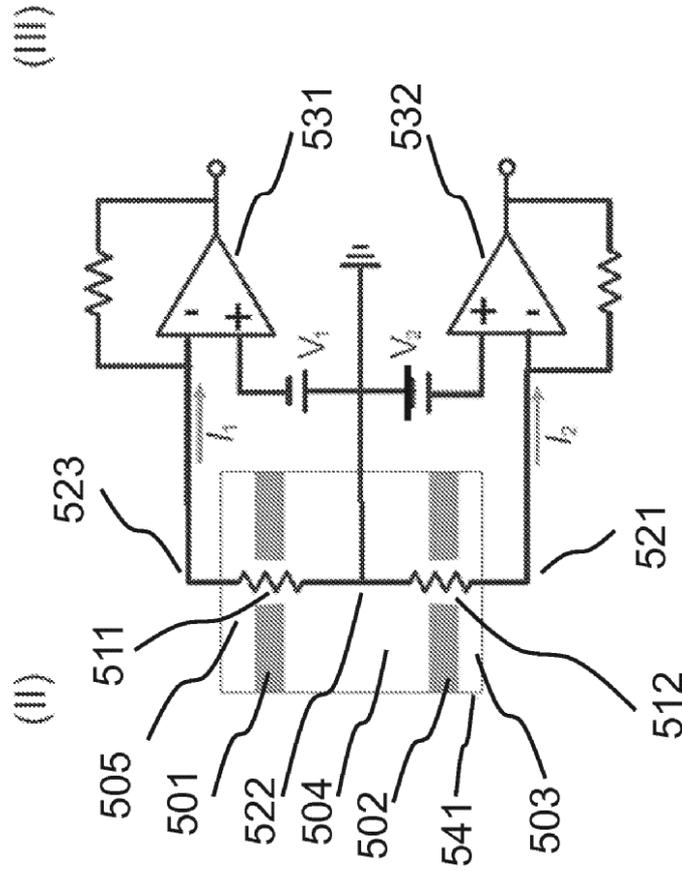


FIG. 5 (II)