

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 703**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015 PCT/EP2015/079864**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16096901**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015 E 15808682 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3234605**

54 Título: **Biosensor basado en una partícula anclada**

30 Prioridad:

16.12.2014 US 201462092751 P

16.12.2014 US 201462092763 P

12.03.2015 US 201562132096 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

TECHNISCHE UNIVERSITEIT EINDHOVEN

(100.0%)

Den Dolech 2

5612 AZ Eindhoven, NL

72 Inventor/es:

PRINS, MENNO WILLEM JOSÉ;

MERKX, MAARTEN;

IJZENDOORN, LEONARDUS JOSEPHUS;

ZIJLSTRA, PETER;

VISSER, EMILIUS WILLEM ADRIAAN y

SCHEEPERS, MAX ROSE-MARIE WILHELMUS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 743 703 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biosensor basado en una partícula anclada

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a una técnica de biosensor basada en la detección de la presencia de un analito basándose en cambios en el movimiento de una partícula funcionalizada unida por un anclaje a una superficie.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La mayoría de los principios de biosensores para marcadores bioquímicos se han desarrollado para su uso en diagnósticos *in vitro*, donde se toma una muestra (por ejemplo, sangre, saliva, orina, moco, sudor o líquido cefalorraquídeo) y se transfiere a un dispositivo artificial (por ejemplo, un plástico desechable) fuera de un organismo vivo. En dichos ensayos de biosensor, se puede aplicar una amplia gama de etapas de pretratamiento de muestras (por ejemplo, etapas de separación o dilución) y se pueden introducir múltiples reactivos en el ensayo (por ejemplo, para amplificación de diana, amplificación de señal o etapas de lavado). Ejemplos de ensayos de biosensor *in vitro* son: inmunoensayos, ensayos de ácidos nucleicos, pruebas para electrolitos y metabolitos, ensayos electroquímicos, ensayos de actividad enzimática, ensayos basados en células, etc. (véase Tietz, Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 2005).

En la detección bioquímica *in vivo*, al menos una parte del sistema de sensor permanece conectado o se inserta en el cuerpo humano, por ejemplo, sobre la piel, o en la piel, o debajo de la piel, o sobre o en o debajo de otra parte del cuerpo. Debido al contacto entre el biosensor y el organismo vivo, la detección bioquímica *in vivo* establece altos requisitos de biocompatibilidad (por ejemplo, los procesos de inflamación deben minimizarse) y el sistema de sensor debe funcionar de manera fiable dentro del entorno complejo del organismo vivo. Para aplicaciones de monitorización, el sistema debe poder realizar más de una medición a lo largo del tiempo y debe ser robusto y fácil de usar.

Una aplicación importante de la detección bioquímica *in vivo* es la monitorización continua de la glucosa (CGM). Los dispositivos comerciales de monitorización continua de la glucosa se basan en la detección electroquímica enzimática (véase, por ejemplo, Heo y Takeuchi, Adv.Healthcare.Mat. 2013, vol. 2, pág. 43-56). La detección enzimática es menos genérica que la detección basada en afinidad. Los sistemas comerciales para la monitorización *in vivo* de la glucosa están disponibles en Dexcom y Medtronic. Una desventaja de los sistemas de CGM actuales es que la respuesta del sensor muestra una tendencia a la deriva y, por lo tanto, los sistemas requieren una recalibración regular mediante una prueba de glucosa en sangre *in vitro* (para una revisión, véase, por ejemplo, Heo y Takeuchi, Adv.Healthcare.Mat. 2013, vol. 2, pág. 43-56).

Se conocen en la técnica varias técnicas de biodetección basada en partículas, incluyendo técnicas basadas en la detección por dispersión óptica, por ejemplo, Bruls et al., Lab Chip 2009. La solicitud de patente US2012184048 describe un método para la caracterización de diferentes tipos de enlaces en un sistema de biodetección basado en partículas. Las partículas no unidas se unen a una superficie de detección de una manera dependiente de la diana, después se realiza una separación sin unión (una etapa de lavado), y posteriormente se miden las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada de las partículas unidas para caracterizar el tipo de enlace, por ejemplo, para discriminar entre partículas unidas específicamente y no específicamente. El uso de partículas no unidas y un proceso de separación sin unión es útil para diagnósticos *in vitro*. Sin embargo, para aplicaciones *in vivo*, aplicaciones, las partículas no unidas pueden suponer un riesgo de seguridad, y es difícil implementar un proceso de separación sin unión en una situación *in vivo*.

La dificultad anterior se puede evitar mediante técnicas de biodetección basada en el movimiento de partículas ancladas (TPM). La técnica TPM se basa en las mediciones del movimiento de las partículas ancladas a una superficie. Un ejemplo es Laurens et al., Nucleic Acids Res. Sep 2009; 37(16): 5454-5464, donde se informa de experimentos de TPM sobre proteínas que se unen a un anclaje de ADN, para revelar cómo las proteínas cambian la conformación del ADN. En dichos estudios, se toman medidas para evitar la unión no a través del anclaje de la partícula a la superficie, ya que una partícula que está unida a la superficie de otra manera que a través del anclaje, no proporciona información sobre el anclaje. Un ejemplo es: Blumberg et al., Biophysical Journal 2005; 89, 1272-1281.

Los biosensores que tienen anclajes funcionalizados unidos a una superficie se han desarrollado basándose en el principio de que el movimiento de las partículas unidas por un anclaje cambia en función de la presencia de analito. Los cambios de movimiento se deben a cambios en la estructura del propio anclaje debido a la presencia del analito. También hay técnicas para detectar analitos midiendo una propiedad cinemática de una partícula funcionalizada anclada a una superficie en función de la presencia de analito. En estas técnicas, es importante evitar la unión de

partículas a la superficie, porque el impedimento estérico interfiere con la sensibilidad influenciada por el analito.

Guo, L., Ferhan, A. R., Chen, H., Li, C., Chen, G., Hong, S. y Kim, D.-H. (2013), Distance-Mediated Plasmonic Dimers for Reusable Colorimetric Switches: A Measurable Peak Shift of More than 60 nm. *Small*, 9: 234-240. doi:10.1002/sml.201201061 describe los primeros intercambios de ADN colorimétricos reconfigurables basados en la unión al ADN diana. Esta unión al ADN activa un cambio en la distancia entre partículas entre los dímeros de nanopartículas de oro. Se puede lograr un cambio espectral significativo de 68 nm desde la activación-desactivación. La reconfigurabilidad es posible debido al acoplamiento de tiol y EDC-imidazol que ancla los enlazadores de ADN a las nanopartículas. El enorme cambio espectral permite a simple vista observar un único evento de unión biomolecular a diana en tiempo real bajo un microscopio de campo oscuro. El límite de detección de las moléculas diana en PBS y suero humano es de PBS y suero humano es de 10^{-13} M y 10^{-11} M respectivamente. También se describe una estrategia de fabricación mejorada a través de la funcionalización asimétrica, asistida por la síntesis en fase sólida que minimiza la formación de trímeros y multímeros.

LI DENG ET AL, "An off-on-off electrochemiluminescence approach for ultrasensitive detection of thrombin", *BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS*, NL, (20140315), vol. 59, doi:10.1016/j.bios.2014.03.012, ISSN 0956-5663, páginas 58 - 63 demuestran un aptasensor para la detección de trombina por electroquimioluminiscencia (ECL) ultrasensible basada en un "enfoco de desactivación-inactivación-desactivación". El sistema está compuesto por una película de nanocristales de CdS dopada con Eu^{3+} (CdS:Eu NCs) sobre un electrodo de carbono vítreo (GCE) como emisor de ECL. Después, la sonda de ADN en horquilla (ssDNA1) marcada con nanopartículas de oro (AuNPs) que contenía la secuencia de aptámeros de unión a la trombina (TBA) se unió a la película de NC, lo que llevó a la inactivación (desactivación) de ECL como resultado de la transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) entre la película CdS:Eu NC y las AuNPs proximales. Tras la aparición de la hibridación con su ADN complementario (ssDNA2), se produjo un aumento (activación) de ECL debido a las interacciones de los NC de CdS:Eu excitados con la resonancia de plasmón superficial (SPR) inducida por ECL en AuNPs en una separación grande. La trombina podría inducir que ssDNA1 forme un cuadrúplex G y haga que las AuNP estén cerca de la película de CdS:Eu NC de nuevo, lo que dio como resultado una mejor inactivación (desactivación) de ECL. Este sistema "desactivación-activación-desactivación" mostró un cambio máximo de 7,4 veces la intensidad de ECL debido a la transformación de la configuración de ssDNA1 y proporciona una gran sensibilidad para la detección de trombina en un amplio intervalo de detección de 50 aM a 1 pM.

El documento WO2009061783 (A2) a nombre de la University of Rochester, describe un chip de sensor y un dispositivo de detección. El chip de sensor incluye un sustrato, al menos una porción del cual está cubierta por una película de nanopartículas metálicas; una primera molécula de ácido nucleico que se caracteriza por ser capaz de (i) auto-hibridarse en una conformación de horquilla e (ii) hibridar específicamente con una molécula de ácido nucleico diana, teniendo la primera molécula de ácido nucleico un primer y segundo extremos, cuyo primer extremo está anclado a la película de nanopartículas de metal; y un primer fluoróforo unido al segundo extremo de la primera molécula nucleica. Cuando la primera molécula de ácido nucleico está en la conformación de horquilla, la película de nanopartículas metálicas inactiva sustancialmente las emisiones de fluorescentes del primer fluoróforo, y cuando la primera molécula de ácido nucleico se encuentra en una conformación diferente de horquilla, las emisiones de fluorescentes del primer fluoróforo se mejoran por plasmón superficial.

SLAVIK ET AL, "Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor", *SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL: INTERNATIONAL JOURNAL DEVOTED TO RESEARCH AND DEVELOPMENT OF PHYSICAL AND CHEMICAL TRANSDUCERS*, ELSEVIER S.A, CH, (20070330), vol. 123, n.º 1, doi:10.1016/J.SNB.2006.08.020, ISSN 0925-4005, páginas 10 - 12 describen un sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) de sensibilidad ultra-alta basado en la excitación de un plasmón superficial de largo alcance. En comparación con los informes anteriores, el sensor emplea componentes fotónicos más avanzados, como la fuente de diodo superluminescente y las fibras de mantenimiento de la polarización, lo que permitió una disminución drástica del límite de detección del sensor. El límite de detección del índice de refracción alcanzado de $2,5 \times 10^{-8}$ es hasta ahora el valor más alto informado para cualquier sensor basado en SPR.

N. LAURENS ET AL, "Dissecting protein-induced DNA looping dynamics in real time", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, (20090901), vol. 37, n.º 16, doi:10.1093/nar/gkp570, ISSN 0305-1048, páginas 5454 - 5464, describen que muchas proteínas que interactúan con el ADN realizan o mejoran sus funciones específicas al unirse simultáneamente a múltiples sitios diana, induciendo así un bucle en el ADN. La dinámica y las energías involucradas en esta formación de bucle influyen en el mecanismo de reacción. El movimiento de partículas ancladas ha demostrado ser una poderosa técnica para estudiar en tiempo real las dinámicas de bucle de ADN inducidas por proteínas, mientras perturba mínimamente las interacciones ADN-proteína. Además, permite que muchos experimentos de una sola molécula se realicen en paralelo. Usando como sistema modelo la enzima de restricción tetramérica de tipo II SfiI, que se une a dos copias de su sitio de reconocimiento, se muestra aquí que podemos determinar las etapas de asociación y disociación de ADN-proteína, así como el proceso real de captura del bucle inducido por proteína y la liberación en

una sola molécula de ADN. El resultado de estos experimentos es un esquema de reacción cuantitativa para el bucle de ADN por Sfil que se compara rigurosamente con estudios bioquímicos detallados de la dinámica de bucle de Sfil. También se presentan métodos novedosos para el análisis de datos y se comparan y se analizan estos con los métodos existentes. La aplicabilidad general de las técnicas introducidas mejorará aún más el movimiento de partículas ancladas como una herramienta para seguir la dinámica de la proteína de ADN en tiempo real.

RESUMEN DE LA INVENCION

Las presentes enseñanzas proporcionan un método para detectar un analito usando movimiento de partículas ancladas según la reivindicación 1. También se proporciona un biosensor para detectar un analito usando un biosensor de movimiento de partículas ancladas según la reivindicación 8. Las características ventajosas se presentan en las reivindicaciones dependientes.

En un aspecto, la presente invención proporciona una técnica de biodetección basada en la detección de cambios en el movimiento de una partícula funcionalizada unida por un anclaje a una superficie, donde la presencia de un analito cambia la partícula entre los estados unido y no unido con respecto a la superficie. En contraste con las técnicas de biodetección basadas en partículas ancladas conocidas donde la unión a la superficie no es deseada, según la presente invención, el analito hace que la partícula anclada cambie entre los estados unido y no unido con la superficie. Este es un contraste sorprendente con la sabiduría convencional en los estudios de movimiento de partículas ancladas que enseñan explícitamente que se debe evitar la unión a la superficie.

La presente invención proporciona una tecnología de biosensores para la monitorización bioquímica in vivo que es sensible, específica, estable, biocompatible y flexible. Hay muchas aplicaciones de esta técnica de biodetección, incluida la monitorización continua de la glucosa en pacientes diabéticos, sin la necesidad de recalibrar regularmente el sistema de sensor; monitorización de electrolitos y metabolitos, que es importante para pacientes que pueden volverse inestables, por ejemplo, en cuidados intensivos; mediciones de electrolitos que son útiles para monitorizar la función renal, por ejemplo, en pacientes cardíacos; mediciones de proteínas que pueden ser útiles para monitorizar la función cardíaca, por ejemplo, BNP es un marcador clave para la insuficiencia cardíaca; mediciones de fármacos y/o metabolitos de fármacos que son útiles para monitorizar la ingesta de fármacos (cumplimiento) y la farmacocinética (con el objetivo de mantener el fármaco dentro de la ventana de concentración deseada); mediciones de respuesta a los fármacos que son útiles para monitorizar la eficacia del fármaco; y monitorizar el manejo de enfermedades, control de terapias, monitorización del cumplimiento. Además, el método también se puede aplicar muy generalmente para la biodetección molecular, por ejemplo, para el diagnóstico in vitro, pruebas en el punto de atención, pruebas ambientales, pruebas de alimentos, medicina forense, etc. La presente invención también puede encontrar aplicación en investigación biológica, biomédica y farmacéutica, por ejemplo, para monitorizar ensayos con células vivas, tejidos, órganos, etc. Los analitos pueden ser electrolitos, moléculas pequeñas, lípidos, carbohidratos, péptidos, hormonas, proteínas, oligonucleótidos, ADN, ARN, etc.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar un analito utilizando el movimiento de partículas ancladas como se define en la reivindicación 1. El método incluye poner una matriz que contiene el analito en contacto con un dispositivo sensor que tiene una superficie y una molécula de anclaje unida en un primer extremo a la superficie y unida en un segundo extremo a una partícula funcionalizada. La partícula funcionalizada tiene un primer estado en el que la partícula funcionalizada está unida a la superficie y un segundo estado en el que la partícula funcionalizada no está unida a la superficie, donde la partícula funcionalizada cambia entre el primer y el segundo estado dependiendo de la presencia y la ausencia del analito, cambiando así las características de movimiento de la partícula funcionalizada dependiendo de la presencia del analito. El método incluye la medición de un parámetro de coordenadas espaciales de la partícula funcionalizada en relación con la superficie, y la determinación de la presencia/concentración del analito a partir de los cambios en el parámetro de coordenadas espaciales medido.

El parámetro de coordenadas espaciales, en algunas realizaciones, puede medirse iluminando la partícula funcionalizada y/o la superficie, detectando la radiación óptica de la partícula funcionalizada y/o la superficie, y determinando, a partir de radiación óptica, la posición, orientación y/o velocidad de la partícula funcionalizada respecto a la superficie.

El parámetro de coordenadas espaciales, en algunas realizaciones, puede medirse mediante la excitación de portadores de carga libre en la partícula funcionalizada y/o la superficie, y mediante la detección de la radiación óptica de la partícula funcionalizada y/o la superficie, donde se realiza la excitación y/o la detección a una longitud de onda cercana a una resonancia de plasmón de la partícula funcionalizada y/o la superficie. La presencia/concentración del analito se puede determinar determinando cambios en la radiación óptica detectada. La excitación de los portadores de carga libre se puede realizar por excitación con luz óptica de una fuente de luz con un ancho de línea superior a 5 nm o de un diodo superluminescente.

En algunas realizaciones, la presencia/concentración del analito se puede determinar a partir de cambios en una distribución de localizaciones de partículas, un cambio del área de un patrón de localizaciones, o un cambio de los tamaños de paso entre localizaciones de partículas.

- 5 En algunas realizaciones, la presencia/concentración del analito se puede determinar realizando un procesamiento de histograma y/o un histograma para suprimir el ruido de fondo y mejorar la especificidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 **La FIG. 1** es una ilustración esquemática de los componentes básicos de una técnica de biodetección de partículas ancladas, según una realización de la invención.

Las FIGS. 2A-B son una ilustración esquemática de los estados no unido y unido de una técnica de biodetección de partículas ancladas, según una realización de la invención.

15

Las FIGS. 3A-B son una ilustración esquemática de los estados no unido y unido de una técnica de biodetección de partículas ancladas, según una realización de la invención.

- 20 **Las FIGS. 4A-B** son una ilustración esquemática de los estados no unido y unido de una técnica de biodetección de partículas ancladas.

La FIG. 5 es un diagrama esquemático de un sistema para detectar la presencia de un analito diana utilizando la excitación óptica y la detección de los cambios de resonancia de plasmón en nanopartículas ancladas, según una realización de la presente invención.

25

Las FIGS. 6A-B ilustre dos implementaciones de un método combinado de microscopía y espectroscopia, según las realizaciones de la presente invención.

- 30 **La FIG. 7** es un gráfico de la tasa de unión media frente a la concentración de analito según una ley de potencia, según una realización de la presente invención.

Las FIGS. 8A-B muestran un diagrama esquemático de una partícula anclada no unida y un gráfico de las posiciones del plano x-y de la partícula anclada no unida durante un periodo de muestreo, respectivamente.

- 35 **Las FIGS. 8C-D** muestran un diagrama esquemático de una partícula anclada unida y un gráfico de las posiciones del plano x-y de la partícula anclada unida durante un periodo de muestreo, respectivamente.

La FIG. 9A muestra un aparato de biodetección para medir el movimiento de partículas, según una realización de la invención.

40

La FIG. 9B muestra una serie de imágenes de posiciones de partículas que se analizan para determinar patrones de movimiento de partículas, según una realización de la invención.

- 45 **La FIG. 10** muestra una secuencia de patrones de movimiento de una partícula que indica transiciones entre un estado no unido y dos estados unidos, según una realización de la invención.

La FIG. 11A muestra un gráfico de la función (o área) escalonada con respecto al tiempo, que indica dos umbrales utilizados para detectar cambios entre estados unidos y no unidos, según una realización de la invención.

- 50 **La FIG. 11B** muestra el casco convexo asociado con una colección de puntos de posición para diferentes ventanas de tiempo, según una realización de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 55 Las realizaciones de la presente invención están motivadas por varias ideas relacionadas con el diseño de biosensores para aplicaciones in vivo: (i) es beneficioso usar partículas debido a sus opciones de detectabilidad, estabilidad y biofuncionalización, (ii) es beneficioso usar partículas ancladas en lugar de partículas no unidas, y (iii) puede ser beneficioso que la funcionalidad de anclaje y la funcionalidad de unión están separadas en la técnica de biodetección.

- 60 Según realizaciones de la presente invención, se proporciona una técnica de partículas ancladas en la que la interacción de la partícula con la superficie desempeña un papel central. La función del anclaje es mantener la partícula cerca de la superficie, y es una medida de la interacción modulada por la diana entre la partícula y la superficie que

produce información de detección biológica.

Los componentes básicos de una técnica de biodetección según una realización de la invención se ilustran en la FIG.

1. Un dispositivo biosensor tiene una superficie 100 expuesta a una matriz que contiene un analito diana 110. Una molécula de anclaje 102 está unida en un primer extremo a la superficie 100 y unida en un segundo extremo a una partícula 104 funcionalizada con un resto 106. La superficie 100 está funcionalizada con otro resto 108. Como alternativa, cualquier resto 106 o resto 108 puede conjugarse con el anclaje. La funcionalización de ambos restos se selecciona de manera que el analito diana 110 se unirá con ellos. La conjugación y el enlace de los restos a la partícula y al sustrato se realizan de tal manera que los restos tienen actividad de unión biológica específica del analito. Las FIGS. 2A-B ilustran dos estados del sistema de la FIG. 1, que dependen de la presencia del analito diana 110. En el estado que se muestra en la FIG. 2A, el analito 110 no está presente y la partícula anclada 104 es libre de moverse, con la limitación del anclaje. En el estado que se muestra en la FIG. 2B, el analito 110 está presente, y se une al resto 106 y 108, dando como resultado la unión de la partícula anclada 104 a la superficie 100. En consecuencia, el movimiento de la partícula funcionalizada 104 cambia entre un estado unido y un estado no unido, dependiendo de la presencia del analito 110. En caso de que el resto 106 o el resto 108 esté conjugado con el anclaje, entonces la unión del analito 110 a los restos 106 y 108 cambia el movimiento de la partícula funcionalizada 104, entre un estado con más libertad de movimiento (denominado "no unido", o "partícula no unida a la superficie") y un estado con menos libertad de movimiento (denominado "unido" o "partícula unida a la superficie").
- En una implementación de ejemplo de esta realización, los analitos diana 110 con dos epítomos pueden medirse con anticuerpos o fragmentos de los mismos acoplados a la partícula 104 y al sustrato 100. Como alternativa, la detección de anticuerpos se puede permitir cuando el resto 106 y el resto 108 representan epítomos específicos del anticuerpo (por ejemplo, epítomos peptídicos, mimítomos) o proteínas nativas, de manera que el anticuerpo pueda formar un complejo de tipo sándwich (FIG. 2B) por la unión de sus dos dominios de unión a antígeno al resto 106 y al resto 108. Como alternativa, la unión del par molecular (resto 106 y resto 108) puede inducirse por un analito (como la unión de metal entre dos dominios de unión a metal, o el reclutamiento de cofactores inducido por ligando en los dominios de unión a ligando del receptor nuclear).

- Otra realización de la invención se ilustra en las FIGS. 3A-B. En esta realización, el resto 106 y el resto 108 se seleccionan para unirse entre sí cuando el analito diana 110 no está presente, como se muestra en la FIG. 3A, de manera que la partícula anclada 104 esté en un estado unido. En presencia del analito diana, el resto 106 y el resto 108 no se unen entre sí, debido a la unión preferencial con el analito en su lugar, como se muestra en la FIG. 3B, de manera que la partícula anclada 104 esté en un estado no unido. El resto 106 y el resto 108 pueden ser una molécula de unión a analito y un análogo de analito. En una implementación de ejemplo de esta realización, los analitos diana 110 con un epítomo pueden medirse, por ejemplo, con al menos una molécula de captura específica en la partícula y un análogo de diana en el sustrato, o viceversa.

- Según otra divulgación mostrada en las FIGS. 4A-B, el resto 106 no está incluido. En esta realización, el analito diana 110 induce cambios en el impedimento estérico de la partícula 104. En el estado que se muestra en la FIG. 4A, donde el analito no está presente, la partícula anclada 104 se encuentra en un estado menos obstaculizado. En el estado mostrado en la FIG. 4B, la partícula anclada 104 se encuentra en un estado más obstaculizado, como resultado de la unión del analito 110 al resto 108. En una variación de esta descripción, el resto 108 no está incluido y el resto 106 está incluido en su lugar, siendo de otro modo el principio operativo el mismo.

- En una implementación de ejemplo de esta divulgación, los analitos diana 110 pueden medirse mediante un impedimento estérico, donde la unión de la diana a la partícula y/o el sustrato cambia el parámetro de espacio al que puede acceder la partícula.

- En cualquiera de los casos desvelados, la detección de un analito también se puede realizar indirectamente a través de una cascada de reacciones intermedias. Por ejemplo, una enzima reacciona con el analito y genera un producto, que reacciona con un resto bioquímico en la partícula y/o la superficie del sustrato y, por lo tanto, cambia un parámetro de coordenadas del sistema coloido-partícula molecular-anclaje-superficie. En el contexto de la presente descripción, la detección de un analito puede ser directa o indirecta, y en el caso de una detección indirecta, el producto generado por el analito desempeña el papel del analito que se detecta.

- Generalmente, en un dispositivo de biodetección para la detección de analito en un fluido u otra matriz según realizaciones de la invención como se define en la reivindicación 8, el dispositivo incluye al menos dos objetos (es decir, superficie y partícula, donde la superficie también puede incorporarse como una partícula) conectados por al menos un anclaje. El anclaje mantiene los dos objetos juntos, lo que es ventajoso para la frecuencia de encuentro y la concentración eficaz, y para la detección óptica precisa.

La partícula tiene preferiblemente una dimensión más larga menor de 5 micrómetros. Más preferiblemente, el diámetro

de partícula está en el intervalo entre 3 nm y 5 µm. Las partículas preferidas tienen fuertes propiedades ópticas, tales como, por ejemplo, nanopartículas de oro con propiedades de resonancia plasmónica, o partículas con fuertes propiedades de fluorescencia o dispersión. Ejemplos de materiales de partículas adecuados son materiales orgánicos (por ejemplo, polímero), materiales inorgánicos (por ejemplo, sílice), metales (por ejemplo, oro), o combinaciones de los mismos.

Las ventajas de usar partículas incluyen estabilidad y señales ópticas altas. Al menos uno de los dos objetos está dotado de al menos un resto bioquímico en su superficie. Los restos bioquímicos dan especificidad bioquímica a los objetos.

10 Durante el funcionamiento, un parámetro de coordenadas se mide representativo de la posición relativa de los dos objetos entre sí. Sin pérdida de generalidad, las realizaciones se pueden describir en el marco de reposo de un objeto (es decir, la superficie), mientras que el otro objeto (es decir, la partícula) se describe como en movimiento. La superficie también puede ser una superficie curva, convexa o cóncava, por ejemplo, la superficie de una partícula. El analito, cuando está presente, se une a uno o ambos de los dos objetos, alterando los posibles movimientos de la partícula anclada. En consecuencia, una propiedad del parámetro de coordenadas espaciales cambia en presencia del analito. Por lo tanto, la presencia y/o concentración de analito se determina a partir de un cambio medido de la propiedad del parámetro de coordenadas.

20 El parámetro de coordenadas espaciales puede ser, por ejemplo, la posición de la partícula en el espacio (xyz), la orientación de la partícula con respecto a la superficie, y/o sus dependencias de tiempo, incluyendo sus derivadas de tiempo, tal como la velocidad angular de la partícula y la velocidad lineal de la partícula. Una propiedad del parámetro de coordenadas puede ser, por ejemplo, una propiedad de la función de distribución espacial y/o de velocidad. Preferiblemente, un parámetro de coordenadas y un cambio del parámetro de coordenadas de los al menos dos objetos entre sí se miden ópticamente.

Preferiblemente, la detección se realiza con una resolución de partícula única, para poder medir independientemente el comportamiento dependiente del tiempo de las diferentes partículas. Esto permitirá realizar un procesamiento de señal en partículas independientes (por ejemplo, para hacer histogramas de estados unidos y no unidos) y aplicar algoritmos de filtrado (por ejemplo, para separar la unión específica y no específica) con estadísticas altas. La resolución de una sola molécula permite una alta sensibilidad y detección de bajas concentraciones. Cuando se alcanza el límite fundamental de una sola molécula, se recopilan entonces los datos máximos del proceso de unión y/o conversión molecular, lo que proporciona estadísticas óptimas y precisión óptima.

35 Preferiblemente, el dispositivo incluye una serie de partículas ancladas en la misma superficie, para recopilar estadísticas y, por lo tanto, mejorar la fiabilidad, la sensibilidad y la velocidad.

Las realizaciones también pueden incluir recubrimientos antiincrustantes, biosensores de gel, una capa de neutralización, función de filtrado, una capa de permeación selectiva, multiplexación espacial, multiplexación basada en partículas, calibración, controles, posibilidades de detección óptica. Las realizaciones pueden incluir medidas para bloquear y reducir procesos no deseados, y para aumentar la eficiencia, la estabilidad y la selectividad de la generación de señales.

Las realizaciones de la invención permitirán el sondeo en tiempo real de las concentraciones de analito en fluidos complejos (por ejemplo, sangre, saliva, fluido cutáneo intersticial). La resolución de una sola molécula debe ser alcanzable, para determinar una alta sensibilidad analítica. Además, se puede alcanzar una alta especificidad aislando interacciones específicas de las no específicas. Esto puede permitir una serie directa de mediciones en tiempo real en fluidos complejos, idealmente sin tomar muestras repetidas o etapas de filtrado intermedias.

50 Una ventaja importante del biosensor propuesto es que se basa en la afinidad bioquímica, lo que lo hace genérico y permite una amplia diversidad de ensayos posibles.

En una implementación específica, el sistema de detección se puede usar para realizar una monitorización continua del analito, tal como la monitorización de la glucosa, por ejemplo, en un formato competitivo con una proteína de unión a la glucosa en la partícula o en el sustrato (por ejemplo, una apo-glucosa oxidasa, o una proteína de transporte periplásmico, u otra molécula de unión a la glucosa).

Las aplicaciones comerciales de la invención incluyen biodetección in vivo, pero también biodetección in vitro. Las realizaciones de la invención se pueden aplicar en el desarrollo de las próximas generaciones de biosensores basados en marcadores de partículas y que tienen resolución de partícula única y de molécula única.

Como alternativa, el dispositivo sensor puede ser parte de un sistema de retroalimentación durante un procedimiento

médico, por ejemplo, un sensor en o en un endoscopio, un tubo, una aguja, una fibra, un catéter, un parche.

La técnica de biodetección también es relevante para las pruebas de diagnóstico in vitro, particularmente para las pruebas en el punto de atención, donde es ventajoso si un proceso de unión molecular específico conduce a una señal
5 que se puede detectar por medios ópticos, con algo más de procesamiento químico/bioquímico/fluido.

En otro caso desvelado, la tecnología de detección se utiliza para aplicaciones in vivo, ex vivo o in vitro. En otro caso desvelado, la tecnología de detección se utiliza para aplicaciones en sujetos humanos o en sujetos no humanos, por ejemplo, en aplicaciones veterinarias o para probar otros sistemas biológicos. En otro caso desvelado, la tecnología
10 de detección es parte de una sonda desechable que está en contacto con el sujeto o con el sistema biológico.

En otro caso desvelado, la tecnología de detección implica un cartucho desechable, por ejemplo, un cartucho de laboratorio en un chip, o un producto desechable utilizado en pruebas basadas en laboratorio, u otro desechable tal como un tubo, una aguja, una fibra, un catéter, un parche. En otro ejemplo desvelado, el producto desechable o la
15 sonda o el cartucho están fijados a un instrumento o un analizador para alimentar y/o activar y/o leer el producto desechable, la sonda o el cartucho. En otro caso desvelado, el instrumento es adecuado para procesar señales de la sonda o cartucho, y/o para comunicar datos entre el instrumento y la sonda o cartucho, y/o para comunicar datos entre el instrumento y, por ejemplo, un sistema de información o red de comunicación.

20 El sistema de detección puede ser parte de un sistema de manejo de enfermedades, que puede incluir detección (bio)química y/o física, un sistema para la recopilación y procesamiento de datos, y un sistema para la actuación física y/o (bio)química. El sistema se puede conectar en un formato de bucle cerrado con un sistema de tratamiento, por ejemplo, un dispositivo que dosifica un fármaco (por ejemplo, insulina en el caso de diabetes) o un dispositivo que de otra manera influye en el cuerpo (por ejemplo, un dispositivo que proporciona un órgano con una estimulación física,
25 por ejemplo, eléctrica).

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que ilustra un dispositivo y una técnica para la excitación óptica y la detección de parámetros de coordenadas espaciales de partículas ancladas 500 cuyas características de movimiento espacial cambian entre un estado no unido 500 y un estado unido 504 en respuesta a la presencia de un analito diana.
30

El dispositivo puede representar diferentes configuraciones, por ejemplo, (i) partículas plasmónicas ancladas a un sustrato, por lo que la resonancia de plasmón de las partículas cambia en función de un parámetro de coordinación con respecto al sustrato, o (ii) partículas dispersas ancladas a partículas plasmónicas que se unen rígidamente a un sustrato, por lo que la resonancia de plasmón cambia dependiendo de la coordinación de la partícula de dispersión
35 con respecto a la partícula plasmónica. Además, una partícula plasmónica anclada a una partícula plasmónica es una posible implementación, donde las resonancias de plasmón cambian dependiendo de los cambios de coordenadas espaciales entre las dos partículas.

A continuación, se describen los datos para la unión de anticuerpos a nanorods plasmónicos unidos a un sustrato de vidrio, donde la unión de anticuerpos cambia la resonancia de plasmón de los nanorods. Los datos son ilustrativos de cómo se pueden registrar los eventos de unión única (ya sea de anticuerpos, o de otras partículas libres en solución, o de partículas ancladas) y cuántos sensores se pueden monitorizar en paralelo en el tiempo.
40

Las partículas ancladas 500 se inmovilizan sobre cubreobjetos en una celda de flujo 508. Un haz de iluminación 510 de un láser 512 experimenta una reflexión interna total en la pared de la célula 508 y excita los plasmones en la partícula 500. Una señal de dispersión óptica 514 de la nanopartícula anclada se dirige a un detector óptico 516, donde aparece contra un fondo oscuro, lo que garantiza una alta relación señal-ruido. Los cambios de plasmón darán como resultado cambios en la intensidad de la señal detectada. Un procesador 518 analiza las señales del detector 516 para determinar los parámetros de coordenadas espaciales de las partículas 500 que son indicativos de la presencia del
50 analito diana.

El detector 516 puede ser un dispositivo de acoplamiento de carga de multiplicación de electrones (EM-CCD) que puede representar muchas partículas individuales ancladas. Como alternativa, para alcanzar tiempos de integración de microsegundos, la intensidad dispersada de una sola partícula anclada puede proyectarse en un fotodiodo
55 analógico.

La técnica de biodetección de analitos permite la detección sensible de concentraciones objetivo extremadamente pequeñas. Tiene una sensibilidad significativa al permitir la detección de una sola molécula. La selectividad es significativamente más alta que los métodos promediados por conjuntos porque la resolución de una sola molécula
60 permite la discriminación entre interacciones específicas (fuertes, de larga duración) y no específicas (débiles, de corta duración) en base a cada molécula.

Las realizaciones de la presente divulgación pueden usar técnicas de espectroscopia de dispersión de campo oscuro. Específicamente, puede usar técnicas que usan una fuente de luz brillante de baja coherencia temporal, preferiblemente con un ancho de línea superior a 5 nm (por ejemplo, diodo superluminescente) para medir dinámicamente los cambios en el pico de resonancia de plasmón de las partículas plasmónicas.

5 La mayoría de los métodos de detección para dispersar objetos, tales como nanopartículas metálicas, utilizan iluminación de campo oscuro para obtener una imagen en la que el objeto tiene una mayor intensidad que el fondo. Para partículas pequeñas (<100 nm de diámetro para el oro), la señal de dispersión se reduce a medida que la sexta potencia del radio y se ve rápidamente desbordada por el fondo. Por lo tanto, la obtención de imágenes de objetos
10 más pequeños requiere una alta irradiancia para obtener suficiente señal.

La obtención de imágenes y/o la espectroscopia de objetos de dispersión se realizan usualmente con una fuente de luz blanca *no coherente* (banda ancha de emisión >1000 nm). Permite obtener imágenes de objetos de dispersión contra un fondo homogéneo y bajo, y se puede utilizar para extraer un espectro de dispersión de banda ancha
15 mediante la determinación de la señal de dispersión en muchas longitudes de onda diferentes utilizando el mismo iluminador. Las fuentes comúnmente empleadas son lámparas incandescentes (por ejemplo, halógenas) o fuentes de descarga de arco (por ejemplo, xenón). La principal desventaja de estas fuentes es su área de emisión extendida (>1 mm²), que no permite un enfoque estrecho del haz para lograr una alta irradiancia de la muestra.

20 Una forma de superar esto es mediante el uso de una banda estrecha y una fuente de luz *coherente*, tal como un láser. La alta coherencia y el bajo ancho de banda (típicamente <1 nm) permiten que el enfoque estrecho del haz logre una alta irradiancia de la muestra. Sin embargo, la irradiación con láser coherente tiene limitaciones porque (1) las franjas de interferencia causan un patrón de iluminación no homogéneo y (2) las pequeñas reflexiones espurias y la fuga de luz en la configuración óptica causan artefactos de fondo en la imagen. Dichos artefactos reducen
25 significativamente la relación señal-ruido y pueden fluctuar en el tiempo debido a las vibraciones y las variaciones térmicas de la configuración óptica.

En dichas aplicaciones de biodetección, se sabe que las fuentes de luz blanca o los láseres son útiles para medir los cambios espectrales. Las fuentes de luz blanca muestran una amplitud espectral B mucho mayor que el ancho de la
30 línea Γ de una nanopartícula (es decir, $B \gg \Gamma$), y por lo tanto, permite la medición de todo el espectro a la vez utilizando un espectrómetro. Después, los desplazamientos del espectro se extraen mediante el análisis de los espectros posteriores. Por otro lado, los cambios espectrales también se miden utilizando una fuente que es mucho más estrecha que el ancho de línea de la partícula, por ejemplo, un láser ($B \ll \Gamma$). La señal dispersada dependiente del tiempo cambiará cuando el espectro del objeto cambie. Sin embargo, debido a que los diodos superluminescentes (SLD)
35 presentan una amplitud espectral que es similar al ancho de línea de las nanopartículas (es decir, $B \sim \Gamma$), el uso de SLD para mediciones de cambio espectral dinámico en nanopartículas es inesperado. La tomografía de coherencia óptica también utiliza SLD para la iluminación, pero no hay intención de medir los cambios espectrales de la muestra. Aunque se usan partículas con diferentes resonancias de plasmón, la longitud de onda de resonancia es fija y no cambia con el tiempo. Por lo tanto, la medición del comportamiento dinámico de los plasmones con un SLD es
40 inesperada porque no es intuitivo elegir una fuente de luz que tenga un ancho de banda solo un poco más estrecho que el ancho de línea de la resonancia que se sondea.

El ancho de línea de una nanopartícula de metal es típicamente de 40-50 nm. Una fuente de luz blanca, tal como una lámpara halógena, tiene un ancho de línea mucho más amplio que una nanopartícula. Un láser tiene un ancho de línea
45 mucho más estrecho que una nanopartícula, mientras que el ancho de línea de una SLD típica es típicamente de 15 a 30 nm, dependiendo de la longitud de onda de emisión, que es comparable al ancho de línea de una nanopartícula.

Las FIGS. 6A-B ilustran dos implementaciones de un método combinado de microscopía y espectroscopia que utiliza una fuente de luz brillante y de baja coherencia, un diodo superluminescente (SLD) 600, para la obtención de imágenes
50 dependiente del tiempo de los objetos de dispersión 602. En las técnicas de biodetección de realizaciones de la presente invención, la señal dependiente del tiempo representa desplazamientos del pico de resonancia de plasmón del objeto de dispersión indicativo de la presencia de un analito. La longitud de coherencia más corta de la luz SLD 604 en comparación con la luz láser reduce significativamente los artefactos causados por la interferencia, mientras que el brillo de los SLD es similar al de los láseres de diodo comunes.

55 La *baja coherencia* y el ancho de banda intermedio (por ejemplo, 15-30 nm a longitudes de onda de infrarrojo cercano) del haz da como resultado una iluminación homogénea y una baja intensidad de fondo. El alto brillo y la pequeña área de emisión (por ejemplo, menos de 30 μm^2 cuando se acoplan a una fibra de modo único) aseguran una alta irradiancia. La señal de dispersión de un objeto iluminado con un diodo superluminescente es alta en comparación con
60 el fondo y estable en escalas de tiempo cortas, así como largas.

En la **FIG. 6A** el SLD 600 ilumina la muestra 602 bajo un ángulo que excede el ángulo para la reflexión interna total

en una interfaz de vidrio-agua de una celda de líquido 606. En esta implementación, la luz 604 se acopla a la muestra 602 a través de un prisma de vidrio 608. En una implementación alternativa, mostrada en la **FIG. 6B**, la luz 604 está acoplada a la muestra 602 a través de la abertura trasera de una lente de objetivo 610. Dado que la implementación en la **FIG. 6A** separa las trayectorias de luz de excitación y emisión, conduce a un fondo más bajo y una mayor relación señal-ruido que la implementación en la **FIG. 6B**. La implementación en la **FIG. 6B** puede ser útil si el espacio sobre la muestra se va a usar para otros fines, por ejemplo, un componente técnico para la regulación de la temperatura. En ambas implementaciones, debido a que el ángulo de iluminación es más alto que el ángulo para la reflexión interna total en la interfaz de vidrio-agua de la celda 606, se refleja toda la luz de excitación. La presencia de la partícula 602 perturba la reflexión interna total, lo que lleva a una cierta intensidad de luz dispersada 612 que el objetivo recoge parcialmente y se envía a un sensor de imágenes 614. El haz reflejado está bloqueado por un bloque de haz, y la luz dispersada restante se envía a un detector de imágenes 614, preferiblemente una cámara con suficiente rango dinámico y sensibilidad de longitud de onda para lograr una resolución de una sola molécula. En otra realización, la muestra 602 se puede montar en una sonda óptica (por ejemplo, fibra óptica o una guía de onda) para permitir que las mediciones se realicen directamente en entornos biológicos complejos. Las señales del detector 614 se analizan entonces por un procesador 616 para determinar la presencia del analito diana.

El ensayo puede implicar, por ejemplo, un ensayo de unión, un ensayo competitivo, un ensayo de desplazamiento, un ensayo en sándwich, un ensayo enzimático, un ensayo con amplificación de señal y/o diana, un ensayo de múltiples etapas, un ensayo con cascada molecular, etc. El ensayo puede implicar grupos de reconocimiento de diferentes naturalezas, por ejemplo, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc. Las realizaciones pueden incluir varios métodos de calibración, controles, multiplexación, etc. Las realizaciones pueden incluir medidas para bloquear y reducir procesos no deseados (por ejemplo, procesos inespecíficos que generan señales de fondo) y para aumentar la eficiencia, la estabilidad y la selectividad de la generación de señales.

Los casos de la presente divulgación incluyen un sistema y una técnica para biodetectar un analito en una matriz utilizando una gran colección de detectores a nanoescala cuyas propiedades ópticas se alteran individualmente en presencia de un analito. En casos preferidos, por ejemplo, un biosensor plasmónico basado en cientos de nanopartículas ancladas de oro individuales con sensibilidad de una sola molécula se monitoriza simultáneamente en tiempo real dentro de una configuración de microscopía de campo oscuro.

Un biosensor plasmónico puede incluir cientos de nanopartículas ancladas de oro individuales con sensibilidad de una sola molécula que se monitorizan simultáneamente en tiempo real dentro de una configuración de microscopía de campo oscuro. El enfoque permite el análisis estadístico de interacciones de una sola molécula sin requerir ningún etiquetado del analito. La distribución del tiempo de espera depende de la concentración y obedece a las estadísticas de Poisson. En una realización, la capacidad de sondear cientos de nanopartículas proporciona simultáneamente un sensor con un rango dinámico de 7 décadas de concentración y permitirá el estudio de la heterogeneidad en las interacciones moleculares.

La detección de una sola molécula tiene distintas ventajas sobre las técnicas promediadas por conjuntos porque produce distribuciones estadísticas de propiedades moleculares en lugar de promedios, y revela eventos raros y no sincronizados. Los casos preferidos de la divulgación incluyen técnicas para monitorizar cientos de nanopartículas ancladas plasmónicas de una sola molécula en tiempo real utilizando excitación de reflexión interna total en una disposición de microscopio estándar.

En una implementación de las realizaciones mostradas en las **FIGS. 6A-B**, el diodo superluminiscente es un Superlum, con una longitud de onda central de 795 nm, ancho de banda de 14 nm, potencia máxima de 35 mW. El detector 614 es un dispositivo de carga acoplada (CCD), por ejemplo, con un área de 50 x 50 μm^2 en la superficie de muestra.

La densidad de las partículas en el sustrato se puede controlar mediante la concentración durante el recubrimiento por centrifugación para producir 150-250 partículas en un campo de visión de 100 x 100 μm^2 del microscopio. Cada sitio de partículas presenta una intensidad dispersada diferente causada por (a) la inevitable dispersión en el volumen de partículas y la relación de aspecto que conduce a una sección transversal de dispersión diferente en la longitud de onda de irradiación, y (b) una orientación diferente de cada partícula en el campo evanescente parcialmente polarizado. Para asegurarse de que la técnica sondea nanorods individuales, se registran los espectros de dispersión de luz blanca de todas las partículas. Menos del 10% de las partículas se encuentran en grupos, que se descartan en el análisis.

El uso de un diodo superluminiscente (SLD) como fuente de luz es importante para lograr una relación señal-ruido (S/N) suficiente. La mala coherencia espacial de la luz de una lámpara incandescente proporcionó una intensidad insuficiente para obtener imágenes de las partículas pequeñas, mientras que la alta coherencia temporal de la iluminación con láser dio como resultado artefactos de interferencia que inducen las fluctuaciones de la señal. Los SLD son dispositivos semiconductores de alta ganancia que generan una emisión espontánea amplificada. En esta

aplicación, la baja coherencia temporal del SLD redujo significativamente los artefactos de interferencia, mientras que la alta coherencia espacial aseguró una alta intensidad de iluminación. Esto dio lugar a señales limitadas de ruido de disparo para un tiempo de integración de 100 ms.

5 En un experimento típico de una sola molécula, se pasa un analito a la celda de flujo utilizando una bomba de jeringa. La cámara CCD se usa para registrar la señal dispersada dependiente del tiempo (determinada por un ajuste gaussiano bidimensional de cada punto en cada cuadro). Los cambios de plasmón asociados con los cambios en el movimiento de las nanopartículas ancladas se observan entonces como cambios escalonados en la intensidad dispersada normalizada en función del tiempo mediante un algoritmo de búsqueda de pasos. Los cambios
10 escalonados en la señal indican la unión estocástica de anticuerpos individuales (concentración de anticuerpos 10 nM). El signo de los cambios escalonados depende de la longitud de onda del plasmón en relación con la longitud de onda de la fuente de irradiación. La magnitud de los pasos varía del 1 % al 5 %, indicando la variación de los tamaños de paso las diferencias de posición y orientación. El signo de la señal causada por la unión del analito depende de la longitud de onda del plasmón en relación con la longitud de onda del SLD. Para partículas con una longitud de onda de plasmón más corta que la longitud de onda del SLD, el desplazamiento al rojo del plasmón provoca un aumento en la señal dispersada, mientras que las partículas con una longitud de onda de plasmón más larga que la longitud de onda del SLD exhiben el comportamiento opuesto. Una fracción de las partículas no muestra cambios escalonados de la señal porque la longitud de onda del plasmón está cerca de la longitud de onda del SLD. Por esa razón, el análisis puede excluir partículas con una resonancia de plasmón entre 775 nm y 815 nm. También puede excluir pasos con
15 una S/N <2 (definida como la relación entre el tamaño de paso y la desviación estándar de la señal antes de la inyección del analito) que se atribuye a la deriva del fondo o los analitos que se unen a la superficie del vidrio cerca de las partículas.

A partir del ajuste del hallazgo de los pasos a los datos, el procesador puede estimar un valor para τ , el tiempo de
25 espera medio entre los pasos. La distribución de los tiempos de espera obedece a las estadísticas de Poisson, con una tasa de unión media que depende de la concentración del analito según una ley de potencia, como se muestra en el gráfico de la **FIG. 7**.

La intensidad dispersada detectada se obtiene ajustando el punto limitado por difracción de una partícula en cada
30 cuadro con un gaussiano bidimensional. La S/N (definida como la relación entre la media y la desviación estándar de la señal durante 150 segundos) aumenta para partículas más brillantes. La S/N se aproxima al límite de ruido de disparo con un exceso de ruido que probablemente sea causado por las fluctuaciones de la intensidad del SLD y la ligera desviación mecánica de la muestra. A partir de estas mediciones, se llega a la conclusión de que se pueden detectar cambios de señal escalonados del 1 % con una S/N de 3-5 para partículas con una intensidad integrada
35 superior a 10^5 recuentos/s.

La precisión con la que se puede determinar la concentración de un analito está limitada por las estadísticas de recuento. Por ejemplo, al menos 100 moléculas deben detectarse en una ventana de tiempo definida para tener una precisión de concentración-determinación de aproximadamente $1/\sqrt{100} = 10\%$. Las partículas pequeñas tienen un
40 número limitado de moléculas receptoras en su superficie, por lo que una partícula individual puede capturar solo un número limitado de moléculas de analito. Además, en el límite de una concentración de analito muy baja, existe una alta probabilidad de que una sola partícula no haya capturado ni una sola molécula de analito, incluso para tiempos de incubación prolongados. Para abordar este problema, un sistema de biodetección según los casos preferidos de la divulgación tiene al menos 100 nanopartículas ancladas, y se registran trazas de tiempo en las partículas individuales.
45 El procesador combina los datos de las partículas para determinar la concentración de un analito. Para una baja concentración de analito, preferiblemente los datos se combinan de al menos 1000 partículas, más preferiblemente al menos 10.000 partículas.

Debido a las variaciones durante el proceso de fabricación de las nanopartículas, pueden tener distintos tamaños
50 variables, dando como resultado propiedades espectrales inconsistentes. Para abordar este problema, es preferible usar partículas con una distribución intrínsecamente estrecha de resonancias de plasmón, por ejemplo, bipirámides de oro. Los inventores han encontrado que el ancho de línea por conjuntos del espectro de extinción de una solución de bipirámides se aproxima al ancho de línea de partícula única de 50 nm, mientras que el ancho de línea por conjuntos de nanorods de oro es típicamente ~ 200 nm. Esto indica que las bipirámides individuales son ópticamente más
55 homogéneas. Para abordar este problema, también es preferible utilizar un sistema de biodetección con múltiples longitudes de onda. Una solución preferida es registrar trazas de tiempo en varias longitudes de onda diferentes, por ejemplo, utilizando un diodo superluminescente ajustable por longitud de onda.

Es ventajoso tener un sistema de biodetección con un alto número de partículas. Sin embargo, en un sistema
60 miniaturizado solo está disponible un área de superficie limitada. Además, la densidad de las partículas en la superficie es limitada, ya que el sistema óptico necesita poder registrar las trazas de tiempo de los objetos individuales. Para abordar este problema, es preferible tener un sistema en el que más de una fracción predeterminada de las partículas

estén separadas de las partículas vecinas más cercanas en al menos el límite de difracción del sistema óptico. Otra forma de abordar este problema es usar un patrón ordenado de partículas en la superficie, en lugar de una distribución aleatoria. Preferiblemente, el patrón de partículas en la superficie es conforme al patrón de píxeles en un chip de cámara digital. Las cámaras digitales suelen tener píxeles rectangulares; para un chip de cámara con píxeles rectangulares, las partículas están preferiblemente situadas en una cuadrícula rectangular. Otra forma de abordar este problema es usar un sistema óptico en el que una sola partícula se asigna a un solo píxel de un chip de cámara digital. Preferiblemente, una sola partícula da una señal en un solo píxel que es al menos 5 veces más alta que la señal en ese píxel causada por partículas vecinas. Otra forma de abordar este problema es usar partículas con diferentes propiedades espectrales, diseñadas de forma alterna en una superficie, con un espacio mínimo por debajo del límite de difracción. Debido a las diferentes propiedades espectrales, se pueden seleccionar subpoblaciones de partículas y se pueden registrar trazas de tiempo en diferentes subpoblaciones con resolución de partícula única, incluso si están separadas por menos de la longitud de difracción.

En una tecnología de biodetección basada en partículas con detección óptica y resolución de una sola partícula, es importante identificar e ignorar los objetos de tipo partícula no deseados que sean fuentes de ruido. Los objetos de tipo partícula de este tipo pueden estar relacionados con la contaminación de muestras o agregados en la muestra, o debido a las propiedades bioquímicas de las partículas de detección (por ejemplo, funcionalización de superficie), propiedades de las partículas (por ejemplo, forma, propiedades ópticas), o configuraciones de partículas con otras partículas (por ejemplo, agregado de múltiples partículas, o partículas múltiples en la proximidad que no pueden resolverse ópticamente). Para abordar este problema, las propiedades espectrales de estas partículas se pueden registrar y comparar con los datos de referencia. Las propiedades espectrales se pueden registrar, por ejemplo, utilizando una fuente de luz de banda ancha y un filtro ajustable, o usando una fuente con longitud de onda ajustable. Las señales espectrales se pueden usar para identificar objetos no fiables causados, por ejemplo, por las propiedades de las partículas (por ejemplo, la forma) o la configuración de las partículas (por ejemplo, grupos de partículas). Las nanopartículas ancladas individuales se caracterizan por un solo espectro de Lorentzian estrecho, lo que permite descartar grupos en función de la forma de la línea y el ancho de línea del espectro. Además, el espectro de dispersión de los grupos de nanopartículas presenta un pico doble o ningún pico claro en absoluto. Estos grupos se pueden distinguir fácilmente de los espectros de partículas individuales y se descartan del análisis de datos.

Otra técnica para abordar este problema es comparar las trazas de tiempo de la señal de objetos individuales con las trazas de tiempo de una pluralidad de otros objetos. Los objetos que tienen características que se desvían fuertemente de una pluralidad de otros objetos pueden ser rechazados, por ejemplo, en función de las características de ruido, la deriva, el tamaño de los pasos, el número de pasos, la señal acumulada durante un largo tiempo, etc.

El rango dinámico del sensor tiene bajos y altos límites de concentración. Las bajas concentraciones de analito limitan las estadísticas porque la tasa de unión es baja. Para concentraciones bajas, la concentración mínima accesible se determina por el número de partículas en un campo de visión. El algoritmo de ajuste gaussiano 2D actualmente requiere una región de interés de 10x10 píxeles para obtener un ajuste preciso para una ampliación de 60x. Las cámaras científicas de gama alta que tienen una resolución de más de 5 megapíxeles tienen un número estimado de partículas de 50 en el campo de visión en condiciones óptimas. La concentración más baja accesible es entonces $c \approx 0,5 \text{ pM}$. Las concentraciones más altas de analito exhiben una mayor velocidad de unión, para lo cual se requiere una mayor velocidad de cuadro (es decir, un tiempo de integración más corto) para resolver todos los eventos de unión de una sola molécula. Basándose en los tiempos de espera distribuidos de Poisson, una velocidad de cuadro de 50/r asegurará que los tiempos cortos en la distribución también se resuelvan. Al aumentar la intensidad del incidente de 64 W/cm^2 a 1 kW/cm^2 el tiempo de integración se reduce a 6 ms con solo una modesta reducción en S/N. La velocidad de cuadro máxima que se puede lograr está limitada fundamentalmente por el calentamiento foto-térmico de las nanopartículas. Para estudios en muestras biológicas, el aumento de temperatura máximo permitido es del orden de 10 K, que se estima que se alcanza para una intensidad incidente de 10 kW/m^2 . Esto implica que se puede lograr una velocidad de cuadro de 20 fps sin inducir daño térmico al analito. Estas velocidades de cuadro tan altas dan acceso a interacciones de baja afinidad o a concentraciones de analitos tan altas como aproximadamente $5 \text{ }\mu\text{M}$.

Las sondas para biodetección con resolución de molécula única (por ejemplo, una nanopartícula de metal, un resonador dieléctrico, un nanoporo de estado sólido) típicamente exhiben un rango dinámico limitado debido al bajo número de sitios de unión por sonda, lo que impide la acumulación de estadísticas suficientes a bajas concentraciones de analito. Esta limitación se supera en las realizaciones de la presente invención mediante el sondeo paralelizado de muchos sensores, lo que proporciona un extraordinario rango dinámico proyectado de 7 décadas de concentración. La capacidad de extraer distribuciones de parámetros de interacción molecular permite la investigación de la heterogeneidad en una población de moléculas sin marcar. El diseño óptico sencillo y barato permite que el sensor se implemente fácilmente con un microscopio.

Las altas concentraciones de analito darán eventos de unión con una alta tasa de unión. Esto hace que resulte complicado resolver eventos de enlace individuales en trazas de tiempo medidas. Además, las interacciones de baja

afinidad pueden dar lugar a estados de corta duración que son difíciles de resolver. Para abordar este problema, es preferible utilizar un sistema óptico con una alta velocidad de cuadro. Preferiblemente, la velocidad de cuadro o el tiempo de integración recíproca es superior a 100 s^{-1} , más preferiblemente superior a 1000 s^{-1} .

5 La temperatura de las partículas es crucial porque la estructura y la actividad de la proteína pueden verse afectadas cuando se calienta durante largos periodos de tiempo. La mayoría de las proteínas globulares exhiben una temperatura de fusión que varía de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ dependiendo del pH y las condiciones del tampón. Basándose en un modelo teórico, se estima que es necesaria una intensidad incidente superior a 10 kWcm^{-2} para elevar la temperatura de la partícula en más de 10 K .

10

Se puede lograr una alta relación señal-ruido y una alta tasa de cuadro usando una fuente de luz con alta potencia. Sin embargo, una alta potencia óptica puede dar un aumento de temperatura inaceptable en el fluido de muestra, lo que afecta a los materiales bioquímicos. Para monitorizar este problema potencial, se puede integrar un termómetro óptico con el sistema. Por ejemplo, se puede implementar una cámara sensible a fases, o monitorizar la emisión desplazada en azul de las partículas metálicas. Para mantener una temperatura aceptable, se puede ajustar la potencia incidente.

15

Una deriva de la señal óptica de las partículas debido a los eventos de unión y de no unión complica la observación de las señales. Para abordar este problema, es preferible utilizar una referencia interna para calibrar de manera continua o periódica la señal óptica, por ejemplo, una partícula u otro objeto fiducial con actividad óptica en la superficie, lo que proporciona una señal de dispersión óptica estable, sin propiedades resonantes y sin sensibilidad a la unión molecular. La señal de una partícula de referencia será una referencia óptica para el estado de iluminación y detección del sistema. La señal de referencia se puede usar por el procesador para corregir las fluctuaciones en las señales ópticas de las partículas de biodetección, causadas por la deriva en los componentes del sistema óptico y las fluctuaciones de la intensidad de la fuente de luz. El uso de múltiples partículas de referencia en la superficie mejorará adicionalmente la calibración. Los ejemplos de marcadores de referencia o fiduciales son esferas de poliestireno, estructuras de superficie con nanopatrones, islas PDMS. Las fluctuaciones de señal óptica pueden ser causadas por cambios en la longitud de la trayectoria óptica, por ejemplo, perpendiculares al plano de imagen (eje z). Para abordar este problema, es preferible tener una retroalimentación y control activos del eje z en el sistema.

30

La multiplexación de analitos, es decir, la medición de diferentes analitos al mismo tiempo, es ventajosa para una mayor sensibilidad y especificidad biomédica. Para proporcionar dicha multiplexación, algunas realizaciones usan partículas que tienen diferentes receptores en su superficie. Por razones de estadística y precisión de recuento, el número de partículas debe ser al menos igual a 100 para cada analito, y más alto cuando sea necesario un analito con una tasa de eventos de unión baja (por ejemplo, porque tiene una concentración baja, o debido a la afinidad y densidad de los receptores). La velocidad de cuadro mínima del sistema óptico se determina por el analito con la tasa de eventos de unión (sin unión) más alta. Además, algunas realizaciones utilizan partículas con diferentes propiedades ópticas, de manera que las diferentes partículas pueden mezclarse. Las partículas tienen preferiblemente al menos dos subpoblaciones que pueden distinguirse ópticamente y que tienen diferentes receptores en su superficie. También en este caso, por razones de estadística y precisión de recuento, el número de partículas es preferiblemente de al menos 100 por cada analito, y más alto para un analito con una baja tasa de eventos de unión (por ejemplo, porque tiene una concentración baja, o debido a la afinidad y densidad de los receptores). La velocidad de cuadro mínima del sistema óptico se determina por el analito con la tasa de eventos más alta.

35

40

45 Según algunos casos de la presente divulgación, los sistemas de movimiento de partículas ancladas (TPM) pueden formarse a partir de un anclaje de ADN bicatenario (ADNs) de 50 nm que une una nanopartícula (por ejemplo, microesfera o nanoperla) de radio de 500 nm a un sustrato. En los sistemas de TPM típicos, el movimiento en el plano de esta partícula se rastrea en el tiempo, de manera que se obtiene una proyección bidimensional del movimiento de la perla. Cuando se obtiene una imagen repetida de tal perla dentro de varios intervalos de tiempo consecuentes Δt , el resultado combinado de todos los resultados de imagen en un patrón de movimiento. Una característica distintiva del método de TPM de la presente invención en comparación con los enfoques tradicionales de TPM es el hecho de que el sistema está diseñado para que la partícula pueda unirse a la superficie, por ejemplo, recubriendo tanto la perla como el sustrato con moléculas de unión complementarias. Por lo tanto, la partícula anclada, que tiene un enlace primario al sustrato a través del anclaje, puede formar un enlace secundario con el sustrato. Cuando se forma tal enlace secundario, el patrón de movimiento se altera significativamente y puede cambiar su amplitud y/o simetría. Además, los estados unido y no unido están influenciados por la presencia de un analito diana, de manera que la presencia del analito puede determinarse midiendo los cambios en las propiedades del movimiento de partículas. Los cambios temporales en el patrón de movimiento son indicativos de la presencia del biomarcador o analito que se pretende sondear y, por lo tanto, estos cambios son una medida de la concentración de este biomarcador.

55

60

La FIG. 8A es un diagrama esquemático de una partícula anclada en un estado no unido, mientras que la FIG. 8C es un diagrama esquemático de una partícula anclada en un estado unido. Como se muestra en el gráfico de la FIG. 8B,

donde cada punto corresponde a una posición de la partícula en el plano x-y de la superficie, la partícula anclada no unida durante un periodo de muestreo tiene una distribución simétrica alrededor del eje central (el centro del círculo). Como se muestra en el gráfico de la FIG. 8D, la partícula anclada unida durante un periodo de muestreo tiene una distribución asimétrica alrededor del eje central (el centro del círculo).

5

Los casos de la divulgación pueden usar generalmente cualquiera de los diversos tipos de polímeros (anclaje) con un extremo unido a una superficie (sustrato) y con el otro extremo que está unido a una perla (partícula) libre de otro modo. Los anclajes pueden ser, por ejemplo, ADN bicatenario, ADN monocatenario o ARN, o un polipéptido, u otro polímero. Sin embargo, cualquier polímero, o incluso cualquier macromolécula, que sea capaz de unir una partícula a una superficie, podría en principio usarse para el TPM. Preferiblemente, los sistemas de TPM de la presente divulgación usan ADN bicatenario (ADNs) que tiene una longitud de persistencia de aproximadamente 50 nm.

10

Un anclaje más largo tiene la ventaja de que las diferencias de movimiento entre los estados unido y no unido de la partícula son grandes (lo que facilita la discriminación entre los estados unido y no unido), y que se sondea una amplia área de interacción entre la partícula y la superficie (por lo que se hace un uso más eficaz del área de superficie biofuncionalizada). Un anclaje más corto tiene la ventaja de que la tasa de interacción (tasa de éxito, concentración eficaz) entre la partícula y el área de superficie es alta. Las longitudes de anclaje útiles están en el rango entre unos pocos nanómetros y unos pocos micrómetros, por ejemplo, de 5 nm a 10 micrómetros.

15

Con el fin de observar el movimiento de partículas ancladas en escalas de tiempo experimentales, el tamaño de la partícula es preferiblemente menor de unos pocos micrómetros. Se pueden usar varios tipos de partículas, incluidas partículas metálicas (por ejemplo, oro), partículas de material orgánico o inorgánico, partículas de poliestireno y fluoroesferas. Comparando partículas metálicas con partículas de poliestireno, una ventaja de las partículas metálicas es la fuerte dispersión de la luz. Por otro lado, las partículas de poliestireno se utilizan con frecuencia en experimentos de pinzas ópticas y permiten el control magnético de la partícula cuando se incluye un núcleo magnético.

20

Una partícula más grande tiene la ventaja de una mayor señal óptica y un menor desenfoque de movimiento (por lo tanto, una mayor precisión de localización). Una partícula más pequeña tiene la ventaja de una mayor difusividad y un movimiento más rápido, para una mayor tasa de interacción entre la partícula y la superficie, y de manera que el cambio en la movilidad debido a un enlace mediado por analitos tenga una mayor resolución de tiempo. Los tamaños de partículas útiles están en el rango de entre unos pocos nanómetros y unos pocos micrómetros, por ejemplo, de 5 nm a 10 micrómetros.

30

En realizaciones preferidas, la posición de la partícula se rastrea mediante microscopía de campo oscuro, lo que da como resultado datos de las coordenadas del centro de la partícula de X e Y en paralelo al sustrato, es decir, el movimiento proyectado bidimensional de la perla. En algunas realizaciones, la coordenada Z de la partícula también se puede rastrear, por ejemplo, usando señales de difracción.

35

En algunas realizaciones, se usan partículas magnéticas que consisten en una matriz de polímero con muchos granos pequeños de óxido de hierro magnético (Fe_2O_3). Las partículas magnéticas se pueden activar con un imán y se pueden detectar con microscopía de luz estándar.

40

En una realización, los parámetros utilizados para caracterizar la dinámica del sistema son la autocorrelación del vector en el plano $\vec{R}(t)$ que describe las posiciones de la partícula,

45

$$\langle \vec{R}(t) \cdot \vec{R}(t + \tau) \rangle$$

El tiempo característico time τ_1 se define como el tiempo correspondiente a la función de autocorrelación del vector en el plano $\vec{R}(t)$ que describe las posiciones de la cuenta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el valor para τ_1 es $(0,09 \pm 0,01)$ s, o más generalmente, τ_1 puede estar en el intervalo de 0,1 - 0,3 s.

50

Los restos de unión que se pueden usar en el biosensor son, por ejemplo, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas recombinantes, sacáridos, polímeros impresos molecularmente, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, ADN, aptámeros, aglutinantes multivalentes, y combinaciones de los mismos.

55

Los restos de unión están acoplados a las partículas y a la superficie, preferiblemente en la región en la que interactúan los dos objetos, es decir, en áreas donde la partícula y la superficie tienen una tasa de acierto diferente de cero. Los restos pueden colocarse cerca o más lejos de los puntos de sujeción de anclaje. El cambio de patrón de movimiento entre no unido y unido depende de la ubicación donde tiene lugar la unión. Por ejemplo, una unión entre parches en los dos puntos de unión de anclaje respectivos da un pequeño patrón de movimiento centrado, mientras que una unión entre parches en la periferia de las áreas de interacción en la partícula y el sustrato dan un patrón de movimiento descentrado. En caso de que el resto 108 esté conjugado en el anclaje (ya sea en el extremo de la superficie del

60

anclaje, o en otra parte del anclaje) y el resto 106 esté conjugado con la partícula (véanse los números en la FIG. 1), entonces una unión entre 106 y 108 puede dar un patrón de movimiento centrado alrededor del punto donde el anclaje está unido a la superficie, ahora con un tamaño más pequeño que el patrón de movimiento de partículas en ausencia de unión entre estos restos, que se refiere a un acortamiento de la longitud eficaz del anclaje. En el caso de que el
 5 resto 106 esté conjugado en el anclaje (ya sea en el extremo de la partícula del anclaje, o en otra parte del anclaje), y 108 esté conjugado con la superficie, entonces una unión entre 106 y 108 puede dar un patrón de movimiento centrado, pero también un patrón de movimiento descentrado, dependiendo de la posición del resto 108 en la superficie. Por lo tanto, el patrón en el estado unido está influenciado por la ubicación de los aglutinantes en la partícula y en el sustrato, y por la ubicación donde se une el analito. Por lo tanto, puede ser ventajoso tener una tabla de búsqueda con posibles
 10 patrones de movimiento unido y relacionar un patrón de movimiento medido con los datos en la tabla de búsqueda, para detectar con buena sensibilidad la aparición de la unión de partículas.

La densidad óptima de los restos de unión en la partícula y el sustrato depende del tipo de ensayo y de la concentración del analito. Por ejemplo, en un ensayo en sándwich con concentraciones de analito muy bajas, es beneficioso tener
 15 una alta densidad de restos de unión en partículas y sustrato, para tener una buena cinética y una buena sensibilidad. Una alta densidad puede ser, por ejemplo, entre 10^3 y 10^5 restos/ μm^2 . En un ensayo competitivo, al menos uno de los restos de unión respectivos debe tener una densidad de superficie baja para evitar una unión multivalente demasiado fuerte entre la partícula y la superficie, de lo contrario las moléculas de analito no pueden desplazar eficazmente las uniones para poner la partícula en un estado no unido. Una forma de tener un sistema en el que uno de los restos de
 20 unión está presente en números bajos, es una realización donde el resto 106 o el resto 108 se conjugan con el anclaje. El número de restos en el anclaje puede controlarse bien mediante métodos de preparación química, y por ejemplo, puede controlarse para tener solo un resto de unión por anclaje, lo que puede ser ventajoso en un ensayo competitivo.

El espacio entre las partículas en la superficie debe ser lo suficientemente grande como para que las partículas no se
 25 impidan el movimiento de las demás, y lo suficientemente grande para que las partículas puedan detectarse de manera independiente entre sí, y lo suficientemente pequeñas para que se pueda ajustar un gran número de partículas en la superficie de detección para estadísticas óptimas.

Según los casos de la divulgación, la preparación del biosensor se puede dividir en varias etapas. Una primera etapa
 30 es limpiar la muestra esencial. Durante la segunda etapa se funcionalizan la superficie y las partículas. Una tercera etapa es acoplar las partículas funcionalizadas a la superficie funcionalizada. Una cuarta etapa puede ser conservar la superficie para un uso posterior, por ejemplo, recubriendo la superficie con un revestimiento protector que contenga azúcar u otro recubrimiento hidrófilo que se disuelva cuando se añada líquido al sensor. Como alternativa, la superficie del sensor puede estar recubierta con un hidrogel que protege los restos bioquímicos y pasa el analito cuando el
 35 sensor está en contacto con una muestra de fluido. Existen muchos más métodos y procedimientos para preparar un dispositivo de biosensor, que se conocen bien en la técnica.

Los sistemas de biodetección según la presente invención se pueden usar para aplicaciones in vitro, o para
 40 aplicaciones in vivo, o muy generalmente para pruebas del cuerpo humano. Puede usarse como parte de un dispositivo médico tal como un catéter, un parche, un tubo, una aguja, una fibra, un clip, un cable. Puede usarse para respaldar el tratamiento médico, o como parte de un dispositivo para monitorización en o sobre el cuerpo. Se puede utilizar en un formato desechable, tal como un cartucho, un tubo, una placa de titulación.

En aplicaciones in vivo, las sondas pueden estar en interacción con el sistema biológico a través de un módulo de filtro
 45 (por ejemplo, un recubrimiento que pasa el analito de interés y dificulta el paso de otros componentes) y/o a través de un material que garantiza la biocompatibilidad y el buen funcionamiento mientras está en contacto con el sistema en vivo.

Las realizaciones pueden incluir diversas características adicionales, incluyendo diversas formas de multiplexación,
 50 por ejemplo, multiplexación de analitos, multiplexación espacial, multiplexación espectroscópica, multiplexación de la funcionalidad de la sonda. Las realizaciones pueden incluir paralelización de sondas, para estadísticas o para rango dinámico (por ejemplo, diferentes funcionalizaciones de sonda, multiplexadas en posición y/o en propiedad óptica). Los ejemplos de la divulgación pueden incluir diversos recubrimientos de sondas, coberturas de sondas, diversas formas y materiales para incrustar y ubicar la sonda en una matriz, componentes de separación de analitos,
 55 componentes de separación de células, por especificidad y/o sensibilidad, lo cual es particularmente importante en sistemas biológicos complejos.

Los casos de la divulgación pueden incluir un analizador o un instrumento de lectura, que envía excitación al sensor
 (por ejemplo, óptico, eléctrico, acústico) y/o recibe señales del sensor y realiza el procesamiento de la señal. El
 60 analizador también se puede utilizar para transmitir señales a otros instrumentos y/o a sistemas remotos de comunicación, procesamiento y/o almacenamiento.

En un caso específico de la divulgación, el biosensor se basa en cientos o miles de partículas individuales, con sensibilidad de una sola partícula y una sola molécula, que se monitorizan simultáneamente en tiempo real dentro de una configuración de microscopía de campo oscuro. La técnica permite el análisis estadístico de interacciones de una sola molécula sin requerir ningún etiquetado del analito. La capacidad de sondear cientos de nanopartículas simultáneamente proporciona un sensor con un amplio rango dinámico. El biosensor es parte de un sistema de biodetección que supera las limitaciones en la técnica anterior al monitorizar muchos sensores de partículas individuales en tiempo real.

Adquisición de datos

10 Para obtener información sobre el movimiento de las partículas en los ensayos, se realiza un seguimiento del movimiento de las partículas. Las partículas se forman preferiblemente, pero no necesariamente, con microscopía óptica de campo oscuro.

15 Los datos de imagen de cámara sin procesar se procesan en los patrones de movimiento de todas las partículas en el campo de visión. Por ejemplo, al calcular la raíz cuadrada de la longitud de los vectores propios de la matriz de covarianza del patrón de movimiento, se determina la desviación estándar de los puntos de datos a lo largo del eje menor y el eje mayor. La simetría del patrón de movimiento se define como la relación de la amplitud menor sobre la amplitud mayor. La amplitud de movimiento menor y la simetría del patrón de movimiento pueden usarse para ordenar los patrones de movimiento y para rastrear el comportamiento de las partículas en función del tiempo. Se realiza un procesamiento adicional de los datos para revelar el número de eventos de unión y de no unión, y de ello se deduce la concentración de analito.

En la FIG. 9A se ilustra un aparato para medir el movimiento de partículas según una realización. Las partículas 900 están ancladas a un sustrato mediante un anclaje de ADN de 40 nm 902. Los anclajes moleculares están funcionalizados en un extremo con biotina para unirse a estreptavidina 901 que está recubierta en las partículas 900, y en el otro extremo con rojo Texas 906 para unirse a los anticuerpos anti-rojo Texas acoplados a la superficie 904. El movimiento de partículas se registra en una disposición de microscopía de campo oscuro, con una fuente de luz blanca 908 y una cámara CCD 910. El aparato de formación de imágenes incluye un bloque de haz 912 y lentes 914, 916, 918. Las imágenes capturadas por la cámara 910 son analizadas por el procesador 911. Una serie de imágenes 920 se recopilan, como se muestra en la FIG. 9B, y se analizan para ubicar partículas en cada cuadro. El patrón de movimiento correspondiente se construye como un gráfico de puntos 922.

El anclaje corto 902 mantiene la partícula 900 cerca del sustrato 905 y, por lo tanto, garantiza un muestreo de alta frecuencia de la interacción partícula-sustrato. A través del análisis de los gráficos de puntos de partículas 922, se pueden resolver una diversidad de patrones de movimiento con una precisión de localización de unos pocos nanómetros. Los patrones de movimiento desviados están asociados con variaciones en el número y la orientación de los anclajes, la rugosidad de las partículas y las uniones entre la partícula y la superficie.

40 Como ejemplo concreto ilustrativo, ahora se describe una implementación específica. Para proporcionar el sustrato funcionalizado 905, se limpiaron los bordes de las cubiertas de vidrio (Menzel-Gläser, Alemania) mediante sonicación durante 5 minutos en acetona, alcohol isopropílico y baños de metanol. Los sustratos se secaron entre cada etapa utilizando una corriente suave de nitrógeno y se almacenaron al vacío en un desecador hasta su uso. Se unieron células fluidas (Grace Biolabs) con un volumen de 23 μ l al sustrato funcionalizado utilizando una capa adhesiva. La funcionalización del sustrato se realizó por fisisorción de anticuerpos anti-rojo Texas con respecto al vidrio. Los anticuerpos se diluyeron en PBS a la concentración deseada (8-5000 ng/ml) y se incubaron durante 60 minutos en la célula fluida, seguido de un bloqueo del sustrato utilizando una incubación de 5 minutos de BSA al 1 % en peso en PBS. Las células fluidas se lavaron con 1 ml de PBS después de cada etapa de incubación.

50 Para proporcionar la funcionalización de partículas con ADN, se incubaron partículas superparamagnéticas recubiertas con estreptavidina (Estreptavidina C1 MyOne, Life Technologies) con ADN de 120 pb en una relación de 10 a 2000 ADN de 120 pb por partícula. El ADN bicatenario de 120 pb de longitud con una molécula de biotina en un extremo y una molécula de colorante rojo Texas en el otro extremo se han obtenido comercialmente de Ella Biotech (Martinsried, Alemania). La concentración de partículas durante la incubación de 60 minutos fue de 8,3 pM en tampón PBS. El resto de biotina en el ADN se une a las moléculas de estreptavidina durante la incubación. Se determinó que la eficiencia de esta reacción de acoplamiento era aproximadamente del 70 % mediante un ensayo de sobrenadante. El ensayo de sobrenadante cuantifica la concentración de ADN no unido en el sobrenadante de reacción utilizando la señal fluorescente del colorante de intercalación de ADN SYBRGreen (véanse los datos complementarios para obtener más detalles). Después de la separación magnética, las partículas se lavaron en PBS y finalmente se suspendieron en BSA al 1 % en peso en PBS hasta una concentración final de 140 fM.

Las partículas funcionalizadas con ADN se unieron al sustrato recubierto con anticuerpo incubando las partículas

diluidas en las células fluidas durante 5 minutos. Los extremos rojo Texas de los anclajes de ADN se unen a los anticuerpos rojo Texas en el sustrato y crean el sistema de partícula-anclaje-sustrato como se ilustra en la figura 1a. La muestra se puso boca abajo y se almacenó durante 10-30 minutos para eliminar las partículas no unidas del sustrato mediante sedimentación.

5

Se funcionalizaron partículas de poliestireno liso (PS) con un diámetro de 500 nm (Microparticle GmbH, Alemania) con anticuerpos contra la biotina. Las partículas se funcionalizaron con ADNds de 120 pb utilizando el mismo protocolo que para las partículas de MyOne (véase anteriormente). La sedimentación de las partículas de PS es más lenta porque la densidad de la masa es menor y el diámetro es menor que el de las partículas de MyOne. Por lo tanto, se usó un tiempo de incubación de 15 minutos para las partículas de PS.

10

Las muestras se estudiaron en un microscopio Nikon Ti-E invertido (Nikon Instruments Europe BV, Países Bajos) como se ilustra en la FIG. 9A. Las partículas se observaron con un aumento total de 200x y se iluminaron utilizando un condensador de campo oscuro; las partículas aparecen como puntos brillantes en un fondo de baja intensidad. Un campo de visión (FOV) de 415 x 415 μm^2 puede contener entre unos pocos y varios miles de partículas. Las partículas se registraron durante 60 segundos a una frecuencia de muestreo de 30 Hz, como se ilustra en la FIG. 9B.

15

En el procesamiento posterior por el procesador 911, la luz de fondo se eliminó utilizando un filtro de frecuencia basado en ondículas de paso bajo. La ubicación de las partículas individuales se determinó calculando el centro de intensidad de los puntos de luz dispersos. Otras posibles técnicas de procesamiento incluyen, por ejemplo, filtrado de Fourier, ondícula y umbral. Las ubicaciones de las partículas en los cuadros posteriores se correlacionaron para producir las trayectorias $\vec{X}(t)$. La posición absoluta promedio \bar{X}_i se restó para cada partícula para producir las trayectorias relativas $\vec{x}_i(t)$.

20

Una ligera deriva de la muestra se produce durante los experimentos en el microscopio. La deriva de la muestra se corrigió identificando una población de partículas estáticas que sirvieron como referencia. Las partículas estáticas se definieron como partículas con trayectorias de movimiento similares identificadas aplicando un umbral p en la diferencia máxima en las trayectorias relativas $\max_i |\vec{x}_i(t) - \vec{x}_j(t)| < p$ para todos $i \neq j$. El umbral p se eligió para

minimizar el error estimado inducido por la corrección de la deriva: $\sigma_{error} \propto p / \sqrt{N(p)}$ donde $N(p)$ es el número de

30

partículas clasificadas como estáticas para el umbral seleccionado. La deriva de la muestra se determinó a partir del movimiento promedio de estas partículas estáticas y se aplicó un filtro de ondícula de paso bajo para suprimir el ruido de alta frecuencia y las contribuciones de movimiento browniano. Las trayectorias determinadas a partir de los datos sin procesar se corrigieron entonces para la deriva de la muestra observada.

Se determinó que la precisión de posicionamiento era inferior a 3 nm para las partículas magnéticas de 1 μm . Se espera que la precisión de posicionamiento de las partículas de PS sea muy similar ya que las señales de dispersión óptica de las partículas magnéticas y de PS son comparables.

35

La figura 10 ilustra una secuencia de distintos patrones de movimiento dependientes del tiempo de una partícula. La figura muestra un gráfico de dispersión de posición acumulativa para una partícula que alterna entre un patrón de movimiento de disco y patrones de movimiento de múltiples bandas. La figura muestra ocho intervalos de tiempo consecutivos. En cada cuadro, los puntos recién recopilados se indican en color gris, y los puntos recopilados previamente en color negro. La partícula se observa inicialmente en el cuadro 1 para mostrar un patrón de disco que indica un estado no unido de la partícula. El patrón de bandas en el cuadro 2 indica un estado en el que la partícula está unida a la superficie en una primera ubicación, y la banda con orientación diferente en el cuadro 3 indica un estado en el que la partícula está unida a la superficie en una segunda ubicación. Estos estados unidos y no unidos se acumulan en los cuadros posteriores 4, 5, 6, 7, 8. Este experimento demuestra que las transiciones se pueden medir entre diferentes estados de unión de partícula y superficie. Los estados son reversibles y repetibles. Los estados indican la presencia de uniones secundarias, además del anclaje primario.

50

Las partículas de interés son aquellas que muestran cambios en el patrón de movimiento y corresponden a un tipo de movimiento cambiante en el transcurso del tiempo. Al analizar el movimiento de estas partículas, se puede determinar el lapso de tiempo en que una partícula se encuentra en el estado unido o en el estado libre. Ahora se proporciona una descripción de dos métodos para analizar el movimiento dependiente del tiempo: la función de tamaño de paso y la función de área.

55

El tamaño de paso se puede usar para cuantificar el movimiento difusivo de la partícula anclada. Específicamente, el movimiento difusivo se determina al calcular la distancia absoluta a la que viaja una partícula anclada en un cierto intervalo de tiempo, el tamaño de paso. El tamaño de paso se calcula como Tamaño de paso (t) = $|r(t+\Delta t) - r(t)|$, donde

r es un vector. El tamaño de paso en función del tiempo muestra una cantidad significativa de variación, un aspecto intrínseco del movimiento browniano. El resultado es una amplia distribución de tamaños de paso. La cantidad de variación en el tamaño de paso se puede suprimir promediando el tamaño de paso durante una ventana de tiempo determinada y desplazando esta ventana a lo largo del eje de tiempo. Los descensos en el tamaño de paso indican un evento de enlace. Para disminuir la cantidad de fluctuaciones en los datos de tamaño de paso, el tamaño de paso se promedia en una ventana. Para cuantificar las fluctuaciones, se calcula la desviación estándar del tamaño de paso en cada ventana. Al aumentar el tamaño de la ventana, la cantidad de fluctuaciones disminuye según lo esperado. Sin embargo, aumentar el tamaño de la ventana también conduce a una disminución en la resolución temporal. Por lo tanto, existe una compensación entre la cantidad de fluctuaciones estadísticas y la resolución temporal. La ventana de tiempo promedio preferida depende, por ejemplo, del tamaño de la partícula. Por ejemplo, para una partícula de 1 micrómetro de diámetro, es preferible un tamaño de ventana promedio de 0,1-10 s.

Para aumentar el contraste entre el tamaño de paso de la partícula en el estado libre y el estado unido, se varía el intervalo de tiempo en el que se calcula el tamaño de paso. En el estado unido, el movimiento no está limitado por el intervalo de tiempo en el que se calcula el tamaño de paso, sino que está limitado por el confinamiento de la libertad de movimiento debido al enlace molecular. Un contraste en el tamaño de paso se define como el tamaño de paso promedio en el estado libre dividido por el tamaño de paso promedio en el estado unido, en función del intervalo de tiempo Δt . El contraste aumenta en función de Δt , pero la resolución temporal disminuirá con Δt . El contraste convergerá a un valor máximo, ya que la partícula en estado libre está limitada por el anclaje.

Cuando una partícula está en el estado unido, el movimiento de una partícula está más fuertemente confinado en comparación con el movimiento de una partícula en estado libre. Tanto el tamaño de paso de la partícula como el área que la partícula sondea disminuyen en el estado unido. Para representar el área que sondea una partícula en función del tiempo, se calcula la envolvente convexa para una ventana de desplazamiento, como se muestra en la FIG. 11B. Esto se denomina la función de área. La función de área se puede calcular para un rango de tamaños de ventana. A medida que el tamaño de ventana aumenta de una fracción de segundo a varios segundos, el área se calcula sobre más puntos de datos y la función de área en el estado libre aumenta. Sin embargo, cuando el sistema está en el estado unido, el área aumenta significativamente menos. Esto se debe a que en el estado unido se requiere menos tiempo para que la partícula pruebe su espacio de fase disponible. Por lo tanto, calcular el área durante un tiempo más largo del que necesita el sistema para sondear el espacio de fase no conducirá a un área más grande. Para el estado libre, el sistema aún se encuentra en el régimen donde la partícula sondea un área más grande al aumentar el tamaño de ventana. El contraste entre el estado libre y el estado unido aumenta en función del tamaño de ventana. De nuevo, el efecto secundario de aumentar el tamaño de la ventana está perdiendo la resolución temporal. El mismo tamaño de ventana que el tamaño de paso se puede usar en el algoritmo para distinguir los estados unido y no unido. La FIG. 11B ilustra que un cambio mayor en la función de área está asociado con la adición o eliminación de un punto de datos lejos de los puntos de datos existentes en una ventana. La disminución en el tamaño de paso y el área funcionan cuando una partícula anclada hace que un enlace molecular no siempre sea igual. Esta disminución depende de la posición del enlace molecular con respecto al anclaje.

El objetivo del análisis del movimiento de las partículas es discernir los eventos de unión en el movimiento observado de las partículas ancladas.

Después de haber realizado el análisis de datos sin procesar, se conocen las trayectorias de todas las partículas. De estas trayectorias, las que corresponden a partículas ancladas únicas son de particular interés. La primera etapa es filtrar todos los patrones de movimiento sin interés. Al establecer umbrales tanto en la amplitud menor como en la simetría de los patrones de movimiento, se puede filtrar un gran grupo de patrones de movimiento sin interés. Los umbrales utilizados son preferiblemente los siguientes: simetría $>0,75$ y $50 < \text{amplitud menor} < 175$ nm para un sistema de anclaje corto, y simetría $>0,85$, y $125 < \text{amplitud menor} < 225$ nm para el sistema de anclaje largo. Sin embargo, estos umbrales son solo indicaciones y pueden optimizarse para los sistemas relevantes. Los patrones de movimiento en forma de anillo y campana que cumplen los criterios de selección se pueden descartar, pero esto no es absolutamente necesario.

De cada trayectoria seleccionada, se calcula el estado del sistema de anclaje-partícula en función del tiempo, representado por el vector de estado. El vector de estado se define como una lista de ceros y unos donde uno corresponde al sistema que está en estado unido y un cero corresponde al estado libre. El algoritmo primero calcula una estimación aproximada del vector de estado observando tanto la función de tamaño de paso como la función de área. Con cada función, el movimiento se analiza y el estado del sistema se determina mediante el establecimiento de dos umbrales, un umbral superior y un umbral inferior, como se muestra en la FIG. 11A, que es un gráfico de la función de paso (o área) con respecto al tiempo. Una transición de la función por debajo del umbral inferior se usa para detectar un cambio en el estado de libre a unido, un evento de unión. Una transición de la función por encima del umbral superior se usa para detectar un cambio en el estado de unido a libre, un evento no unido. Se utilizan dos umbrales diferentes de manera que la detección del estado sea menos sensible a las fluctuaciones estadísticas, porque solo se

detectan aumentos o disminuciones muy grandes. Solo en los cuadros donde ambas funciones consideran que el sistema está en estado unido, el vector de estado se establece en uno. Los umbrales superior e inferior para ambas funciones se eligen de modo que el umbral inferior se encuentre en un nivel más alto que el nivel del estado unido y el umbral superior esté aproximadamente 1 sigma por debajo del nivel en el estado libre. Los umbrales son diferentes para los dos sistemas modelo porque las dimensiones de los sistemas son diferentes. El tercer y último paso es determinar el cuadro de inicio y el cuadro final exactos de cada periodo unido.

El sistema también puede estar equipado con un método para aplicar fuerza a las partículas, por ejemplo, basado en la fuerza magnética, la fuerza óptica o la fuerza acústica. La aplicación de fuerza puede ayudar a discriminar entre partículas unidas y no unidas, o para influir en la cinética y/o el equilibrio entre los estados unido y no unido, mejorando así la sensibilidad, especificidad y/o velocidad de biodetección.

Las características descritas en diversos casos separados de la divulgación no son necesariamente exclusivas y, en general, pueden usarse en combinación entre sí. Dichas características y casos también incluyen el material desvelado en Solicitudes de patente provisionales de EE.UU. 62/092751 presentadas el 16/12/2014, 62/092763 presentada el 16/12/2014 y 62/132096 presentada el 12/03/2015

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito mediante el movimiento de partículas ancladas, comprendiendo el método:
- 5 poner una matriz que contiene el analito en contacto con un dispositivo de sensor que tiene una superficie y una molécula de anclaje unida en un primer extremo a la superficie y unida en un segundo extremo a una partícula funcionalizada,
 donde la partícula funcionalizada está funcionalizada con un primer resto y la superficie está funcionalizada con un segundo resto, de manera que la partícula funcionalizada tiene un primer estado en el que la partícula funcionalizada
 10 está unida a la superficie a través del primer resto y el segundo resto, y un segundo estado en el que la partícula funcionalizada no está unida a la superficie a través del primer resto y el segundo resto, donde la partícula funcionalizada cambia entre el primer y el segundo estado dependiendo de la presencia y ausencia del analito, cambiando de este modo las características de movimiento de la partícula funcionalizada dependiendo de la presencia del analito;
- 15 medir un parámetro de coordenadas espaciales de la partícula funcionalizada con respecto a la superficie; y determinar la presencia/concentración del analito a partir de cambios en el parámetro de coordenadas espaciales medido.
2. El método de la reivindicación 1, donde la medición del parámetro de coordenadas espaciales comprende:
 20 iluminar la partícula funcionalizada y/o la superficie;
 detectar radiación óptica de la partícula funcionalizada y/o la superficie;
 determinar a partir de la radiación óptica la posición, orientación y/o la velocidad de la partícula funcionalizada con respecto a la superficie.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, donde la medición del parámetro de coordenadas espaciales comprende:
 excitar portadores de carga libre en la partícula funcionalizada y/o en la superficie;
 detectar radiación óptica de la partícula funcionalizada y/o la superficie;
 30 donde la excitación y/o detección se realiza a una longitud de onda cercana a una resonancia de plasmón de la partícula funcionalizada y/o la superficie;
 donde determinar la presencia/concentración del analito comprende: determinar cambios en la radiación óptica detectada.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, donde determinar la presencia/concentración del analito a partir de cambios en el parámetro de coordenadas espaciales medido comprende determinar la presencia/concentración del analito a partir de cambios en una distribución de localizaciones de partículas, un cambio del área de un patrón de localizaciones, o un cambio de los tamaños de paso entre localizaciones de partículas.
- 40 5. El método de la reivindicación 1, donde la medición del parámetro de coordenadas espaciales comprende iluminar la partícula funcionalizada y/o la superficie a partir de una fuente de luz con un ancho de línea superior a 5 nm o a partir de un diodo superluminiscente.
6. El método de la reivindicación 1, donde la determinación de la presencia/concentración del analito
 45 comprende realizar un histograma y/o procesamiento de histograma para suprimir el ruido de fondo y mejorar la especificidad.
7. El método de la reivindicación 1, donde la medición de un parámetro de coordenadas espaciales de la partícula funcionalizada comprende medir una posición de la partícula, una orientación de la partícula, una velocidad angular de la partícula, o una velocidad lineal de la partícula.
- 50 8. Un biosensor para detectar un analito usando el movimiento de partículas ancladas, que comprende:
 una partícula;
 55 una superficie;
 una molécula de anclaje unida en un primer extremo a la partícula y unida en un segundo extremo a la superficie;
 un primer resto conjugado con la partícula o con la molécula de anclaje;
 un segundo resto conjugado con la superficie o con la molécula de anclaje;
 donde, en caso de que el primer resto esté conjugado con la molécula de anclaje, el segundo resto está conjugado
 60 con la superficie, y en el caso de que el segundo resto esté conjugado con la molécula de anclaje, el primer resto está conjugado con la partícula;
 donde el primer resto y el segundo resto tienen una afinidad de unión entre sí dependiendo de la presencia o ausencia

de un analito diana, o tienen una afinidad de unión al analito diana, por lo que las características de movimiento de la partícula cambian dependiendo de la presencia del analito, permitiendo de este modo detectar el analito midiendo los cambios en un parámetro de coordenadas espaciales de la partícula en relación con la superficie.

- 5 **9.** El biosensor de la reivindicación 8, donde el primer resto se conjuga con la molécula de anclaje en un punto cercano al primer extremo de la molécula de anclaje.
- 10.** El biosensor de la reivindicación 8, donde el segundo resto se conjuga con la molécula de anclaje en un punto cercano al segundo extremo de la molécula de anclaje.
- 10 **11.** El biosensor de la reivindicación 8, donde el biosensor implementa un ensayo de unión, un ensayo competitivo, un ensayo de desplazamiento, un ensayo en sándwich, un ensayo enzimático, un ensayo con amplificación de diana y/o señal, un ensayo de múltiples etapas, o un ensayo con cascada molecular.
- 15 **12.** El biosensor de la reivindicación 8, donde el primer resto o el segundo resto es una proteína, un anticuerpo, un fragmento del mismo, una proteína recombinante, un sacárido, un polímero impreso molecularmente, una molécula pequeña, un ácido nucleico, una molécula de ADN, un aptámero, un aglutinante multivalente, o una combinación de los mismos.
- 20 **13.** El biosensor de la reivindicación 8, donde el primer resto o el segundo resto es una molécula de unión a glucosa.
- 14.** El biosensor de la reivindicación 8, adaptado para realizar multiplexación, multiplexación de analitos, multiplexación espacial, multiplexación en posición, multiplexación basada en partículas, uso de partículas con diferentes propiedades ópticas, uso de múltiples longitudes de onda, multiplexación espectroscópica, multiplexación con partículas que tienen diferentes receptores en su superficie, multiplexación de la funcionalidad de la sonda, uso de diferentes funcionalizaciones de la sonda, uso de diversos recubrimientos de la sonda, uso de diversas coberturas de la sonda, o combinaciones de los mismos.
- 25

Fig. 1

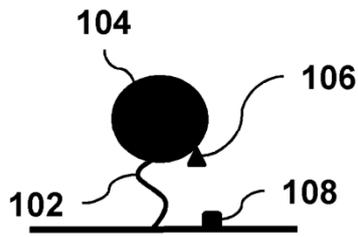
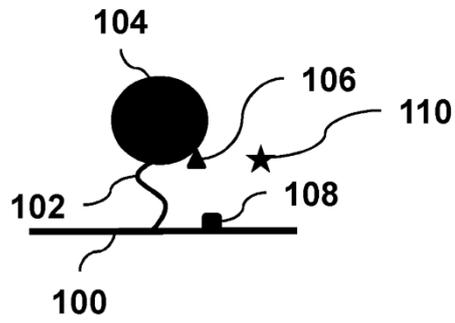


Fig. 2A

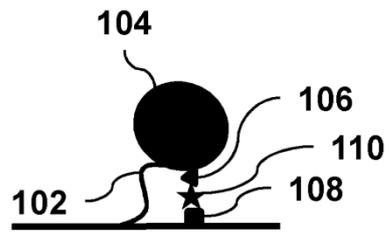


Fig. 2B

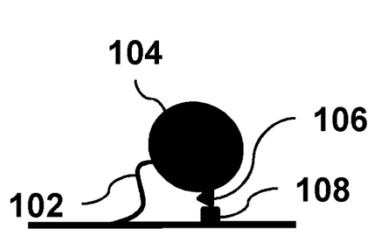


Fig. 3A

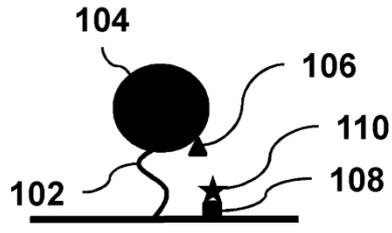


Fig. 3B

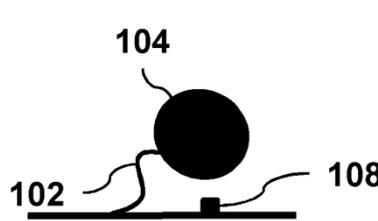


Fig. 4A

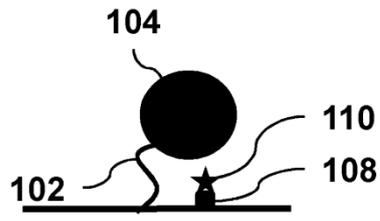


Fig. 4B

Fig. 5

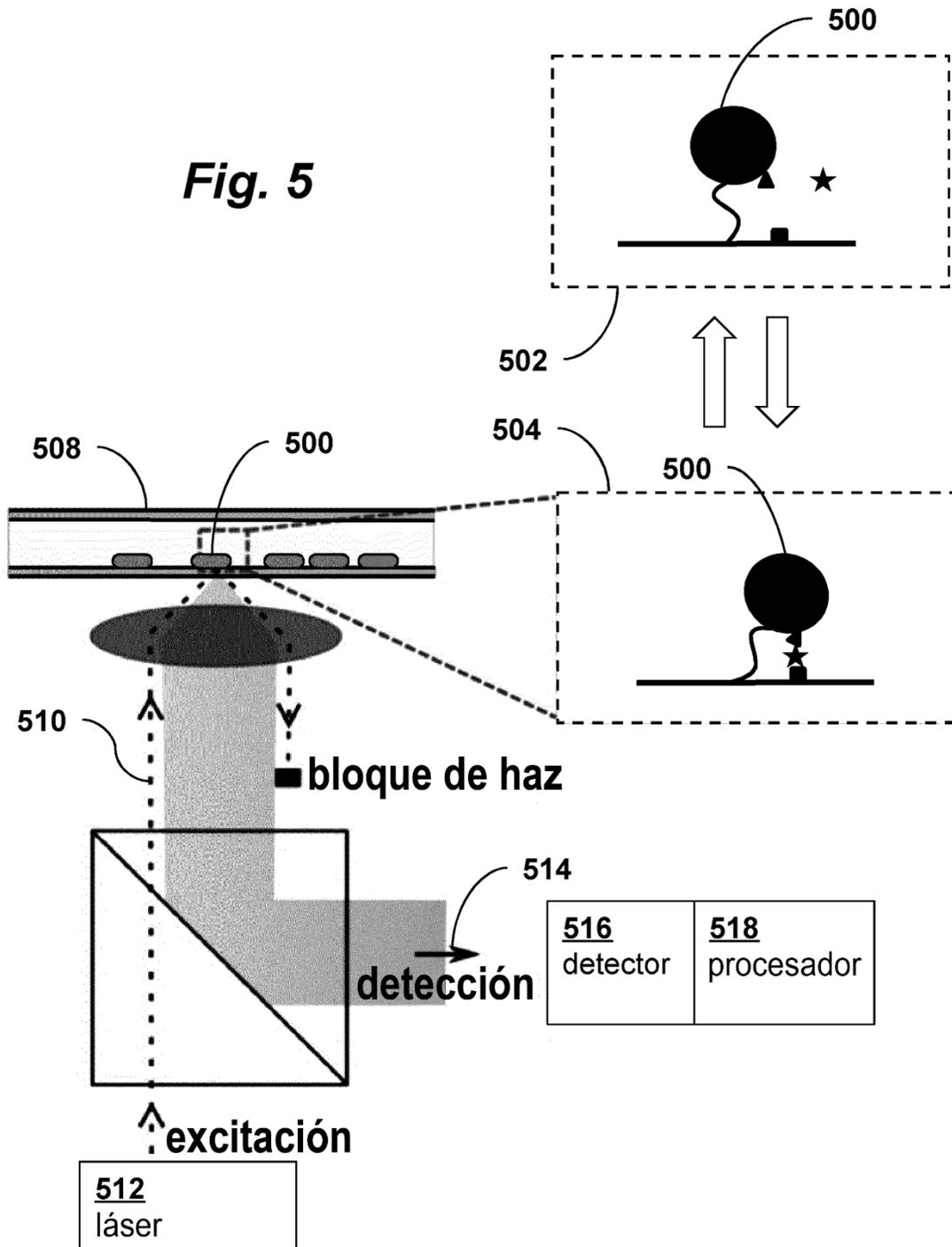


Fig. 6A

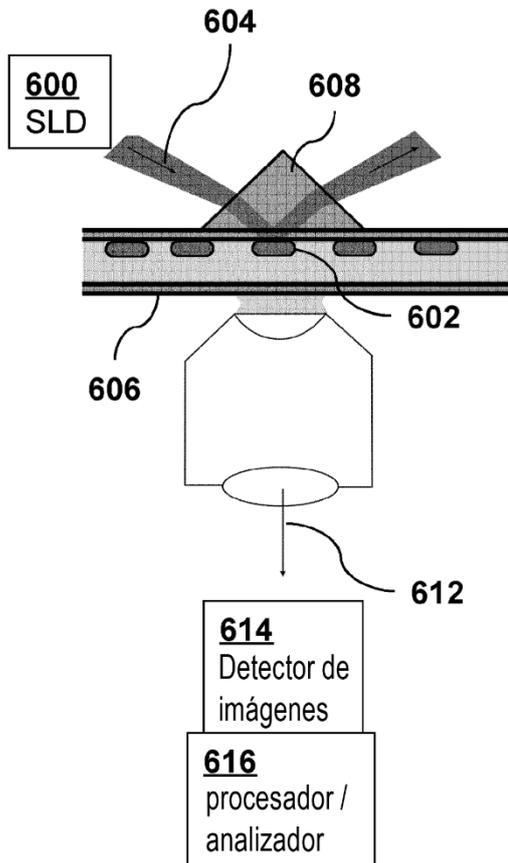


Fig. 6B

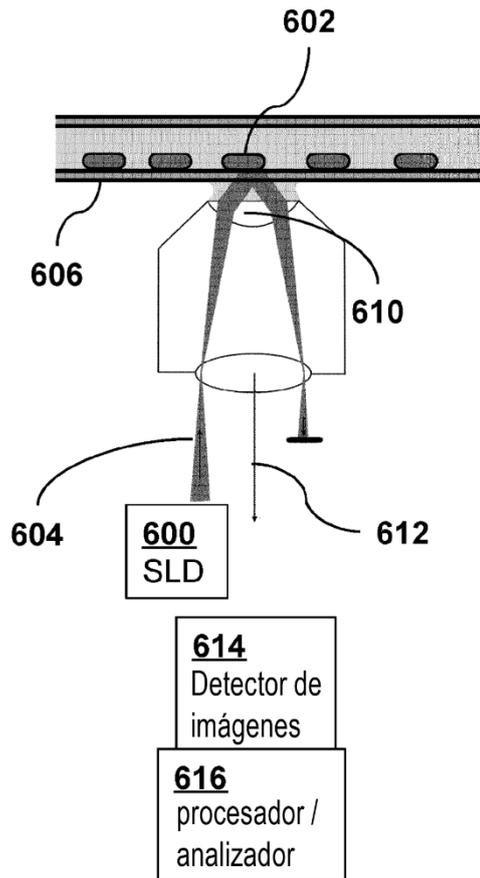


Fig. 7

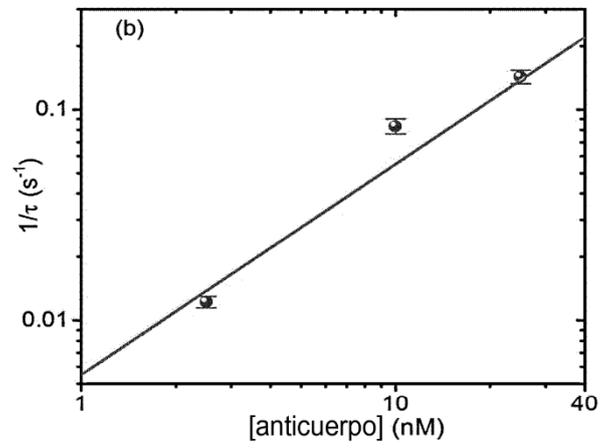


Fig. 8A

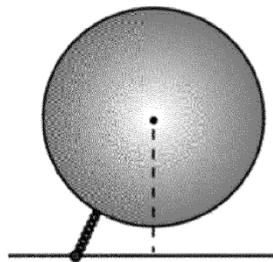


Fig. 8B

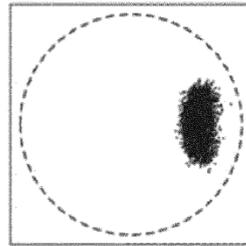
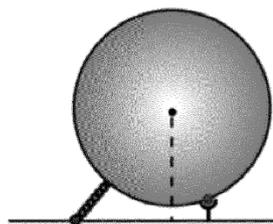
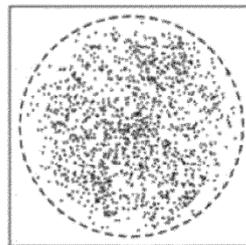


Fig. 8C

Fig. 8D

Fig. 9A

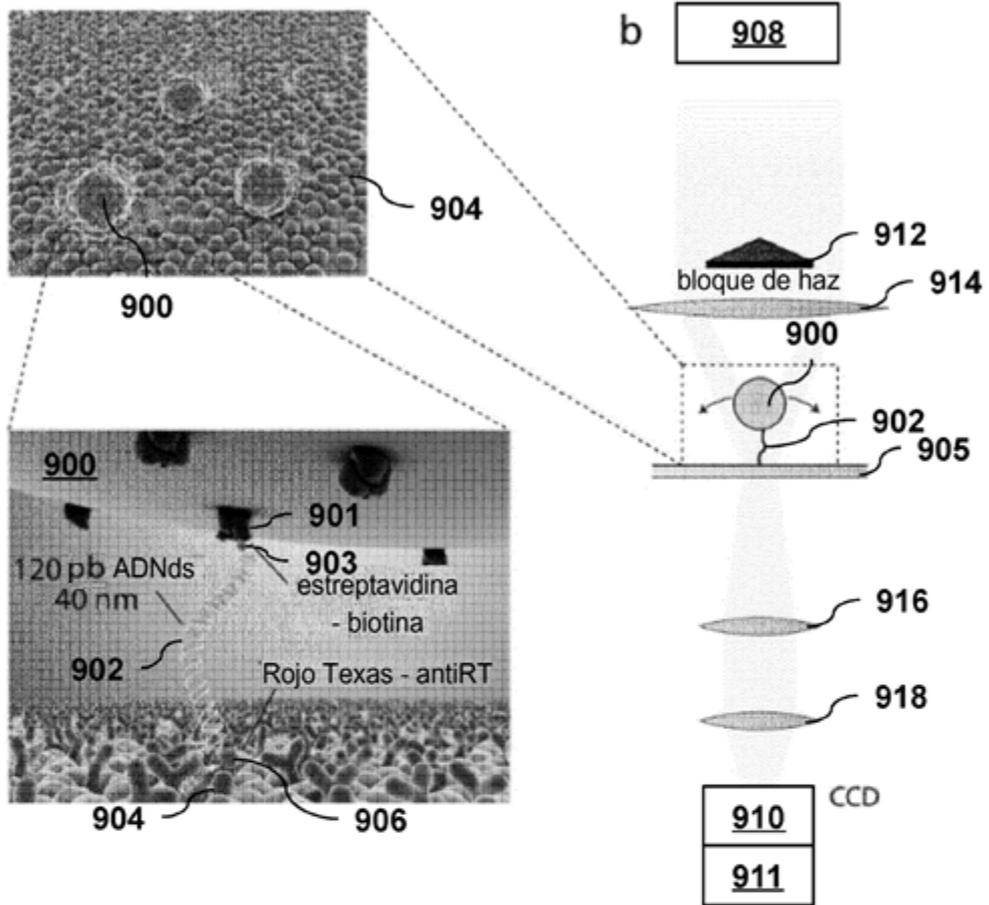


Fig. 9B

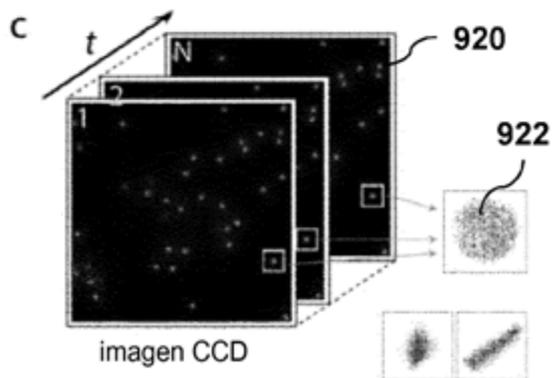


Fig. 10

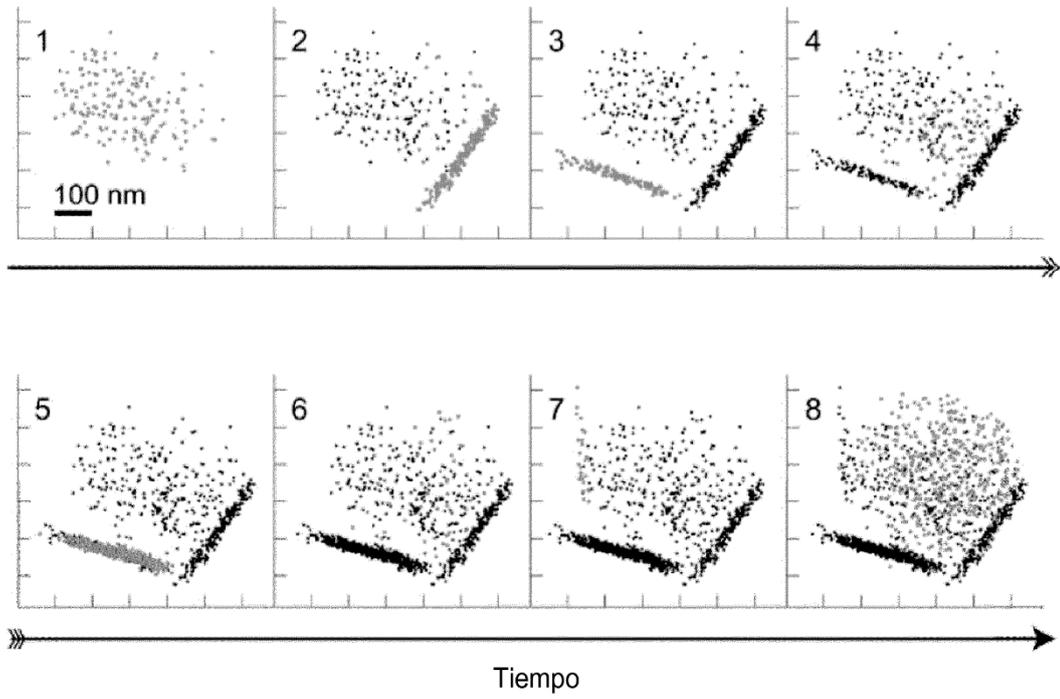


Fig. 11A

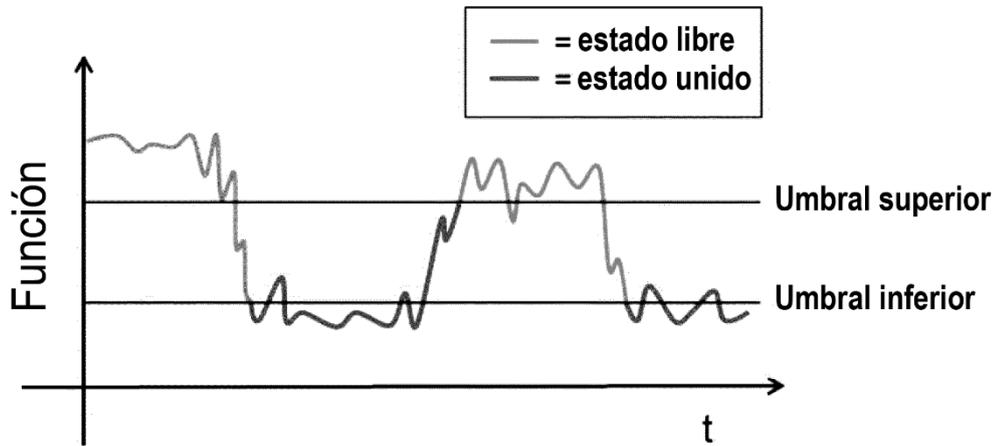


Fig. 11B

