

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 408**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/US2013/049779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13816747 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 2885638**

54 Título: **Redes moleculares**

30 Prioridad:

09.07.2012 US 201261669261 P

09.07.2012 US 201261669265 P

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

26.02.2021

73 Titular/es:

SIENNA CANCER DIAGNOSTICS INC. (100.0%)

1400 Van Buren St. NE 140

Minneapolis, MN 55413, US

72 Inventor/es:

**STEIN, EMILY A. y
EVANS, MICHAEL A.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 808 408 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

Redes moleculares

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de EE. UU. n.º 61/669.261 (depositada el 9 de julio de 2012) y 61/669.265 (depositada el 9 de julio de 2012). Esta solicitud también es una continuación en parte de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 13/511.364 (depositada el 22 de mayo de 2012).

10

10 ANTECEDENTES

A pesar de los avances en la investigación médica, las estrategias de realización de pruebas de diagnóstico usadas actualmente a menudo no son rentables, requieren mucho tiempo, están limitadas en el alcance del antígeno analizado y/o requieren mucho trabajo. Hay una gran necesidad de procedimientos y dispositivos de diagnóstico adicionales capaces de detectar o evaluar la salud o identificar o indicar la presencia de enfermedad o factores causantes de enfermedad en seres humanos y animales.

15

Se necesitan procedimientos de realización de pruebas de diagnóstico para identificar o indicar la presencia de diversas enfermedades, infecciones y afecciones.

20

El sistema inmunitario de los mamíferos reacciona ante agentes extraños tales como organismos y alérgenos a través de numerosas vías de reconocimiento que implican a los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Normalmente, el sistema inmunitario es capaz de limitar o eliminar la infección por un organismo extraño, sin embargo, algunos organismos tienen mecanismos para evadir el sistema inmunitario humano y pueden causar enfermedad, morbilidad y muerte. Similarmente, el sistema inmunitario genera habitualmente una respuesta inmunitaria contra aloinjertos o xenoinjertos en receptores de trasplantes de órganos y tejidos que causa el rechazo del trasplante. Además, en un número creciente de casos, el sistema inmunitario es hiperactivo y reacciona a agentes propios o medioambientales a los que normalmente sería tolerante, lo que causa respuestas autoinmunitarias, asmáticas o alérgicas. Los estados inflamatorios agudos o crónicos antes mencionados causados por infección, enfermedades autoinmunitarias y alérgicas son causas significativas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Las enfermedades infecciosas (EI) son enfermedades que se manifiestan clínica y subclínicamente causadas por la presencia de organismos microbianos, que incluyen bacterias patógenas, hongos, protozoos, parásitos y agentes tales como virus y priones. Las EI son enfermedades contagiosas que se transmiten a través de contacto sexual o casual, los alimentos, el agua y el aire.

25

30

35

Además, las enfermedades infecciosas causan pérdidas significativas a la economía mundial, pero lo que es más importante, representan 16 % de todas las muertes anuales, 55 % de las muertes en niños menores de cinco años y 26 % de las muertes en recién nacidos. Muchas de las EI frecuentes se pueden prevenir en gran medida y son fáciles de tratar una vez identificadas.

Por ejemplo, la identificación rápida de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) es muy deseable, ya que es la causa principal de las infecciones intrahospitalarias (IIH). Hay una necesidad de obtener resultados a tiempo en el cribado de pacientes con SARM en ámbitos clínicos. Las tecnologías actuales que existen para la detección de SARM son la PCR, FISH, el inmunoensayo de flujo lateral, la infección con fagos, la aglutinación en látex o la siembra en placas en medios selectivos para el cribado de muestras de SARM; que requiriendo cada una de ellas horas de incubación y preparación de las muestras. Las limitaciones de las estrategias basadas exclusivamente en ácidos nucleicos (PCR y FISH) son que se han determinado múltiples mutaciones en la región diana, SCCmec, y que la sensibilidad de las pruebas puede ser reducida debido a la baja eficiencia de hibridación de las sondas. Las limitaciones de la siembra en placas tradicional son la baja sensibilidad y el largo tiempo de respuesta. La limitación del ensayo de aglutinación en látex es la ambigüedad de un resultado positivo de la prueba, ya que la prueba se debe leer en un periodo de tiempo corto y no es práctica en muchos ámbitos. Las limitaciones de las pruebas basadas en fagos son que requieren células intactas metabólicamente activas. Las limitaciones de los inmunoensayos de flujo lateral actuales son los requisitos para cultivar el organismo y preparar una muestra y los altos límites de detección (debido a la unión de un único epítipo sobre un analito). Los ensayos basados en redes para la detección de analitos de SARM permiten detectar múltiples distintivos (ácido nucleico y proteína) simultáneamente y de una manera muy específica (consúltense los datos sobre la falta de unión inespecífica). La red molecular no requiere la preparación de muestras y está construida para reconocer múltiples epítipos sobre un único analito.

55

Además, las infecciones extrahospitalarias dan como resultado más de 12 millones de consultas ambulatorias/año y son la causa principal de las infecciones cutáneas y de tejidos blandos en los servicios de urgencias. Actualmente, la realización de pruebas de cepas de SARM lleva horas o días, lo que es demasiado tarde para ayudar a tomar decisiones críticas sobre el ingreso, aislamiento y tratamiento. Además, las infecciones agudas y prolongadas pueden dar como resultado una respuesta inmunitaria excesivamente robusta que conduce a sepsis (septicemia), que es una

60

afección médica grave y es la décima causa principal de muerte en los EE. UU. (CDC, 2003). Las poblaciones con riesgo de septicemia son los pacientes ancianos, inmunodeprimidos y en estado crítico. La sepsis se trata normalmente con fluidos intravenosos y antibióticos, sin embargo, el tratamiento insuficiente o tardío puede conducir a sepsis grave, caracterizada por disfunción orgánica, hipotensión, insuficiencia multiorgánica y shock. Las tasas de mortalidad para la sepsis grave son superiores a 60 % en los Estados Unidos cada año. Las alergias e intolerancias alimentarias surgen de las reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario a uno o más alérgenos. Las enfermedades alérgicas afectan a hasta 50 a 60 millones de estadounidenses y su prevalencia está aumentando. Las alergias alimentarias representan 35-50 % de todos los casos de anafilaxia. Se estima que más de 54 % de los ciudadanos estadounidenses tienen una o más alergias (CDC). La prevalencia de la rinitis alérgica es aproximadamente 35 % en Europa y Australia (ECRHS). El número de consultas ambulatorias en los Estados Unidos con el diagnóstico principal de rinitis alérgica es superior a 13 millones en 2008. Desde 2000-2005, el coste de tratar la rinitis alérgica está aumentando de 6,1 mil millones de dólares estadounidenses a 11,2 mil millones de dólares estadounidenses, con más de la mitad del dinero gastado en medicamentos recetados. Un alérgeno debe exponerse a un organismo para provocar una respuesta, normalmente por inhalación o ingestión. Un alérgeno es una molécula que causa una respuesta inmunológica anómala. Los alérgenos suelen ser proteínas, pero pueden ser también más pequeños y se denominan haptenos.

Los alérgenos pueden ser unidos por las inmunoglobulinas IgE, los linfocitos B, los linfocitos T y los mastocitos en el ser humano. Los inmunocomplejos de IgE-alérgeno causan la desgranulación de los mastocitos y una liberación de histaminas, local y sistémicamente. La liberación de histaminas puede causar calambres musculares, contracción muscular, inflamación, eritema y edema de las membranas mucosas. Las reacciones graves pueden causar anafilaxia y muerte.

Las enfermedades metabólicas (EM) comprenden una gran clase de enfermedades que implican trastornos en el metabolismo. Muchas EM tienen un componente genético, además de componentes medioambientales. Muchas de las EM inducidas genéticamente se deben a defectos genéticos en la función enzimática. La mayoría de las EM surgen debido a la acumulación de sustratos enzimáticos o productos enzimáticos, cuya acumulación es citotóxica.

Las enfermedades ligadas al estilo de vida (EV), en ocasiones denominadas enfermedades de la longevidad, son enfermedades que aparecen en poblaciones industrializadas y poblaciones con mayor esperanza de vida. Algunas enfermedades ligadas al EV frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, la hipertensión, el asma, el cáncer, las hepatopatías crónicas, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la diabetes de tipo 2, las cardiopatías, las nefritis, la osteoporosis, el acné, el accidente cerebrovascular, la depresión, el trastorno de hiperactividad con déficit de atención y la obesidad. Desde finales de los 90, las enfermedades ligadas al EV han representado más de 60 por ciento de la mortalidad global (Centro Nacional de Estadísticas Sanitarias, Oficina Nacional de Vital Statistics).

Las enfermedades metabólicas, las enfermedades crónicas, las neoplasias malignas, las enfermedades autoinmunitarias, los trastornos y enfermedades neuronales, las enfermedades relacionadas con la edad y las enfermedades infecciosas normalmente se evalúan mediante estrategias de realización de pruebas iterativas que implican mediciones fisiológicas tradicionales en el hospital y, más recientemente, evaluaciones moleculares y mediciones de moléculas que son indicativas de enfermedades específicas en laboratorios clínicos. A pesar de los avances en la investigación médica, existe una gran necesidad de diagnósticos adicionales capaces de detectar, o evaluar la salud, o identificar, o indicar la presencia de enfermedad o factores causantes de enfermedades o factores modificadores de las enfermedades en mamíferos. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es utilizar un dispositivo compuesto por una red molecular sobre una plataforma polimérica o un kit de dispositivos que se van a usar en el diagnóstico, la detección o la indicación de aspectos específicos de la salud, la enfermedad y los agentes causantes de enfermedades en mamíferos. Actualmente, las estrategias de realización de pruebas de diagnóstico no son rentables, requieren mucho tiempo, están limitadas en el alcance del antígeno analizado y/o requieren mucho trabajo. El conocimiento rápido del estado de salud del individuo permite (i) el tratamiento médico apropiado, (ii) la modificación del comportamiento para reducir la probabilidad de incidencia de enfermedades, la morbilidad, la propagación de infecciones y (iii) la capacidad de salvar vidas.

El sistema inmunitario de los mamíferos reacciona ante agentes extraños tales como organismos y alérgenos a través de numerosas vías de reconocimiento que implican a los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Normalmente, el sistema inmunitario es capaz de limitar o eliminar la infección por un organismo extraño, sin embargo, algunos organismos tienen mecanismos para evadir el sistema inmunitario humano y pueden causar enfermedad, morbilidad y muerte. Similarmente, el sistema inmunitario genera habitualmente una respuesta inmunitaria contra aloinjertos o xenoinjertos en receptores de trasplantes de órganos y tejidos que causa el rechazo del trasplante. Además, en un número creciente de casos, el sistema inmunitario es hiperactivo y reacciona a agentes propios o medioambientales a los que normalmente sería tolerante, lo que causa respuestas autoinmunitarias, asmáticas o alérgicas. Los estados inflamatorios agudos o crónicos antes mencionados causados por infección, enfermedades autoinmunitarias y alérgicas son causas importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

- Las alergias y las intolerancias alimentarias surgen de reacciones de hipersensibilidad del sistema inmunitario a uno o más alérgenos. Las enfermedades alérgicas afectan a hasta 50 a 60 millones de estadounidenses y su prevalencia está aumentando. Las alergias alimentarias representan 35-50 % de todos los casos de anafilaxia. Se estima que más de 54 % de los ciudadanos estadounidenses tienen una o más alergias (CDC). La prevalencia de la rinitis alérgica es aproximadamente 35 % en Europa y Australia (ECRHS). El número de consultas ambulatorias en los Estados Unidos con el diagnóstico principal de rinitis alérgica es superior a 13 millones en 2008. Desde 2000-2005, el coste de tratar la rinitis alérgica está aumentando de 6,1 mil millones de dólares estadounidenses a 11,2 mil millones de dólares estadounidenses, con más de la mitad del dinero gastado en medicamentos recetados.
- Un alérgeno debe exponerse a un organismo para provocar una respuesta, normalmente por inhalación o ingestión. Un alérgeno es una molécula que causa una respuesta inmunológica anómala. Los alérgenos suelen ser proteínas, pero pueden ser también más pequeños y se denominan haptenos.
- Los alérgenos pueden ser unidos por las inmunoglobulinas IgE, los linfocitos B, los linfocitos T y los mastocitos en el ser humano. Los inmunocomplejos de IgE-alérgeno causan la desgranulación de los mastocitos y una liberación de histaminas, local y sistémicamente. La liberación de histaminas puede causar calambres musculares, contracción muscular, inflamación, eritema y edema de las membranas mucosas. Las reacciones graves pueden causar anafilaxia y muerte.
- Yamaguchi y col. ("Preparation and properties of antibody polymers." *Reactive and Functional Polymers* 37.1-3 (1998): 245-250) describen polímeros de anticuerpos reticulados preparados mediante reacciones de acoplamiento de anticuerpos de antiporfirina usando glutaraldehído.
- Ngundi y col. ("Failure of layer-by-layer multilayers composed of neutravidin-biotin-labeled antibody for sandwich fluoroimmunosensing." *Biosensors and Bioelectronics* 22.12 (2007): 3243-3246) describen la fijación de anticuerpos activos u otras moléculas de reconocimiento a las superficies de captura de biosensores, y el ensamblaje capa a capa de la superficie bioactiva. También se describe un procedimiento para mejorar la actividad de superficies de captura de poliestireno usadas en fluoroinmunoensayos de tipo sándwich para la detección de la diana, la enterotoxina estafilocócica B (SEB).
- Cui, Xiaoqiang y col. ("Layer-by-layer assembly of multilayer films composed of avidin and biotin-labeled antibody for immunosensing." *Biosensors and Bioelectronics* 18.1 (2003): 59-67) describen multicapas proteicas compuestas por avidina y anticuerpo marcado con biotina (bio-Ab) preparadas sobre una superficie de oro mediante la tecnología de ensamblaje capa a capa que usa la alta constante de unión específica entre la avidina y la biotina.
- El documento WO00/07019 describe la preparación de conjugados reticulados hidrosolubles y complejos de conjugados reticulados para mejorar la capacidad de detección de los ensayos inmunoquímicos, que incluyen los dispositivos de flujo lateral, que se basa en un procedimiento de "precipitación de proteínas por sales" en el que se forma un precipitado reversible a concentraciones de sales liotrópicas superiores a 1 M y coincide con una reticulación de la cadena principal del conjugado intermedio hidrosoluble.
- El documento WO2011/066449 describe "redes moleculares" que se pueden usar en diagnóstico y otras aplicaciones para detectar analitos en una muestra. Una red molecular se describe como un copolímero pseudoaleatorio ramificado que comprende dos clases amplias de subunidades: agentes de captura y agentes de enlace. Las subunidades se autoensamblan para formar una estructura capaz de unirse a dianas predeterminadas. A continuación, se puede detectar la unión.
- Las estrategias de realización de pruebas de diagnóstico actuales no son rentables, requieren mucho tiempo, están limitadas en el alcance del antígeno analizado y/o requieren mucho trabajo. El conocimiento rápido del estado de salud del individuo permite (i) el tratamiento médico apropiado, (ii) la modificación del comportamiento para reducir la probabilidad de incidencia de enfermedades, la morbilidad, la propagación de infecciones y (iii) la capacidad de salvar vidas. El proyecto del genoma humano ha identificado 57 genes humanos que codifican diversas enzimas del citocromo P450 que están implicadas en reacciones metabólicas. Los isotipos y variantes del citocromo P450 pueden interferir con la bioactividad de los fármacos, el metabolismo de los fármacos y la eliminación de los fármacos y proporcionar un factor de confusión al recetar fármacos de importancia vital a los pacientes. Los niveles de los isotipos del citocromo P450 son factores importantes que se deben sopesar cuando se recetan fármacos con efectos secundarios importantes y fármacos con márgenes terapéuticos estrechos. Existe una necesidad de evaluar rápidamente los niveles de los isotipos del citocromo P450 en pacientes individuales para la selección apropiada de fármacos con efectos tóxicos limitados. Por tanto, también hay una necesidad de realizar pruebas genéticas para detectar la expresión de isoformas del citocromo P450 para que los médicos puedan anticipar las interacciones farmacológicas en los pacientes antes de recetar medicamentos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La materia para la que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

5

La invención se refiere a una estructura de red molecular multipolimérica y estratificada que tiene múltiples capas con múltiples especies de agentes de captura unidos a múltiples especies de enlace que tienen diferentes longitudes y producida mediante un procedimiento que comprende: combinar una primera pluralidad de agentes de captura heterogéneos de las múltiples especies de agentes de captura con una primera pluralidad de agentes de enlace heterogéneos de las múltiples especies de enlazadores, donde la combinación es una primera premezcla para generar una primera capa de captura en solución; combinar una segunda pluralidad de agentes de captura heterogéneos de las múltiples especies de agentes de captura con una segunda pluralidad de agentes de enlace heterogéneos de las múltiples especies de enlazadores, donde la combinación es una segunda premezcla para generar una segunda capa de captura en solución; y añadir la solución de la segunda capa de captura a la primera capa de captura para crear una red molecular construida para reconocer múltiples epítomos sobre uno o múltiples analitos.

En una realización de la invención, el uno o múltiples analitos incluyen *Staphylococcus aureus*; las múltiples especies de agentes de captura incluyen un componente seleccionado del grupo que consiste en albúmina, un péptido de unión a ADN que consiste en VLFGKLA (SEQ ID NO: 12), un péptido de unión a ADN que consiste en VMFGKLA (SEQ ID NO: 13), un péptido de unión a ADN que consiste en VFFGRLA (SEQ ID NO: 14), un péptido de unión a ADN que consiste en RRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 38), un péptido de unión a ADN que consiste en VFFGRLA (SEQ ID NO: 38), pAb contra *S. aureus*, mAb contra *S. aureus*, IgM, mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13, mAb contra *S. aureus*, clon 704 y pAb contra proteína A.

25

En una realización adicional de la invención, las múltiples especies de agentes de enlace incluyen un componente seleccionado del grupo que consiste en hidrazida de ácido N-β-maleimidopropiónico (BMPH), suberato de bis[sulfosuccinimidilo] (BS3), éster de [N-e-maleimidocapropil]succinimida (EMCS), bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS) y formaldehído.

30

En una realización adicional de la invención, se añade una subcapa que comprende albúmina a un sustrato, y la primera capa de captura se añade a la subcapa, y la segunda capa de captura se añade a la primera capa de captura.

En una realización adicional de la invención, los agentes de captura están configurados para unirse a múltiples epítomos, que incluyen la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) y el ADN de CpG bacteriano.

35

En una realización adicional de la invención, la red molecular está construida para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM).

En una realización adicional de la invención, la base se selecciona del grupo que consiste en nitrocelulosa, sílice, agarosa, poliestireno y poliuretano.

40

La invención proporciona una "red molecular" que se puede usar para detectar o cuantificar uno o más análisis en una muestra. En ciertas realizaciones, las redes moleculares se usan para el diagnóstico y cribado médico. Una red molecular se puede considerar un copolímero pseudoaleatorio ramificado que comprende dos clases amplias de subunidades: agentes de captura y agentes de enlace. Las subunidades, o "monómeros", se autoensamblan para formar una estructura capaz de unirse a dianas predeterminadas, o "analitos", de una muestra.

45

Poniendo en contacto una muestra (p. ej., una gota de sangre completa) con una red molecular y detectando la presencia o ausencia de múltiples dianas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos del patógeno) unidas por la molecular, es posible determinar si una, algunas o todas las moléculas diana están presentes en la muestra. Las redes moleculares encuentran aplicación en los diagnósticos médicos, el muestreo medioambiental y otros usos.

50

En un aspecto de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una primera porción que tiene una composición de agentes de captura que consiste en una o más especies de primeros agentes de captura y una o más especies de primeros agentes de enlace, donde la mayoría de, o esencialmente todos, los agentes de captura de la primera porción están conectados mediante uno o más primeros agentes de enlace a al menos otro agente de captura de la primera porción; una segunda porción que tiene una composición de agentes de captura que consiste en una o más especies de segundos agentes de captura, donde la mayoría de, o esencialmente todos, los agentes de captura de la segunda porción están conectados mediante un agente de enlace a al menos otro agente de captura de la segunda porción; donde al menos una especie de primeros agentes de captura difiere de al menos una

60

especie de segundos agentes de captura; y donde algunos agentes de captura de la primera porción están conectados mediante agentes de enlace a agentes de captura de la segunda porción (p. ej., en una interfase de las porciones), de tal manera que la primera porción y la segunda porción forman una red molecular continua.

- 5 En un aspecto de la descripción, se proporciona un artículo de fabricación que comprende una primera porción que tiene una composición de agentes de captura que consiste en una primera pluralidad de agentes de captura heterogéneos y una composición de agentes de enlace que consiste en una primera pluralidad de agentes de enlace heterogéneos, donde la mayoría de, o esencialmente todos, los agentes de captura de la primera porción están conectados mediante uno o más agentes de enlace a al menos otro agente de captura de la primera porción; una
- 10 segunda porción que tiene una composición de agentes de captura que consiste en una segunda pluralidad de agentes de captura heterogéneos y una composición de agentes de enlace que consiste en una segunda pluralidad de agentes de enlace heterogéneos, donde la mayoría de, o esencialmente todos, los agentes de captura de la segunda porción están conectados mediante un agente de enlace a al menos otro agente de captura de la segunda porción; donde la composición de agentes de captura y la composición de agentes de enlace de la primera porción difiere de la
- 15 composición de agentes de captura y la composición de agentes de enlace de la segunda porción; y donde al menos algunas moléculas de agente de captura de la primera porción están conectadas mediante agentes de enlace a al menos algunas moléculas de agente de captura de la segunda porción, de tal manera que la primera porción y la segunda porción forman una red molecular continua.
- 20 En un aspecto de la descripción, se proporciona un copolímero pseudoaleatorio ramificado, que comprende monómeros que son agentes de captura y agentes de enlace, los agentes de captura comprenden una pluralidad de especies de agentes de captura específicos para diferentes dianas y los agentes de enlace comprenden una pluralidad de especies de agentes de enlace, donde el copolímero se forma en condiciones en las que los monómeros de agente de captura son reticulados entre sí por agentes de enlace. En algunas realizaciones, los agentes de enlace son
- 25 enlazadores homobifuncionales o heterobifuncionales y al menos algunas especies de agentes de enlace comprenden uno o más grupos reactivos que no se unen a algunas especies de agentes de captura en el copolímero.

En un aspecto de la descripción, una estructura de red molecular multipolimérica y estratificada, la estructura incluye una base que tiene una superficie. La estructura de red incluye además una pluralidad de primeros agentes de captura,

30 los primeros agentes de captura conectados directamente a la superficie de la base o conectados a la superficie de la base mediante uno o más agentes enlazadores de la base. La red también incluye una pluralidad de segundos agentes de captura y una pluralidad de agentes enlazadores, los segundos agentes de captura conectados indirectamente a la superficie de la base mediante un enlace más corto que no tiene más de un primer agente de captura y uno o más agentes de enlace. Cada segundo agente de captura de la red molecular, en combinación con su enlace más corto,

35 forma un multímero, o una porción de un multímero, que tiene al menos tres subunidades de monómero, incluyendo el multímero el segundo agente de captura, un primer agente de captura y uno o más agentes de enlace.

Se describe un procedimiento para fabricar un reactivo analítico, que comprende formar una primera capa combinando

40 (a) una primera pluralidad de especies de agentes de captura, donde dicha primera pluralidad une más de una diana biológica, teniendo dichos agentes de captura grupos reactivos de los agentes de captura, y (b) un primer agente de enlace o una pluralidad de primeros agentes de enlace, donde el uno o más agentes de enlace contienen grupos reactivos complementarios a los grupos reactivos de los agentes de captura, en condiciones en las que los agentes de captura se interconectan a través del uno o más agentes de enlace, formando de ese modo una primera capa que comprende una primera red de agentes de captura interconectados; y formando a continuación una segunda capa

45 adyacente a la primera capa combinando (c) una segunda pluralidad de especies de agentes de captura, donde dicha segunda pluralidad une más de una diana biológica, teniendo dichos agentes de captura grupos reactivos de los agentes de captura, y (d) un segundo agente de enlace o una pluralidad de segundos agentes de enlace, donde el uno o más agentes de enlace contienen grupos reactivos complementarios a los grupos reactivos de los agentes de captura, en condiciones en las que los agentes de captura de la segunda pluralidad de agentes de captura se pueden

50 interconectar a través de los segundos agentes de enlace, y donde algunos agentes de captura de la segunda pluralidad se interconectan con algunos agentes de captura de la primera pluralidad a través de segundos agentes de enlace, para formar una red molecular continua. El procedimiento puede incluir la etapa de retirar los agentes de captura y agentes de enlace no unidos antes de la etapa (c). En algunas realizaciones, la composición de la primera pluralidad de agentes de captura es diferente de la composición de la segunda pluralidad de agentes de captura. En

55 algunas realizaciones, el uno o más agentes de enlace de la etapa (b) son diferentes de los agentes de enlace de la etapa (d). En algunas realizaciones, el procedimiento incluye llevar a cabo 1-6 rondas adicionales de combinación de agentes de captura y agentes de enlace, donde cada ronda da como resultado una porción adicional de la red molecular.

- 60 En un aspecto, la descripción proporciona un artículo de fabricación producido mediante un procedimiento descrito en esta solicitud.

Se describe un procedimiento para determinar simultáneamente la presencia o ausencia de múltiples analitos predeterminados en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un artículo de fabricación como se describe en esta solicitud (p. ej., arriba), que tiene agentes de captura específicos para dichos analitos, y determinar si dichos analitos son unidos o no por dicho artículo de fabricación. En algunas realizaciones, 5 determinar si dichos analitos son unidos o no por dicho artículo de fabricación comprende poner en contacto los analitos unidos con uno o más reactivos de detección que unen dicho uno o más analitos. En algunas realizaciones, los reactivos de detección están marcados de forma detectable con un marcador detectable colorimétrico, fluorescente o luminiscente. En algunas realizaciones, los reactivos de detección se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas y polipéptidos de unión a ADN. En algunas realizaciones, se usan dos o más 10 reactivos de detección, cada uno de los cuales se une específicamente a una especie diferente de analito. En algunas realizaciones, los dos o más reactivos de detección están marcados con el mismo marcador detectable. En otras realizaciones, al menos dos de dichos reactivos de detección están marcados con diferentes marcadores detectables. En algunas estrategias, un primer reactivo de detección marcado con un primer marcador detectable une un analito en la primera capa y un segundo reactivo de detección marcado con un segundo marcador detectable une un analito 15 en la segunda capa. En algunas realizaciones, la unión por un primer reactivo de detección de un analito capturado es totalmente distinta de la unión por un segundo reactivo de detección de un analito capturado diferente, y donde la unión de ambos analitos se puede distinguir de la unión de un solo analito.

Se describe un dispositivo que comprende una carcasa portátil que tiene al menos una superficie de soporte para 20 redes moleculares; y al menos una red molecular descrita en esta solicitud acoplada a la al menos una superficie de soporte para redes moleculares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 La **Fig. 1** es un diagrama esquemático de una red molecular multicapa.
- La **Fig. 2** muestra el efecto del número de capas sobre la unión de analitos.
- La **Fig. 3** muestra las propiedades de unión de una red estratificada y una red no estratificada.
- 30 La **Fig. 4** muestra una comparación de la capacidad de unión de múltiples analitos de un ELISA y una red molecular.
- La **Fig. 5** muestra la unión mediante una red molecular para diagnosticar septicemia.
- 35 La **Fig. 6** muestra las relaciones de señal a ruido en un ensayo para infección bacteriana gramnegativa.
- La **Fig. 7** muestra la detección de bacterias gramnegativas y analitos de bacterias gramnegativas en sangre humana.
- La **Fig. 8A** muestra un diagrama esquemático de un aparato para capturar un analito que usa una red molecular.
- 40 La **Fig. 8B** muestra una vista de cerca de un aparato para capturar un analito que usa una red molecular.
- La **Fig. 8C** muestra una vista lateral de un aparato multicámara para capturar un analito que usa una red molecular.
- 45 La **Fig. 8D** muestra una vista superior de un aparato multicámara para capturar un analito que usa una red molecular.
- La **Fig. 8E** muestra una vista lateral de un aparato de tipo pistola multicámara portátil para capturar un analito que usa una red molecular.
- 50 Las **Fig. 9A y 9B** muestran disposiciones de sensores ejemplares correspondientes.
- La **Fig. 9C** muestra una disposición de una pluralidad de moléculas de detección reticuladas.
- La **Fig. 9D** muestra la configuración de una red molecular.
- 55 La **Fig. 10A** muestra un dispositivo de realización de pruebas ejemplar para detectar la presencia de diversos analitos.
- La **Fig. 10B** muestra una vista de cerca en perspectiva de una cámara de realización de pruebas.
- 60 La **Fig. 10C** muestra una vista detallada de la cámara de realización de pruebas de la Fig. 10B.
- La **Fig. 10D** muestra una disposición de redes moleculares.

- La **Fig. 11A** muestra una vista en perspectiva de un adaptador.
- La **Fig. 11B** muestra una vista lateral de una unidad de filtración.
- 5 La **Fig. 12** muestra una vista en perspectiva de un dispositivo de contención punzante.
- La **Fig. 13A** muestra una vista en perspectiva de una red de lavado.
- 10 La **Fig. 13B** muestra una representación esquemática de una red de multiplexación.
- La **Fig. 13C** muestra una representación esquemática de un volumen de prueba.
- La **Fig. 14A** muestra una representación simplificada de una red molecular configurada como una esponja. La **Fig.**
- 15 **14B** muestra la red en un recipiente que contiene una muestra.
- Las **Fig. 15A-17** muestran las vistas en perspectiva correspondientes de diversos dispositivos multicámara.
- La **Fig. 18** muestra que los acontecimientos de unión positiva se pueden monitorizar mediante un cambio en la
- 20 intensidad fluorescente (IF) de una red.
- La **Fig. 19** muestra que los cambios en la intensidad fluorescente de la red se pueden monitorizar para indicar un acontecimiento de unión específica.
- 25 La **Fig. 20** muestra que la unión positiva de analitos a redes puede inducir la alteración de las propiedades de las redes.
- La **Fig. 21** muestra que las redes moleculares se pueden usar de manera efectiva para unir analitos específicos de SARM.
- 30 La **Fig. 22** muestra que las redes más pequeñas producen señales más altas.
- La **Fig. 23** muestra que las redes más pequeñas producen menos ruido (unión inespecífica).
- 35 La **Fig. 24** muestra que el uso de una red permite una señal positiva más rápida en comparación con un inmunoensayo 2D estándar para analitos específicos de SARM.
- La **Fig. 25** no está representada.
- 40 La **Fig. 26** muestra la unión específica de SARM y *S. epidermidis* a redes moleculares diseñadas para inmovilizar distintivos de *S. aureus* y *S. aureus* resistente a la metilicina (SARM) en una muestra.
- La **Fig. 27** muestra los resultados de estudios de caracterización de la unión del sistema de detección para SARM.
- 45 La **Fig. 28** muestra los resultados para la realización de pruebas de especificidad de SARM.
- La **Fig. 29** muestra el análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC) de la realización de pruebas de SARM.
- La **Fig. 30** muestra los resultados de la prueba para el impacto de la configuración de las redes.
- 50 La **Fig. 31** muestra el impacto de la configuración en los resultados de las pruebas.
- La **Fig. 32** muestra los resultados de unión de *S. aureus* para tres configuraciones diferentes de redes moleculares.
- 55 La **Fig. 33** muestra la detección de *S. aureus* inmovilizada sobre redes moleculares.
- La **Fig. 34** muestra la detección de *S. aureus* usando un sistema de detección fluorescente.
- La **Fig. 35** es un diagrama esquemático de la sección transversal de una red molecular formada sobre una base.
- 60 La **Fig. 36** es un diagrama en sección transversal de una red molecular formada sobre una base que tiene una superficie superior con una porción elevada formada como una subcapa.

La **Fig. 37** es un diagrama en sección transversal de una red molecular formada sobre una base en un sistema que tiene flujo sustancialmente unidireccional.

5 La **Fig. 38A** es un diagrama en sección transversal de una red molecular formada sobre una base en un sistema que tiene flujo multidireccional. La **Fig. 38B** es una vista en planta de la misma red molecular.

La **Fig. 39** es un diagrama en sección transversal de tres redes moleculares sustancialmente esféricas.

10 La **Fig. 40** muestra los resultados sinérgicos de la detección de múltiples distintivos.

La **Fig. 41** muestra la detección de infección viral en sangre completa y diluida.

La **Fig. 42** muestra el análisis de la ROC de una prueba de indicador de infección viral.

15

Las **Fig. 43A-43B** muestran dos realizaciones de una red de superplexación. Las **Fig. 43C-43E** muestran diversas realizaciones de redes moleculares.

Las **Fig. 44A-44B** muestran realizaciones de redes moleculares modificadas usando enlazadores de cloruro cianúrico.

20

La **Fig. 45** muestra la fijación de analitos de ácidos nucleicos amplificados a redes moleculares.

La **Fig. 46** muestra una prueba de afinidad de ácidos nucleicos isotérmica que usa redes moleculares.

25 La **Fig. 47** muestra redes moleculares con moléculas de captura, metales coloidales, reticulantes y diversas características estructurales.

La **Fig. 48** muestra redes moleculares como esponjas.

30 La **Fig. 49** muestra redes moleculares como unidades de filtración.

La **Fig. 50** muestra redes moleculares como paredes.

35 La **Fig. 51** muestra la detección de analitos usando moléculas reticuladas y/o PEGiladas con moléculas de amplificación de la señal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES Y TERMINOLOGÍA

40

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en esta solicitud tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por los expertos en la materia pertinente. Se proporcionan definiciones generales en, por ejemplo, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed. (Singleton y col., 1994; John Wiley & Sons, Nueva York, NY) o The Harper Collins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper
45 Perennial, Nueva York, N.Y). A menos que se mencionen de otro modo, las técnicas empleadas o contempladas en esta solicitud son procedimientos estándar ampliamente conocidos en la técnica.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en la forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, los
50 ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'. Los títulos proporcionados en esta solicitud no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, los cuales se pueden tomar por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen más pormenorizadamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

55 Por "agente" se entiende una molécula o célula que produce, o es capaz de provocar, o se usa para obtener un resultado o respuesta específicos. Los agentes incluyen, pero no se limitan a, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, fármacos, productos biológicos, componentes celulares, polipéptidos, ácidos nucleicos y muestras medioambientales.

60 Por "analito" se entiende una molécula que es el objeto de análisis, tal como que se mide, y es un componente de una muestra medioambiental o biológica.

Por “producto biológico” se entiende cualquier sustancia obtenida de un organismo vivo o productos orgánicos producidos por un organismo u otras fuentes biológicas y que se puede usar para tratar o prevenir enfermedades.

Por “cámara” se entiende un compartimento o espacio encerrado entre dos canales cualesquiera.

5

Por “canal” se entiende una vía para la transferencia de muestras, fluidos y sólidos dispersos en un fluido de una región a otra.

10 Por “competidora” se entiende una molécula con propiedades químicas superficiales y/o forma similares a otra molécula o un analito. Tanto la molécula competidora como el analito son capaces de unir, o unir específicamente, una molécula complementaria con cualidades prácticamente iguales. La molécula complementaria puede tener un número limitado de puntos de unión adecuados para dicha molécula competidora y dicho analito. La unión entre la molécula complementaria y el analito está supeditada a la concentración de molécula competidora, la disponibilidad y las condiciones del tampón.

15

20 Por “no competidora” se entiende una molécula que no tiene propiedades químicas superficiales o formas similares a un analito y no une específicamente una molécula complementaria. En su lugar, una molécula no competidora puede perturbar, ralentizar, secuestrar o inhibir la capacidad del analito para entrar en contacto y/o unirse a la molécula complementaria. La molécula no competidora también puede unirse a una región alostérica de la molécula complementaria en la que no se une el analito. La unión de la molécula no competidora a una región alostérica puede ocluir o cambiar la región de unión de analitos de la molécula complementaria. La unión entre la molécula complementaria y el analito está supeditada a la concentración de molécula no competidora, la disponibilidad y las condiciones del tampón.

25 Por “filtro” se entiende una sustancia, tal como un tejido, polímero, papel, material fibroso o cualquier otro material poroso, a través de la cual puedan pasar fluidos y moléculas con un diámetro inferior al tamaño de poro del filtro.

Por “adaptador” se entiende una pieza accesorio que se conecta o une a otras piezas o dispositivos.

30 Por “lavado” se entiende un fluido que contiene un agente tamponador y una mezcla de sales, detergentes, proteínas, polinucleótidos, carbohidratos y/o lípidos que se pueden aplicar a un dispositivo después de la inyección de la muestra. También se puede usar para retirar moléculas que están inmovilizadas inespecíficamente en un dispositivo o se puede usar para retirar moléculas que están unidas o inmovilizadas específicamente en un dispositivo.

35 Por “seleccionado” se entiende un procedimiento por el que mediante las propiedades químicas y/o físicas de los analitos de una muestra, estos se unen o inmovilizan preferentemente en comparación con otros materiales que no son analitos de la muestra.

40 Por “seleccionado contra” se entiende un procedimiento por el que mediante las propiedades químicas y/o físicas de los materiales no deseados de la muestra, estos se unen o inmovilizan preferentemente y, por tanto, puede permitir la selección indirecta de los materiales deseados de la muestra.

Por “tamiz molecular” se entiende un tamiz o separador, que consiste en una malla, metales o polímeros, que separa los analitos deseados de los materiales no deseados de la muestra.

45

Por “enfermedad infecciosa” se entiende una enfermedad que se manifiesta clínica o subclínicamente en un mamífero y es causada por un agente patógeno.

50 Por “patógeno” se entiende cualquier agente productor de enfermedades, lo que incluye un virus, una bacteria u otro microorganismo.

Por “microbiano” se entiende pequeños organismos vivos que incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos.

55 Por “bacteriano” se entiende que se refiere a una bacteria o bacterias, que son organismos procariotas microscópicos que pueden o no causar enfermedades en los seres humanos.

Por “vírico” se entiende un microbio submicroscópico que causa enfermedades. Los virus son parásitos obligados y requieren células vivas para reproducirse. Los virus están compuestos por un genoma (ADN o ARN), proteínas, y pueden tener o no una envoltura lipídica.

60

Por “parasitario” se entiende una planta o un animal que vive, crece y se alimenta de, o dentro de, un ser humano.

Por "fúngico" se entiende un miembro de una clase de microbios eucariotas que incluyen hongos, levaduras, royas, mohos y carbonas que pueden o no causar enfermedades en los seres humanos.

5 Por "prueba de diagnóstico" se entiende cualquier clase de prueba médica realizada para ayudar en el diagnóstico o la detección de enfermedades. Las pruebas de diagnóstico se realizan dentro de un intervalo de parámetros aceptables para identificar correctamente el agente analizado.

Por "prueba de indicador" o "indicación" se entiende cualquier cosa que sirve para indicar o señalar la presencia de un agente o una enfermedad.

10 Por "fijación" se entiende un acto de fijar o el estado de estar fijado a una plataforma o un ligando.

Por "reticulante" se entiende una sustancia o agente químico que induce la formación de reticulaciones químicas entre más de un agente homólogo y/o heterólogo

15 Por "sustrato" se entiende la sustancia sobre la que actúa una enzima.

20 Por "muestra biológica" se entiende cualquier fluido, tejido o material obtenido de un ser humano vivo o muerto que puede contener inmunoglobulinas y/o uno o más ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y/o polipéptidos derivados de microbios. Las muestras incluyen, por ejemplo, LCR, suero, sangre, esputo, derrame pleural, exudado faríngeo y deposiciones, tejido o exudados respiratorios, plasma, muestras de exudado cervical, tejido de biopsia, tejido gastrointestinal, orina, heces, semen u otros fluidos, tejidos o materiales del cuerpo. Las muestras también incluyen cultivos bacterianos (de medios líquidos o sólidos) y muestras medioambientales. Una muestra biológica se puede tratar para romper físicamente la estructura tisular o celular, liberando de ese modo los componentes intracelulares en una solución que puede contener enzimas, tampones, sales, detergentes y similares que se usan para preparar la muestra para el análisis.

30 Por "muestra medioambiental" se entiende cualquier sólido, fluido, partícula o molécula, orgánicos o inorgánicos, obtenido externamente presente fuera del cuerpo de un ser humano que puede ser aislado. Por ejemplo: alimentos, agua, polen, pesticidas, petróleo, látex, hierba, nueces, peces, saliva felina u otros materiales orgánicos o inorgánicos. Una muestra medioambiental orgánica se puede tratar para romper físicamente la estructura tisular o celular, liberando de ese modo los componentes intracelulares en una solución que puede contener enzimas, tampones, sales, detergentes y similares que se usan para preparar la muestra para el análisis.

35 Por "separación", "purificación" o "fraccionamiento" se entiende que una o más moléculas de una muestra son retiradas de otras moléculas de una muestra. Las muestras sólidas se pueden suspender en una solución acuosa que incluye ácidos nucleicos y otras moléculas (p. ej., proteínas, carbohidratos, lípidos y/o ácidos nucleicos). Una etapa de separación o purificación retira al menos aproximadamente 30 %, preferiblemente al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente 80 % y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 % del resto de componentes de la muestra.

45 Por "ácido nucleico" o "polinucleótido" se entiende un polímero de nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases heterocíclicas nitrogenadas, o análogos de bases, en el que los nucleósidos están enlazados covalentemente a través de una estructura de cadena principal para formar un polinucleótido. El ARN, ADN y los análogos de ARN y ADN convencionales están incluidos en este término. Una cadena principal de ácido nucleico puede comprender una variedad de enlaces conocidos, que incluyen uno o más enlaces fosfodiéster de azúcares, enlaces péptido-ácido nucleico ("ácidos peptidonucleicos"; PCT n.º WO 95/32305 (Hydig-Hielsen y col.)), enlaces de fosforotioato, enlaces de metilfosfonato o combinaciones de enlaces conocidos. Los restos de azúcar del ácido nucleico pueden ser ribosa o desoxirribosa, o compuestos similares que tienen sustituciones conocidas, p. ej., sustituciones metoxi en 2' y/o haluro en 2'. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos de bases conocidos (p. ej., inosina; véase *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams y col., Ed., 11ª ed., 1992), o derivados conocidos de bases de purina o pirimidina (PCT n.º WO 93/13121 (Cook)) y residuos "básicos" en los que la cadena principal no incluye ninguna base nitrogenada para uno o más residuos (patente de EE. UU. n.º 5,585,481 (Arnold y col.)). Un ácido nucleico puede comprender solo azúcares, bases y enlaces convencionales, como se encuentra en el ARN y ADN, o puede incluir tanto componentes como sustituciones convencionales (p. ej., bases convencionales enlazadas a través de una cadena principal de metoxi, o un ácido nucleico que incluye bases convencionales y uno o más análogos).

60 Por "sonda" se entiende un oligómero de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente a una secuencia diana de un ácido nucleico o su complemento, preferiblemente de un ácido nucleico amplificado, en condiciones que favorecen la hibridación, permitiendo de ese modo la detección de la diana o el ácido nucleico amplificado. La detección puede ser indistintamente directa (es decir, como resultado de una sonda que se hibrida directamente a la secuencia diana

- o el ácido nucleico amplificado) o indirecta (es decir, como resultado de una sonda que se hibrida a una estructura molecular intermedia que enlaza la sonda a la secuencia diana o el ácido nucleico amplificado). Una "diana" de una sonda se refiere generalmente a una secuencia (es decir, un subconjunto de) de un ácido nucleico más grande que se hibrida específicamente a al menos una porción de la secuencia de la sonda mediante enlaces de hidrógeno estándar (emparejamiento de bases). Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten la hibridación estable de un oligómero de sonda a una secuencia diana, incluso si las dos secuencias no son completamente complementarias. Una sonda puede estar marcada o no, en función del procedimiento de detección usado, procedimientos que son ampliamente conocidos en la técnica.
- 5
- 10 Por "polipéptidos" se entiende compuestos orgánicos compuestos por aminoácidos que están enlazados covalentemente mediante un enlace peptídico, que son un componente principal de las células vivas. Los polipéptidos pueden ser segmentos de una proteína o pueden constituir una proteína completa. Las proteínas se pueden escindir mediante escisión enzimática, química o mecánica para dar lugar a polipéptidos.
- 15 Por "alérgeno" se entiende cualquier epítipo sobre un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario.
- Por "unión inespecífica" se entiende cualquier molécula que interactúa con otra molécula de una manera inespecífica y transitoria. Un ejemplo de esto es la interacción de una molécula con una carga total positiva con una molécula que tiene una carga total negativa, sin embargo, la asociación no es fuerte y la disociación es probable en presencia de sales suaves.
- 20
- Por "antígeno" se entiende cualquier sustancia que, cuando se introduce en el cuerpo, es reconocida por el sistema inmunitario. Los antígenos pueden ser, pero no se limitan a, alérgenos y otras moléculas que no son propias.
- 25 Por "alergia" se entiende una respuesta inapropiada y dañina del sistema inmunitario a sustancias normalmente inofensivas, denominadas alérgenos.
- Por "inmunoglobulinas" se entiende una familia de moléculas de proteínas solubles producidas y secretadas por los linfocitos B en respuesta a un antígeno, o por hibridomas en el laboratorio, que son capaces de unirse a ese antígeno específico. Los isotipos de las inmunoglobulinas son IgM, IgG, IgA, IgY, IgD e IgE.
- 30
- Por "clase de moléculas" se entiende moléculas que están agrupadas en razón de atributos, características, cualidades, rasgos, propiedades químicas y/o actividades comunes.
- 35 Por "nanocanal" se entiende un canal con dimensiones arquitectónicas de 0,1 nm a 1 µm (1-10 000 Angstroms).
- Por "microcanal" se entiende un canal con dimensiones arquitectónicas de 1 µm a 10 m (10 000-100 000 000 000 Angstroms).
- 40 Por "nanocavidad" se entiende una cavidad con un diámetro de 0,1 nm a 1 µm (1-10 000 Angstroms).
- Por "microcavidad" se entiende una cavidad con un diámetro de 1 µm a 10 m (10 000-100 000 000 000 Angstroms).
- 45 Por "sepsis" se entiende una afección médica grave caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica que puede conducir a insuficiencia multiorgánica y muerte y se caracteriza por una tormenta de citocinas en respuesta a productos microbianos en la sangre, la orina, los pulmones, la piel y otros tejidos.
- Por "corona" se entiende una descarga de barrera dieléctrica a presión atmosférica, descarga de corona, descarga de barrera, plasma a presión atmosférica, descarga luminiscente a presión atmosférica, plasma no equilibrado a presión atmosférica, descarga silenciosa, gas parcialmente ionizado a presión atmosférica, descarga filamentosa, descarga a presión atmosférica directa o remota, descarga a presión atmosférica controlada externamente o autocontrolada y similares, y se debe distinguir de las descargas o los procedimientos eléctricos subatmosféricos y a presión de vacío. Sin embargo, la corona se puede producir en la atmósfera gaseosa de composiciones específicas, es decir, en una atmósfera controlada.
- 50
- 55 Por "matriz extracelular" o "matrices extracelulares" se entiende una combinación de más de uno de los productos celulares excretados siguientes: péptidos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, polisacáridos, agua y otras moléculas orgánicas. Ejemplos de componentes de la matriz extracelular son el lodo de alginato, el fibrinógeno, la matriz pericelular de condrocitos y el cartílago.
- 60
- Por "sustrato" se entiende la sustancia sobre la que actúa una enzima.

Por “aptámero” se entiende una clase de moléculas que incluyen ácidos nucleicos mono- o bicatenarios (ADN o ARN) de entre 30 y 70 nucleótidos de longitud y que pueden tener un peso molecular de 9-20 kDa). Los aptámeros también pueden ser péptidos e híbridos de ácidos nucleicos-péptidos. Los aptámeros poseen una especificidad y afinidad altas por sus moléculas diana.

5

Por “filtración” se entiende la operación mecánica, física o química que se usa para la separación de analitos de muestras de fluidos inmovilizando dichos analitos para que solo puedan pasar los que no son analitos y el fluido de las muestras.

10 Por “esponja” se entiende una estructura porosa de moléculas caracterizada por adsorber o inmovilizar fácilmente moléculas de una muestra de fluido.

Por “celda fotovoltaica” se entiende uno o un conjunto de materiales, tales como silicio cristalino, telurio de cadmio y seleniuro de cobre e indio, que pueden convertir la energía luminosa en electricidad de corriente continua.

15

Por “resistencia a la compresión” se entiende la capacidad de un material para resistir fuerzas de empuje dirigidas axialmente. Cuando se alcanza el límite de resistencia a la compresión, los materiales se fracturan, lo que produce fractoluminiscencia (también denominada triboluminiscencia).

20 Por “metacromático” se entiende un cambio de color que puede ser el resultado de la presencia o ausencia de calor.

II. COMPENDIO

La invención proporciona “redes moleculares” que se pueden usar en el diagnóstico y otras aplicaciones para detectar 25 analitos en una muestra. Las redes moleculares mono- y multicapa se pueden incorporar en dispositivos médicos para ayudar en el diagnóstico y otros dispositivos para el análisis de muestras.

Una red molecular contiene agentes de captura. Las redes moleculares pueden contener una población heterogénea de moléculas orgánicas e inorgánicas que pueden estar enlazadas entre sí mediante una combinación de 30 interacciones electrostáticas y enlaces covalentes de una manera no uniforme. La disposición y separación de los componentes moleculares de la red molecular pueden generar una arquitectura estable multidimensional no uniforme, con diferentes densidades de agentes de captura y reticulantes por unidad de volumen en regiones diferentes. Un efecto de la ausencia de uniformidad es que las diferentes capas o regiones pueden tener una porosidad diferente.

35 La identidad y disposición de los componentes de captura molecular dentro de la red molecular pueden conferir múltiples propiedades químicas superficiales diferentes por unidad de volumen de red molecular. Las múltiples afinidades de unión, las propiedades químicas superficiales, las actividades u otras propiedades de los componentes de captura heterogéneos que componen la red molecular pueden conferir posibilidades de multiplexación; y donde los componentes de captura pueden estar dispuestos y unidos entre sí en una arquitectura que puede poseer una 40 densidad alta de superficies de unión por unidad de volumen y puede permitir capacidades de multiplexación mejoradas.

En una red molecular, diferentes agentes de captura (o “componentes de captura”) pueden unir el mismo analito, p. ej., múltiples analitos iguales de una muestra pueden unir específicamente más de un componente de captura 45 heterogéneo en un molecular red. Por el contrario, los analitos heterogéneos de una muestra pueden unir específicamente múltiples componentes de captura iguales en una red molecular. En algunos casos, los analitos heterogéneos de una muestra pueden unir específicamente más de un componente de captura heterogéneo en una red molecular.

50 Como se señaló anteriormente y se expone pormenorizadamente a continuación, las redes moleculares tienen habitualmente múltiples capas. Por tanto, la red se puede construir de manera estratificada o estriada. Por ejemplo, la capa inicial puede ser una mezcla homogénea o heterogénea de uno o más tipos de polipéptidos y/u otras moléculas (p. ej., polinucleótidos) adsorbidas sobre una superficie polimérica o superficie vítrea; seguido de la adición de uno o más reticulantes químicos. Esto puede ir seguido de la adición de mezclas homogéneas o heterogéneas de una o más 55 moléculas diferentes, seguido de reticulantes.

En un dispositivo, una o más redes moleculares se pueden absorber, apilar, estratificar, suspender o superponer para formar un volumen para la realización de pruebas. La topología general de la superficie de la red se puede describir como un mosaico de texturas heterogéneas y no uniformes conectadas mediante enlaces químicos. Por ejemplo, la 60 red puede tener la estructura de un entramado estratificado o una pluralidad de entramados contrapeados. Las propiedades químicas o físicas del polímero determinan la adsorción o repulsión de la primera capa de la red molecular. Las propiedades químicas o físicas diferenciales del polímero confieren la sublocalización de componentes específicos

en la primera capa sobre regiones específicas del polímero. Las capas posteriores de la red están preferentemente enlazadas a la capa anterior de la red.

La red molecular se puede fabricar usando reticulantes de diversas longitudes de brazo que varían, por ejemplo y sin limitación, de 0,2 nm a 1,7 nm (2 a 17 Angstroms). Al fabricar una capa, los reticulantes se pueden añadir o aplicar de manera secuencial para fijar, inmovilizar y estabilizar los componentes de captura en una dirección aleatoria o semiorientada. La disposición o distribución de los componentes en la red se verá afectada por el tamaño y las propiedades químicas superficiales del componente de captura con respecto a las propiedades químicas vecinas de la red. Los componentes de captura de tamaños y formas diferentes están enlazados entre sí a través de una o más reticulaciones; de manera que los componentes de captura reticulados pueden quedar expuestos superficialmente o pueden integrarse a la estructura interna de la red. La estructura general de la red se puede diseñar para incluir regiones que están formuladas y ubicadas específicamente para identificar y segregar propiedades de los elementos de la muestra de prueba.

En algunas realizaciones, la red molecular es una red polimérica heterogénea grande que contiene cinco o más componentes de captura diferentes, tales como, pero no limitados a, proteínas y/o polinucleótidos y/u otras moléculas que están inmovilizadas o enlazadas en el espacio tridimensional para favorecer la unión de analitos.

La red molecular puede estar fijada o adaptada a un dispositivo polimérico. Por ejemplo, una o más redes moleculares se pueden formar; colocar; adsorber; adherir; pegar; reticular y/o adaptar sobre una superficie polimérica; y/o no porosa; y/o mordentada con corona; y/o moldeada con una o más propiedades químicas superficiales.

Un dispositivo de red molecular puede tener un área de realización de pruebas con una o una serie de redes moleculares que pueden estar orientadas en un volumen definido y se puede usar para realizar una o más pruebas de unión de analitos. El dispositivo puede tener un lumen. Una característica de algunos dispositivos es la distribución no uniforme de puntos de unión a lo largo de las superficies lumbinales del dispositivo, lo que incluye las redes moleculares, los revestimientos lumbinales, los filtros y los tamices que pueden estar presentes en un dispositivo. La superficie puede proporcionar una distribución uniforme de puntos de unión en todas las secciones dentro del dispositivo, pero puede que no en otras áreas del dispositivo.

Un dispositivo de prueba puede contener una pluralidad de redes moleculares, donde cada red molecular contiene una pluralidad de componentes de captura diferentes que pueden detectar analitos diferentes de más de una especie; donde una única muestra puede contener analitos de más de una especie y de manera que los analitos unidos son indicativos de una infección. Un dispositivo puede contener múltiples volúmenes de prueba que contienen múltiples redes moleculares diferentes para capturar múltiples analitos diferentes de una muestra. Dicho dispositivo puede contener cámaras de contención que pueden contener tampones, soluciones, lavados, moléculas de detección, catalizadores y otras moléculas que ayudan a la detección de analitos específicos unidos e inmovilizados a dichas redes moleculares. Dicho dispositivo puede contener una pluralidad de moléculas de detección de analitos diferentes conjugadas a una o más clases de moléculas detectables, de manera que la presencia de analito se puede detectar mediante la inmovilización de dichas moléculas detectables. Dicho dispositivo puede contener soluciones que pueden contener catalizadores, sustratos y otras moléculas implicadas en una reacción enzimática o química; de manera que las moléculas detectables sobre dichas moléculas de detección de analitos pueden interactuar químicamente con los catalizadores y sustratos para producir una señal detectable si las moléculas de detección de analitos son inmovilizadas por uno o más analitos diferentes unidos a una o más redes moleculares. Dicho dispositivo puede contener uno o más sensores de señal o amplificadores de señal conectados en serie o en paralelo para detectar y propagar las señales. Dicho dispositivo puede contener uno o más amplificadores y sensores iguales o puede contener uno o más amplificadores y sensores diferentes.

El uso de redes moleculares como parte de las pruebas, los dispositivos y los procedimientos descritos en esta solicitud permite la realización de pruebas simultáneas de proteínas, lípidos, carbohidratos, analitos de ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos de la muestra, usando análisis basados en la afinidad, fisicoquímicos, electroquímicos, magnéticos o enzimáticos en menos de 1 hora

Un aspecto de la presente descripción se refiere a cualquier disposición, uso, procedimiento, prueba y dispositivo que emplea las redes moleculares descritas en esta solicitud. En descripciones preferidas, las redes moleculares son una red multicapa heterogénea densa de múltiples moléculas de captura diferentes construida mediante entrelazamiento para formar topologías únicas y totalmente distintas y superficies de unión con propiedades físicas, eléctricas, vibratorias, térmicas, espaciales, magnéticas y químicas cuantificables. Pueden estar presentes poros, canales y cavidades en la totalidad de una o más capas de una red molecular. En ciertas descripciones, una red molecular está enlazada covalente o no covalentemente a través de reticulantes químicos o mezclada con polietilenglicol para aumentar la estabilidad de las moléculas de captura, o para generar separaciones espaciales entre las moléculas de captura que pueden variar dentro de, o entre, las capas de la red molecular.

Sin desear ceñirnos a la teoría, se cree que el apilamiento de capas de la red molecular aumenta los puntos de unión de analito en una columna vertical de red molecular para permitir el posicionamiento del analito inmovilizado de tal manera que genere una señal focal.

5

También se describen en esta solicitud procedimientos mediante los que se pueden construir, procesar y disponer redes moleculares sobre una superficie plana o una superficie de perlas.

Las redes moleculares y/o una disposición de las capas de las redes moleculares puede incluir un conjunto de estructuras y se puede formar o fijar a superficies planas o de perlas para permitir una capacidad de unión mejorada y la detección de diversos analitos simultáneamente. También se describen dispositivos que emplean múltiples redes moleculares diferentes o capas de redes moleculares configuradas dentro de una o más áreas de realización de pruebas para facilitar la captura, inmovilización y detección de múltiples analitos diferentes. En ciertas realizaciones, los analitos son alérgenos, inmunocitos específicos de alérgenos y/o productos inmunitarios específicos de alérgenos en una muestra biológica, alimentaria o medioambiental.

10
15

III. FABRICACIÓN Y PROPIEDADES DE LAS REDES MOLECULARES

A. Composición y estructura de las redes moleculares

20

En su forma más básica, una red molecular es un copolímero pseudoaleatorio ramificado que comprende dos clases amplias de subunidades: agentes de captura y agentes de enlace. Las subunidades, o “monómeros”, se autoensamblan para formar una estructura capaz de unirse a dianas predeterminadas, o “analitos”, de una muestra. Poniendo en contacto una muestra (p. ej., una gota de sangre completa) con una red molecular y detectando la presencia o ausencia de múltiples dianas (p. ej., proteínas de patógeno) unidas por la red molecular, es posible determinar si una, algunas o todas las moléculas diana están presentes en la muestra. Las redes moleculares encuentran aplicación en los diagnósticos médicos, el muestreo medioambiental y otros usos.

25

Como resultará evidente, la estructura de la red molecular proporciona varias ventajas sobre los dispositivos de diagnóstico convencionales.

30

Primero se describirá una red molecular simple (“monocapa”), seguida de una descripción de redes moleculares más complejas (“multicapa”). La red monocapa se describe en parte para facilitar la comprensión de las redes multicapa. Las redes multicapa son la forma preferida para muchas aplicaciones. Un dispositivo de la descripción (que incluye dispositivos de muestra únicos) puede contener una o varias redes mono- o multicapa.

35

Como se señaló, las redes moleculares pueden describirse como un polímero ramificado que comprende agentes de captura y agentes de enlace.

40 1. Agentes de captura

Los agentes de captura son macromoléculas que se unen específicamente a un analito o diana. Con fines ilustrativos y no limitantes, los ejemplos de agentes de captura incluyen anticuerpos, antígenos, ligandos, antiligandos, receptores, ácidos nucleicos y lectinas, que se unen específicamente a antígenos, anticuerpos, antiligandos, ligandos, ligandos de receptores, ácidos nucleicos complementarios y carbohidratos, respectivamente. Los ejemplos de clases de agentes de captura se proporcionan en la TABLA 1. En general, la interacción entre un analito y un agente de captura no es covalente.

45

Los agentes de captura contienen al menos dos, y normalmente varios o muchos, grupos reactivos con los que los grupos funcionales del enlazador (descritos a continuación) pueden reaccionar para formar un enlace covalente. Los grupos reactivos ejemplares son los grupos aminoterminal y lisina-amino de los polipéptidos y el grupo 3'-hidroxilo en los ácidos nucleicos. Los ejemplos adicionales de grupos reactivos encontrados sobre los agentes de captura se proporcionan en la TABLA 1. En algunos casos, un agente de captura biológico, tal como una inmunoglobulina, se puede derivatizar para añadir un grupo reactivo no asociado con el agente en la naturaleza. Por ejemplo, un oligonucleótido se puede modificar mediante adición de un grupo amina. En algunas realizaciones de la invención, el agente de captura biológico no está derivatizado de esta manera, sino que comprende solo los grupos reactivos asociados normalmente con la clase de molécula biológica.

50
55

Los componentes de captura pueden incluir, pero no se limitan a: polipéptidos; anticuerpos; polinucleótidos; carbohidratos; enzimas; lípidos; fármacos de molécula pequeña; tratamientos biológicos; componentes de vacunas; alérgenos; moléculas de unión a hormonas; moléculas de unión a lípidos; moléculas de unión al colesterol; sustratos enzimáticos; componentes celulares de mamíferos; productos celulares de mamíferos; componentes víricos;

60

productos víricos; componentes celulares bacterianos; productos bacterianos; componentes celulares de parásitos; productos de parásitos; componentes celulares fúngicos; productos fúngicos; priones; viroides; productos de viroides; componentes de la matriz extracelular; citocinas de mamíferos; receptores de citocinas de mamíferos; receptores solubles de mamíferos y receptores huérfanos; ligandos y otras moléculas.

5

En algunas realizaciones, la red molecular está compuesta por moléculas de captura de polipéptidos y/o ácidos nucleicos que están enlazadas entre sí mediante uno o más reticulantes químicos de una manera que conserva la estructura tridimensional y capacidad de unión de dichas moléculas de captura.

10 Al referirse a las redes moleculares, se pueden usar los términos siguientes para describir los agentes de captura en una red individual: podemos referirnos a una molécula única (p. ej., una molécula de anticuerpo única), una especie única (p. ej., muchas moléculas de anticuerpo con la misma especificidad por la diana), especies múltiples (p. ej., especies de anticuerpos que reconocen dianas diferentes), o clases independientes únicas o múltiples de agentes de captura (p. ej., ácidos nucleicos, anticuerpos, aptámeros, etc., véase la TABLA 1). Los agentes de captura también se

15 pueden describir por referencia a la especificidad por la diana (p. ej., una mezcla de anticuerpos policlonales que une múltiples epítomos totalmente distintos de una molécula diana común se puede denominar una especie única en lo que respecta a la especificidad por la diana).

TABLA 1

20

Agentes de captura ejemplares

	CLASE DE AGENTE DE CAPTURA	LIGANDO EJEMPLAR UNIDO POR EL AGENTE DE CAPTURA	GRUPOS REACTIVOS PARA EL ENLACE
1	Anticuerpos	Antígenos Proteína A Proteína G Receptores de Fc Inmunocitos que contienen receptores de Fc Proteína del complemento C1q	Aminas, carboxilos
2	Ácidos nucleicos (para hibridación) ADN ARN Ácidos peptidonucleicos	Ácidos nucleicos complementarios Proteínas de unión a ácidos nucleicos Endonucleasas de restricción Exonucleasas	Carboxilos, hidroxilos
3	Aptámeros Aptámeros de ácidos nucleicos Aptámeros de polipéptidos		Aminas, carboxilos, hidroxilos, sulfhidrilos
4	Receptores	Antígenos Citocinas Ligandos Esteroides Fármacos de menos de 500 Daltons ARN ADN	Aminas, carboxilos, hidroxilos, sulfhidrilos
5	Antígenos	Anticuerpos policlonales de suero u otro fluido biológico	Aminas, carboxilos, hidroxilos, sulfhidrilos
6	Antiligandos Proteínas de unión a la penicilina Enzimas modificadoras de fármacos Bombas de eflujo multifármaco	Antibióticos Fármacos antimicóticos Fármacos antiprotozoarios	Aminas, carboxilos, hidroxilos, sulfhidrilos

	CLASE DE AGENTE DE CAPTURA	LIGANDO EJEMPLAR UNIDO POR EL AGENTE DE CAPTURA	GRUPOS REACTIVOS PARA EL ENLACE
7	Carbohidratos Lectinas	Proteínas de unión a lectina Proteína del complemento C3 Anticuerpos policlonales de suero u otro fluido biológico	Carboxilos, hidroxilos
8	Lípidos Lípido A	Anticuerpos policlonales de suero u otro fluido biológico Proteína de unión a lípidos (p. ej., proteína de unión a LPS (LBP)) Enzimas modificadoras de lípidos	Carboxilos, hidroxilos
9	Proteínas y péptidos de unión a ácidos nucleicos	ADN, ARN	Aminas, carboxilos

Las proteínas de unión a ADN se pueden usar como agentes de captura. Con fines ilustrativos y no limitantes, los ejemplos incluyen:

- 5 ▪ Polipéptidos de unión a ácidos nucleicos que contienen repeticiones ricas en leucina y, opcionalmente, los motivos siguientes: LXZL (SEQ ID NO: 1), FXZL (SEQ ID NO: 2) y VXZL (SEQ ID NO: 3), donde L = leucina, F = fenilalanina, V = valina, X = glicina, serina, prolina o treonina y Z = asparagina, arginina, glicina o treonina.
- 10 ▪ Polipéptidos de unión a ácidos nucleicos que comprenden la secuencia VPTLEELNLSYNNIMTVPAL (SEQ ID NO: 4).
- Polipéptidos de unión a ácidos nucleicos que comprenden la secuencia LGNLTHLSLKYNLTVVPRNLPSSLEYLLLSYNRIVKLAPED (SEQ ID NO: 5).
- 15 ▪ Polipéptidos de unión a ácidos nucleicos que comprenden la secuencia LSRLEGLVLKDSLSWLNASWFRGLGNL (SEQ ID NO: 6).
- Otros péptidos derivados del receptor de tipo toll 9 que contienen repeticiones ricas en leucina.
- 20 En algunos ejemplos, los polipéptidos de unión a ADN monocatenario pueden contener el motivo siguiente: FGXZ (SEQ ID NO: 7), de manera que F = fenilalanina, G = glicina, X = arginina o lisina, Z = leucina, valina, serina, alanina, glicina, fenilalanina, triptófano, aspartato o histidina.
- 25 ▪ Los polipéptidos de unión a ADN monocatenario pueden contener el motivo siguiente: FGXZ (SEQ ID NO: 8), de manera que F = fenilalanina, G = glicina, X = arginina o lisina, Z = leucina, valina, serina, alanina, glicina, fenilalanina, triptófano, asparagina o histidina.
- 30 ▪ En algunos ejemplos, los polipéptidos de unión a ARN monocatenario pueden contener los motivos siguientes: FGKI (SEQ ID NO: 9) y RGF, de manera que F = fenilalanina, G = glicina, K = lisina, I = isoleucina y R = arginina.
- 35 ▪ Dominios de unión a ADN de proteínas de unión a ADN monocatenario tales como Escherichia coli ETEC H10407 [entrada CBJ04410.1], Salmonella enterica [ADK62159.1, ZP03346359.1], Klebsiella pneumoniae [YP003517675.1, YP003517470.1], Enterobacter cloacae [YP_003610832.1], Pseudomonas aeruginosa [ZP_06876710.1, NP_252922.1] y otros.
- 40 ▪ Péptidos que contienen poliarginina, polilisina o combinaciones de regiones de arginina y lisina de 8-22 aminoácidos de longitud.
- Los polipéptidos de unión a ARN monocatenario pueden contener los motivos siguientes: FGKI y RGF, de manera que F = fenilalanina, G = glicina, K = lisina, I = isoleucina y R = arginina.

Por ejemplo, la red puede contener 1-50 proteínas de unión a polinucleótidos heterogéneos; dichas proteínas de unión a polinucleótidos tienen afinidad de unión inherente en forma de enlaces de hidrógeno y/o interacciones iónicas o electrostáticas con secuencias de polinucleótidos específicas; y puede ser capaz de producir interacciones inespecíficas con muchos fragmentos de ARN o ADN, cromosomas o plásmidos.

Anticuerpos

Por ejemplo, la red molecular puede contener 1-50 anticuerpos diferentes; cada uno dirigido contra 1-50 características (epítomos) diferentes de un analito; o puede unir entre 1-50 epítomos diferentes sobre 1-50 analitos heterogéneos de una muestra; y donde cada anticuerpo de la red puede tener un potencial de unión máximo de 2 analitos.

5

Los ejemplos de agentes de captura de anticuerpos incluyen anticuerpos contra: miembros de la familia del citocromo P450; isoformas y otros miembros (tales como, pero no limitados a: P450 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7 y otras isoformas); y/o sustratos del citocromo P450 (tales como, pero no limitados a: cafeína, haloperidol, estradiol, naproxeno, propranolol, verapamilo, celecoxib, metadona, cerivastatina, ibuprofeno, losartán, tamoxifeno, diazepam, lansoprazol, omeprazol, propafenona, clomipramina, haloperidol, codeína, halotano, azitromicina, diazepam, tacrolímús, ciclosporina, verapamilo, atorvastatina, lovastatina, simvastatina, progesterona, aprepitant, dexametasona, taxol y otros sustratos); y/o inhibidores del citocromo P450 (tales como, pero no limitados a: ciprofloxacina, cimetidina, fluoroquinolonas, interferón, trimetoprima, fluconazol, fluvastatina, isoniazida, lovastatina, lansoprazol, rabeprazol, cloranfenicol, cimetidina, celecoxib, clemastina, quinidina, claritromicina, aprepitant, eritromicina, imatinib y otros inhibidores); y/o inductores del citocromo P450 (tales como, pero no limitados a: insulina, omeprazol, rifampina, fenobarbital, carbamazepina, noretindrona, dexametasona, isoniazida, fenobarbital, glucocorticoides, efavirenz, troglitazona y otros inductores).

Otros ejemplos de agentes de captura de anticuerpos incluyen anticuerpos contra marcadores no proteicos y/o proteicos óseos; musculares; epiteliales; endoteliales; endocrinos; renales; hepáticos; neurales; vasculares; coronarios; y de salud y/o daño celular; citotoxicidad; y/o inflamación; y donde los componentes de captura pueden ser polipéptidos de unión a ácidos nucleicos y pueden unir analitos de ácidos nucleicos que contienen polimorfismos de un único nucleótido que pueden indicar susceptibilidad a: toxicidad farmacológica; enfermedad; incompatibilidad farmacológica; eficacia farmacológica; y otros indicadores de salud y/o enfermedad. También se pueden usar otras moléculas de unión.

Otros ejemplos de agentes de captura de anticuerpos incluyen combinaciones de uno o más anticuerpos contra: ferritina humana; lípido A; lipopolisacárido bacteriano; peptidoglucano bacteriano; ácido lipoteicoico; ácido teicoico; ácido micólico; flagelos bacterianos; fimbrias; pilina; pili; glucocáliz; capa de lodo; cápsula; proteínas de choque térmico bacteriano; lipoproteínas bacterianas; sideróforos bacterianos; y otros productos bacterianos; los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más polipéptidos de unión a ADN monocatenario; y donde los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más anticuerpos; polipéptidos; lípidos; carbohidratos; y/o cationes divalentes; que pueden unir específicamente: ferritina humana; lípido A; lipopolisacárido bacteriano; peptidoglucano bacteriano; ácido lipoteicoico; ácido teicoico; ácido micólico; flagelos bacterianos; fimbrias pilina; pili; glucocáliz; capa de lodo; cápsula; proteína de choque térmico bacteriano; glucoproteína bacteriana; lipoproteína bacteriana; sideróforos bacterianos; y otros productos bacterianos.

Otros ejemplos de agentes de captura de anticuerpos incluyen combinaciones de uno o más anticuerpos contra: aflatoxina; fumonisinas; y otras toxinas fúngicas; quitina; ergosterol; lipoproteína fúngica; glucoproteína fúngica; y otros productos fúngicos.

Los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más anticuerpos contra quitina; quitinasa; dominio de unión a quitina y/o MQMTKAEFTFANRLKHDDLEEIYSELSD QFPYWD (SEQ ID NO: 10) (número de entrada de GenBank 157801001); YITCLFRGARCRVYSGRSCFCGYCRRDFPGSIFGTCSRNF (SEQ ID NO: 11) (número de entrada de GenBank 126030190); o cualquier otro polipéptido que puede unir quitina; y donde los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más anticuerpos; polipéptidos; lípidos y/o carbohidratos que pueden unir específicamente aflatoxina; quitina; ergosterol; lipoproteína fúngica; glucoproteína fúngica; toxina fúngica; y otros productos fúngicos.

Otros ejemplos de agentes de captura de anticuerpos incluyen combinaciones de uno o más anticuerpos contra: interferón-alfa; interferón-beta; proteína de la cápside vírica; proteína espicular; integrasa vírica; hemaglutinina vírica; neuraminidasa vírica; transcriptasa inversa vírica; glucoproteína vírica; lipoproteína vírica; y otros productos víricos; y donde los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más polipéptidos de unión a ADN monocatenario; polipéptidos de unión a ARN monocatenario; polipéptidos de unión a ADN bicatenario; polipéptidos de unión a ARN bicatenario; y otras moléculas que pueden unir ácido nucleico vírico; y donde los componentes de captura pueden ser una combinación de uno o más anticuerpos; polipéptidos; lípidos y/o carbohidratos que puede unir específicamente interferón alfa humano; interferón beta humano; proteína de la cápside vírica; proteína espicular; integrasa vírica; hemaglutinina vírica; neuraminidasa vírica; transcriptasa inversa vírica; glucoproteína vírica; lipoproteína vírica; y otros productos víricos.

60

Los agentes de captura pueden ser moléculas que pueden unir moléculas; y/o genes; y/o sustratos; y/o inductores; y/o inhibidores del citocromo P450; y otras moléculas que codifican; y/o modifican; y/o regulan las moléculas de

citocromo P450.

Polinucleótidos

- 5 Por ejemplo, la red puede contener 1-500 polinucleótidos diferentes; que tienen una afinidad de unión inherente en forma de enlaces de hidrógeno y/o interacciones iónicas o electrostáticas contra 1-500 polinucleótidos específicos; o que pueden unir 1-500 proteínas de unión a polinucleótidos diferentes a través de enlaces de hidrógeno; enlaces iónicos; y/o interacciones electrostáticas en una solución compleja.

10 Otros agentes de captura

- Las redes moleculares pueden contener componentes de captura tales como proteínas de unión a LPS, CD14, polimixina B y otras moléculas que pueden unir lípido A, endotoxina y/o lipopolisacárido y otros lípidos microbianos; y de manera que los componentes de captura pueden ser anticuerpos que pueden unir peptidoglucano, flagelina, pilA, 15 fimbrias, proteínas de choque térmico y otros productos bacterianos que inducen inflamación; y/o de manera que los componentes de captura pueden ser anticuerpos que pueden unir componentes celulares fúngicos y productos fúngicos; y/o de manera que los componentes de captura pueden ser anticuerpos que pueden unir componentes víricos y productos víricos; y/o de manera que los componentes de captura pueden ser anticuerpos que pueden unir citocinas proinflamatorias de mamíferos tales como histamina, TNF, IL-1 beta, INF gamma; y otras moléculas 20 implicadas en la sepsis.

- Las redes moleculares pueden contener componentes de captura que pueden unir receptores de factores de crecimiento y otros marcadores de células tumorales sobre la superficie de las células tumorales; y de manera que dichas redes moleculares pueden inmovilizar dichas células tumorales dentro de la columna; el cartucho; el tubo y otro 25 dispositivo; y de manera que las células no tumorales pueden pasar a través de dicho dispositivo.

- Las redes moleculares pueden contener componentes de captura que pueden unir e inmovilizar receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, complejos principales de histocompatibilidad y otros marcadores de la superficie celular de reconocimiento de antígenos sobre la superficie de las células; y de manera que dichas redes moleculares 30 pueden unir e inmovilizar productos celulares específicos; y de manera que dichas redes moleculares pueden inmovilizar inmunocitos y/o productos de inmunocitos dentro de la columna; el cartucho; el tubo y otro dispositivo; y de manera que las células no inmovilizadas y los productos y fluidos celulares pueden pasar a través de dicho dispositivo; y de manera que dichos agentes no inmovilizados pueden ser devueltos a la fuente biológica.

- 35 Las redes moleculares pueden contener componentes de captura de tal manera que pueden unir metales pesados, colesterol, triglicéridos, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de alta densidad, citocinas, insulina, hormonas, fármacos y otras moléculas que pueden estar anómalamente elevadas en los mamíferos.

- Las redes moleculares pueden contener componentes de captura que pueden ser moléculas orgánicas e inorgánicas 40 y/o células microbianas vivas que pueden unir y/o absorber y/o almacenar productos químicos tales como petróleo, metales pesados, productos petroquímicos, gasolina, herbicidas, pesticidas y otros contaminantes medioambientales.

- Otros ejemplos más de agentes de captura son las formas biodisponibles de metales tales como hierro, manganeso, magnesio y otros; matrices extracelulares tales como lodo de alginato, fibrinógeno, fibronectina, colágenos y otros; 45 anticuerpos tales como anticuerpos específicos de cepas, anticuerpos específicos de especies, anti-TNF, proteína anticacahuete, antiquitina, antitropomiosina, antipeptidoglucano, anti lípido A, antilipopolisacárido, antflagelina, antipilA, antifimbrias, anti ácido lipoteicoico, antiferritina, anti-CCP, anti interferón alfa, anti interferón beta, anti interferón gamma, antiaflatoxina, antichitl, anti desferrioxamina B, antiferricromo, anti-2,2-dipiridilo, anti ácido rodotorúlico y otras; antígenos tales como pilA, pili, flagelina, flagelos, proteínas de choque térmico, proteínas citrulinadas y otros; receptores tales como receptores de esteroides, receptores de feromonas, receptor de TNF I, receptor de TNF II, receptor de IFN-alfa I, receptor de IFN-alfa II, receptores de galactosa, receptores de ácido siálico, receptores de manosa y otros; ligandos tales como ácido siálico, manosa, factor de necrosis tumoral y otros; enzimas tales como quitinasas y otras; sustratos tales como quitina, tropomiosina y otros; células tales como linfocitos T 50 aclonales y clonales, linfocitos B aclonales y clonales, macrófagos, células dendríticas, células neuronales, cardiomiocitos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos, células estromales, células beta, células epiteliales, células del epitelio pulmonar, miocitos esqueléticos, microglía, células de Kupffer, mastocitos, basófilos, neutrófilos, queratinocitos y otras; microbios intactos o rotos de uno o más géneros, especies o cepas, tales como *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Neisseria sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Chlamydia sp.*, *Borrelia sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia* 55 *sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Treponema sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Adenoviridae sp.*, *Herpesviridae sp.*, *Poxviridae sp.*, *Parvoviridae sp.*, *Reoviridae sp.*, *Picornaviridae sp.*, *Togaviridae sp.*, *Orthomyxoviridae sp.*, *Rhabdoviridae sp.*, *Retroviridae sp.*, *Hepadnaviridae sp.*, *Flaviviridae sp.*, *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Plasmodium sp.*, *Amoeba sp.*, y

otros; fármacos tales como esteroides, moléculas de antiinflamatorios no esteroideos, betabloqueantes, estatinas y otros; productos biológicos tales como adalimumab, infliximab, etanercept, receptor soluble del TNF PEGilado de tipo I y otros; dominios de unión tales como dominios de unión a quitina y otros; proteínas de unión tales como flg15, proteína de unión a lipopolisacáridos, actina y otras; proteínas de unión a ácidos nucleicos tales como proteínas de unión a ADN monocatenario y otras; ácidos nucleicos que contienen secuencias de ADN ribosómico; ácidos nucleicos que contienen genes o segmentos de genes; ARN codificante, ARN no codificante; moléculas de unión a carbohidratos tales como dectina-1, retrociclina 2, lectinas, proteínas de unión a manano y otras; defensinas; moléculas de reconocimiento de antígenos tales como TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 y otras; moléculas de presentación de antígenos tales como complejo principal de histocompatibilidad I y complejo principal de histocompatibilidad II y otras; receptores huérfanos tales como receptores solubles del TNF y otros.

2. Agentes de enlace

Los agentes de enlace (o “enlazadores”) se usan para conectar los agentes de captura entre sí. Se conoce un gran número de enlazadores adecuados en la técnica y muchos están comercializados. Véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., BIOCONJUGATE TECHNIQUES 2ª edición, 2008, Elsevier Inc., Oxford. La mayoría de las veces, los agentes de enlace son bifuncionales (indistintamente homobifuncionales o heterobifuncionales). Los agentes de enlace bifuncionales tienen dos grupos funcionales, cada uno de los cuales se puede unir a grupos reactivos de una molécula de captura. (Únicamente para facilitar su consulta, los grupos químicamente reactivos sobre agentes de captura se denominan “grupos reactivos”, mientras que los grupos químicamente reactivos sobre enlazadores se denominan “grupos funcionales”). Con fines ilustrativos y no limitantes, los ejemplos de agentes de enlace bifuncionales se proporcionan en la TABLA 2. Los grupos funcionales usados habitualmente en los enlazadores comercializados incluyen amida, azida, imida y éster. En ciertas realizaciones, se pueden usar agentes de enlace trifuncionales o multifuncionales. Los ejemplos de agentes de enlace multifuncionales incluyen enlazadores de hidroximetilfosfino y enlazadores de triazeno.

Además de la naturaleza de los grupos funcionales de los enlazadores, una propiedad importante de los enlazadores es la longitud efectiva, que es aproximadamente la distancia entre dos agentes de captura enlazados a la misma molécula de enlazador. Con fines descriptivos, la longitud efectiva se puede considerar aproximadamente la misma que la longitud de cadena extendida publicada (en angstroms (Å)). Por ejemplo, el enlazador 4-formilbenzoato de succinimidilo (SFB) tiene una longitud de aproximadamente 0,6 nm (6 Å), mientras que el enlazador éster de NHS y 5bis-dPEG6 tiene una longitud de aproximadamente 3,6 nm (36 Å). La longitud de los enlazadores también se puede caracterizar por referencia al número de carbonos en una cadena, por referencia a un número de unidades repetitivas (p. ej., unidades de etilenglicol) en el enlazador, etc. Se pueden construir redes moleculares diferentes usando enlazadores diferentes o combinaciones diferentes de enlazadores y, en ciertas versiones de la red de moléculas, la una o más longitudes de los enlazadores pueden variar de capa a capa de una estructura multicapa. En estos contextos, se apreciará que la referencia a longitudes de enlazador preferidas está destinada solo a ser aproximada.

Los enlazadores se pueden dividir, por ejemplo, en cuatro categorías en base a su longitud:

- i) enlazadores de longitud cero (clorhidrato de 1-etil-10-[10-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC))
- ii) enlazadores no selectivos cortos (p. ej., formaldehído, glutaraldehído)
- iii) enlazadores con longitudes en el intervalo de aproximadamente 0,6 nm a aproximadamente 4 nm (aproximadamente 6 a aproximadamente 40 Å)
- iv) enlazadores con longitudes >4 nm (40 Å)

El EDC favorece el enlace de restos amino y carboxi, pero no da como resultado un enlazador físico propiamente dicho. Se pueden usar enlazadores no selectivos cortos para estabilizar las capas de la red molecular. Numerosos enlazadores de longitudes en el intervalo de aproximadamente 0,6 nm a aproximadamente 4 nm (aproximadamente 6 a aproximadamente 40 Å) se describen en la bibliografía científica; los ejemplos se proporcionan en la TABLA 2. Los enlazadores de longitudes >4 nm (40 Å) se describen en la bibliografía científica o se pueden fabricar como se describe en el EJEMPLO 12.

En algunas realizaciones, una red molecular, o una capa de la red molecular, contiene al menos un enlazador con longitud en el intervalo de aproximadamente 0,6 nm a aproximadamente 4 nm (aproximadamente 6 a aproximadamente 40 Å). En algunas realizaciones, una red molecular, o una capa de la red molecular, contiene al menos uno, al menos dos, al menos tres o más de tres enlazadores de longitud en el intervalo de aproximadamente 0,6 nm a aproximadamente 4 nm (aproximadamente 6 a aproximadamente 40 Å) y/o uno o más enlazadores de longitud superior a 4 nm (40 Å). En algunas realizaciones, una red molecular, o una capa de la red molecular, contiene

al menos un enlazador que no es formaldehído o glutaraldehído y/o al menos un enlazador que no es un enlazador de longitud cero.

5 Se apreciará que, preferiblemente, se usan enlazadores que no forman homopolímeros. Cuando se usan múltiples especies de enlazadores en la fabricación de una red molecular, los enlazadores y/o las condiciones de enlace se seleccionan para minimizar la formación de heterooligómeros o polímeros solo de enlazador.

10 Los enlazadores largos pueden ser útiles en ciertas redes o capas de redes, tales como las redes moleculares en las que se capturan células. En algunos casos, los enlazadores largos se pueden preparar como se describe en el EJEMPLO 12. Brevemente, en este procedimiento, un biopolímero lineal (polisacárido, polipéptido o polinucleótido) se enlaza mediante dos enlazadores heterobifuncionales para que la molécula resultante comprenda dos grupos reactivos separados por la longitud del biopolímero más los enlazadores.

15 Los reticulantes pueden unir más de un componente de captura; y pueden unir más de un tipo de componentes de captura de una manera que conserva la estructura bidimensional o tridimensional de los componentes de captura y puede conservar las estructuras secundaria; terciaria; o cuaternaria de los componentes de captura. Preferiblemente, se conserva la unión de al menos un motivo de reconocimiento o un punto de unión de analitos de los componentes de captura.

20 Los ejemplos de reticulantes químicos incluyen éster de [N-e-maleimidocapropil]succinimida (EMCS), bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS), NHS-(PEG)*n*-maleamida, NHS-(PEG)*n*-NHS, y donde *n* puede ser 1 a 50; de manera que los reticulantes químicos pueden ser de entre 0,2 nm y 20 nm (2 y 200 Angstroms) de longitud.

25 Los reticulantes se pueden aplicar en diversas concentraciones que varían de 1 nanomolar a 1 milimolar. Los reticulantes y las concentraciones se seleccionarán para conseguir la estabilidad de la red molecular en diversas condiciones, tales como, por ejemplo, temperaturas de 0 a 45 grados Celsius, condiciones del tampón tales como sal 0 a 800 milimolar y 0 a 11 % de detergente. Los reticulantes se seleccionan para que las redes fabricadas resistan la liofilización y rehidratación posterior.

TABLA 2

Enlazador	Grupos reactivos	Reactivo frente a	Longitud aproximada en nm (A)
Tartrato de sulfosuccinimidilo		Aminas primarias	0,64 (6,4)
DTSSP (propionato de 3,3'-ditrobi(s)sulfosuccinimidilo))		Aminas primarias	1,2 (12)
Clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, une aminas primarias y grupos carboxilo		Aminas primarias y grupos carboxilo	
Hexanoato de N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) (sulfo-SANPAH)	Éster NHS/arilazida	Grupo amino a no selectivo	1,82 (18,2)
Hexanoato de N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino) (ZAMPA)	nitrofenilazida/éster de NHS	Grupo amino a no selectivo	1,82 (18,2)
Hidrazona de succinimidil 4-hidrazinonicoacetona (SANH), hidrazona de C6-succinimidil 4-hidrazinonicoacetona (C6SANH)	Hidrazida	Grupos amino	0,67 (6,7) (SANH) 1,44 (14,4) (C6SANH)
Clorhidrato de 4-hidrazidoteretato de succinimidilo (SHTH)	Hidrazida	Grupos amino	0,79 (7,9)
4-Formilbenzoato de succinimidilo (SFB), número de registro CAS 60444-78-2	Benzoato	Grupos amino	0,58 (5,8)
4-formilbenzoato de C6-succinimidilo (C6-SFB)	Benzoato	Grupos amino	1,35 (13,5)
Disulfuro de bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil] (BASED)	Arlazida	No selectivo	2,13 (21,3)
Hidrazida de p-azidobenzolo (ABH)	Arlazida/Hidrazida	No selectivo a carbohidrato	1,19 (11,9)
Hidrazida de ácido N-[k-maleimidoundecanoico] (KMUH)	Maleimida/Hidrazida	Sulfhidrido a carbonilo (aldehído)/grupos carboxilo	1,9 (19,0)
106627-54-7	Éster de NHS		Grupos amino
4-[p-azidosalicilamido]butilamina (ASBA)	Arlazida	No selectivo (o amina primaria)	1,63 (16,3)
Hidrazida de ácido [N-e-maleimidocaproico] (EMCH)	Hidrazida	Carbohidratos oxidados	1,18 (11,8)
Éster de [N-e-maleimidocaproxilo]succinimida (EMCS), número de registro CAS 55750-63-5	Maleimida/Éster NHS	Sulfhidrido a grupo amino	0,94 (9,4)
6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato de succinimidilo (LC-SDA)	NHS-LC-Diazirina	Amina a no selectivo	1,25 (12,5)
6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SDA)	Sulfo-NHS-LC/Diazirina	Amina a no selectivo	1,25 (12,5)
Isocianato de N-[p-maleimidofenilo] (PMPI)	Isocianato/Maleimida	Hidroxilo a sulfhidrido	0,87 (8,7)

Enlazador	Grupos reactivos	Reactivo frente a	Longitud aproximada en nm (A)
Clorhidrato de hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), número de registro CAS 70539-42-3	Hidrazida	Carbohidratos oxidados	
Bis[succinimidisuccinato] de etilenglicol (EGS)	Ésteres de NHS	Grupos amino	1,61 (16,1)
Éster de NHS y 5bis-dPEG6; di-(N-hidroxisuccinimidil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadeca-1,19-dioato (BS(PEG)9)	Ésteres de NHS	Grupos amino	3,58 (35,8)
Éster de NHS y 5bis-dPEG6; di-(N-hidroxisuccinimidil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadeca-1,19-dioato (BS(PEG)5)	Ésteres de NHS	Grupos amino	2,17 (21,7)
[4-(psoralen-8-iloxi)]butirato de succinimidilo (SPB)	Éster NHS/Psoraleno	Amina a ADN	0,86-0,95 (8,6-9,5)
NHS-(PEG)n-maleamida	Éster NHS/Maleamida	Amina a sulfhidrilo	Dependiente de la longitud del PEG
NHS-(PEG)n-NHS	Ésteres de NHS	Amina a Amina	Dependiente de la longitud del PEG
Ácido b-[tris(hidroxi)metil]fosfina]propiónico (THPP)	Grupos hidroximetilfosfina	Aminas primarias y secundarias	Trifuncional 0,303 (3,03)
Suberato de (bis[sulfosuccinimidilo] (BS ²))	Ésteres de NHS	Aminas primarias	1,14 (11,4)
Clorhidrato de 1-etil-10-[10-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (CAS 25952-53-8)	Carbodiimida	Amina a carboxilo	0
Formaldehído	Grupos de hidrógeno activo	No selectivo	0,2 (2)
Glutaraldehído	Grupos de hidrógeno activo	No selectivo	~0,6 (~6)
Maleamida	Maleamida	Sulfhidrilo	~0,4 (~4)
Cloruro cianúrico	Cloruro	Amina	0,6 (6)

En ciertas realizaciones, el enlazador es degradable, por ejemplo, indistintamente debido a inestabilidad química o térmica. Los enlazadores degradables ejemplares incluyen derivados de PEG, poli(óxidos de alquileno), ésteres de ácido hidroxialquílico, polietilenimina-trietilenglicol (PEI-TEG), poli(éster cetal de espermina), poli(éster de espermina),
 5 enlazadores de amida, química de conjugación de tioles y similares. Las redes moleculares de unión a ácidos nucleicos degradables ejemplares incluyen aquellas con polipéptidos tales como poli-arginina o poli-lisina o dominios de unión a ácidos nucleicos como agentes de captura y enlazadores tales como BS(PEG)₉, poli(óxidos de alquileno), ésteres de ácido hidroxialquílico, polietilenimina-trietilenglicol (PEI-TEG), poli(éster cetal de espermina), poli(éster de espermina) o BS³.

10

En otras realizaciones, las propiedades de los enlazadores son sensibles a las condiciones medioambientales (pH, temperatura, oxidación-reducción, química, etc.) de tal manera que se altera la afinidad de los agentes de captura por los analitos. A medida que la longitud y la configuración cambian, las propiedades de la red molecular pueden cambiar. Los enlazadores ejemplares de este tipo incluyen poli(N-isopropilacrilamida), diacrilato de poli(etilenglicol), N, N'-metilénbisacrilamida, N-vinil-2-pirrolidona y metacrilato de 2-hidroxietilo.

15

Las redes moleculares que son degradables o con propiedades sensibles a las condiciones medioambientales son útiles en condiciones en las que es deseable capturar y a continuación liberar selectivamente analitos. La liberación específica de agentes (fármacos, productos biológicos o ácidos nucleicos) se puede facilitar mediante la liberación
 20 diseñada de agentes de una red molecular. Los problemas actuales con la administración de agentes incluyen la toxicidad, mala distribución, falta de direccionamiento y liberación ineficiente. Otros problemas con la administración de agentes incluyen los perfiles farmacodinámicos y/o farmacocinéticos desfavorables en el cuerpo y dentro de tejidos específicos. El diseño de una red molecular para realizar las funciones siguientes permite estrategias de administración más efectivas: (i) agentes de captura de la red molecular diseñados para proteger al agente, (ii) agentes de captura
 25 de la red molecular diseñados para dirigir la red a un tejido o tipo celular particular, (iii) agentes de captura o agentes de enlace de la red molecular diseñados para que sean susceptibles a condiciones específicas de los tejidos o subcelulares, (iv) los agentes de captura o agentes de enlace de la red molecular se pueden diseñar para una liberación programada del agente.

30 B. Fabricación de redes moleculares.

Para producir redes moleculares de la invención, los agentes de captura con grupos reactivos ("grupos reactivos de los agentes de captura") se combinan con enlazadores que tienen grupos funcionales complementarios ("grupos funcionales de los enlazadores"). En este contexto, "complementario" significa que los dos grupos interactúan para
 35 formar un enlace químico covalente.

En una estrategia, la red molecular se prepara combinando al menos una (y con mayor frecuencia más de una) especie de agentes de captura y al menos una (y con mayor frecuencia más de una) especie de agentes de enlace. Suponiendo que se usan agentes de enlace bifuncionales, los agentes de captura y los enlazadores se combinan en condiciones
 40 en las que la mayoría de las moléculas del agente de enlace de la red se conjugan a dos agentes de captura y cada agente de captura se enlaza a uno o más agentes de captura a través de un enlazador. Cabe esperar que, en función del uno o más enlazadores y el uno o más agentes de captura, algunos enlazadores pueden formar enlaces intramoleculares con una única molécula de agente de captura, pero las condiciones de disolvente, pH, tampones, temperatura, concentración de monómero y similares se seleccionan para favorecer el enlace de moléculas de agente
 45 de captura diferentes entre sí. Se reconocerá que los agentes de captura no unidos o unidos individualmente pueden quedar atrapados en la red molecular si no se lavan durante la fabricación, pero la mayoría de, o esencialmente todos, (p. ej., >95 % o >99 %) los agentes de captura están enlazados a al menos otro agente de captura.

Se reconocerá que, si se usan agentes de enlace multifuncionales, los enlazadores individuales se pueden conjugar
 50 a más de dos agentes de captura.

En la red molecular resultante, los agentes de captura están enlazados directamente entre sí para formar una estructura tridimensional amorfa, al contrario que en las estructuras en las que, por ejemplo, una pluralidad de agentes de captura, tales como los anticuerpos, están enlazados individualmente a un sustrato subyacente o una o más
 55 cadenas de polímero.

La red molecular resultante se puede describir, con fines descriptivos más que de definición, como un copolímero pseudoaleatorio ramificado en el que los monómeros son agentes de captura y agentes de enlace.

60 La red molecular se puede denominar un copolímero *aleatorio* porque, dada una mezcla de múltiples especies de agentes de enlace bi- o multifuncionales, agentes de captura con múltiples grupos reactivos y múltiples especies de agentes de captura, el polímero ramificado resultante tiene una estructura de red irregular e impredecible.

- La red molecular se puede denominar un copolímero *pseudoaleatorio* porque, al contrario que un polímero realmente aleatorio, (a) los enlazadores unen agentes de captura, pero preferiblemente no unen enlazadores, y los agentes de captura unen enlazadores, pero no otros agentes de captura y (b) no todos los grupos reactivos sobre un enlazador se pueden unir a grupos reactivos sobre cualquier molécula de captura (por ejemplo, en una composición que contiene agentes de captura de anticuerpos y ADN, y enlazadores de sulfo-NHS y enlazadores de [4(psoralen-8-iloxi)]butirato de succinimidilo (SPB), el enlazador de sulfo-NHS enlazará anticuerpos, pero no reaccionará con los ácidos nucleicos, mientras que los enlazadores heterobifuncionales de SPB unirán un anticuerpo a un ADN).
- 10 A modo de ilustración, una red molecular se puede formar (1) depositando una solución que contiene el agente o agentes de captura (típicamente una composición de agentes de captura combinada) en un punto y (2) añadiendo el enlazador o enlazadores (típicamente una composición de enlazadores combinada) a la solución de agentes de captura, en condiciones en las que los enlazadores y los agentes de captura forman una red reticulada. Los agentes de captura pueden, por ejemplo, depositarse sobre una superficie plana (p. ej., sobre un sustrato hidrófobo).
- 15 Típicamente, la red se autoensambla después de la mezcla de los enlazadores y los agentes de captura. Sin embargo, no se excluye que en algunas realizaciones se podría usar un catalizador químico u otro agente (p. ej., activación por luz de enlazadores fotoactivables) para favorecer la formación de la red. El procedimiento de fabricación se describe más pormenorizadamente a continuación.
- 20 Después de combinar los monómeros y formarse la red, en ocasiones es útil extinguir la reacción de unión (p. ej., usando moléculas pequeñas que hacen que los enlazadores no sean reactivos) y/o retirar todo el agente de captura y/o enlazador no enlazados. Por ejemplo, los monómeros no enlazados se pueden retirar lavando la red con un tampón acuoso, que opcionalmente contiene detergente.
- 25 Los sustratos ejemplares se exponen a continuación. El sustrato puede ser un material inerte, un material poroso (p. ej., nitrocelulosa), un material derivatizado para unir la red, etc. Los sustratos adecuados para fabricar redes moleculares incluyen, pero no se limitan a, nitrocelulosa, poliestireno y poliuretano. Si el sustrato incluye grupos reactivos, la primera capa de la red se puede unir covalentemente con el sustrato. En algunos casos, los monómeros se combinan dentro de un molde extraíble.
- 30 En algunas realizaciones, como se expone a continuación, la red se puede formar sobre una “base molecular elevada” o “subcapa” tal como una base de polipéptidos no reticulados. Cuando la subcapa es proteínica, puede comprender uno o más, o todos, los agentes de captura presentes en la primera capa de la red, o puede comprender otras proteínas (p. ej., BSA) o moléculas (p. ej., carbohidratos). En una realización alternativa, la “subcapa” no incluye agentes de
- 35 captura (p. ej., no incluye los agentes de captura que se encuentran en las capas de la red). En una realización alternativa, la “subcapa” está reticulada solo con glutaraldehído o formaldehído.
- En una estrategia alternativa, las redes se pueden formar combinando enlazadores y agentes de captura en una jeringa u otro recipiente y extruyendo la mezcla en un líquido, tras lo que se produce la reticulación.
- 40 Opcionalmente, una red molecular (o una capa de la red molecular) se puede estabilizar poniendo en contacto la red con formaldehído o glutaraldehído, típicamente 0,037 mM durante 15 min a temperatura ambiente.
- En algunas realizaciones, una o más capas de red molecular se pueden extraer, cortar con un borde punzante, un láser
- 45 u otro procedimiento; y adaptar.

C. Composiciones de agentes de captura y enlazadores

- En algunas realizaciones, la red molecular comprende solo una única especie de agentes de captura (p. ej., anticuerpos anti interferón-alfa). La mayoría de las veces, la red molecular comprende múltiples especies diferentes (heterogéneas) de agentes de captura que tienen especificidades de unión diferentes (p. ej., anticuerpos anti interferón-alfa, anticuerpos anti interferón-beta y anticuerpos antiviperina). Con frecuencia, la red molecular comprende múltiples clases de agentes de captura (p. ej., anticuerpos anti interferón-alfa, moléculas de unión a ADN y oligonucleótidos).
- 50
- 55 Similarmente, la red puede contener una o múltiples especies de enlazadores.

Los procedimientos para seleccionar agentes de captura y combinaciones de agentes de captura se describen a continuación.

60

D. Redes moleculares multicapa

Aunque las redes moleculares simples tienen propiedades útiles, en realizaciones preferidas se forman redes moleculares más complejas. Las redes simples, fabricadas en una sola etapa, se pueden denominar redes "monoregión" o "monocapa", siendo usados los términos indistintamente. Las redes más complejas se pueden denominar redes moleculares "multicapa", "bicapa", "tricapa", etc. Las redes multicapa pueden tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más capas. Las redes moleculares usadas con fines de diagnóstico tienen normalmente al menos dos capas y, con frecuencia, tienen más de dos capas (p. ej., 3-8 capas).

Una red bicapa se prepara fabricando una red monocapa, como se describió anteriormente, y fabricando una segunda red molecular combinando la red monocapa con al menos una (y con mayor frecuencia más de una) especie de agentes de captura y al menos una (y con mayor frecuencia más de una) especie de agentes de enlace. Es conveniente, aunque no del todo exacto, visualizar el procedimiento para fabricar capas de red adicionales como soluciones de pipeteo de agentes de captura y enlazadores sobre la parte superior de la red monocapa para formar una segunda capa totalmente distinta dispuesta sobre la primera capa, opcionalmente fabricar una tercera capa, etc., lo que da como resultado una estructura generalmente cilíndrica o una serie generalmente concéntrica de capas hemisféricas. La Fig. 1 ilustra una red molecular multicapa.

Con frecuencia, los enlazadores y los agentes de captura se seleccionan para que la composición de una capa de una red multicapa difiera de la composición de al menos otra capa. En algunas realizaciones, la al menos otra capa es una capa adyacente. En algunas realizaciones, los enlazadores y los agentes de captura se seleccionan para que la composición de una capa de una red multicapa difiera de todas las demás capas de la red. Por ejemplo, en algunas versiones, la composición de una segunda capa es totalmente distinta de la composición de una primera capa. Por tanto, una segunda capa puede diferir de una primera capa en términos de composición de agentes de captura y/o composición de enlazadores. Dos capas pueden tener una porosidad diferente como resultado de la selección de agentes y enlazadores. Con fines ilustrativos y no limitantes, los ejemplos de redes moleculares bicapa se presentan en la TABLA 3.

TABLA 3

	Capa 1	Capa 2
Agentes de captura	Péptidos de unión a dsDNA	Anticuerpos contra PBP2a
Agentes de enlace	EDC	EDC
	Capa 1	Capa 2
Agentes de captura	Péptidos de unión a dsDNA	Anticuerpos contra interferón-alfa e interferón-beta
Agentes de enlace	EMCS	EDC
	Capa 1	Capa 2
Agentes de captura	Péptidos de unión a dsDNA y anticuerpos contra LPS y anticuerpos contra ácido lipoteicoico	Péptidos de unión a dsDNA y anticuerpos contra LPS y anticuerpos contra ácido lipoteicoico
Agentes de enlace	EMCS y EDC	BS(PEG)9

Como resultará evidente para el lector meticoloso, la naturaleza porosa de la red molecular significa que los enlazadores y agentes de captura añadidos en la segunda etapa no permanecerán necesariamente por completo "sobre la parte superior" de la primera capa. En su lugar, los enlazadores y los agentes pueden migrar a los "poros" de la primera capa. Sin embargo, tal migración se puede limitar para que, aunque ambas poblaciones de enlazadores y agentes de captura pueden estar algo entrelazadas en la interfase entre la primera y segunda capas, la parte inferior de la primera capa (suponiendo por el momento una estructura cilíndrica) de la red multicapa resultante tendrá la composición de los enlazadores y agentes de captura añadidos en la primera etapa y la parte superior de la capa más superior o más exterior de la red multicapa tendrá la composición de los enlazadores y agentes de captura añadidos en la segunda etapa.

Un resultado de este entrelazamiento es que la composición en la interfase entre dos capas puede ser algo diferente de los componentes usados para formar cualquiera de las dos capas.

La interfase entre dos capas con la misma composición de agentes de captura y enlazadores (tal como una red multicapa en la que cada capa tiene la misma composición) también diferirá de las regiones distintas de la interfase de la red. Típicamente, la concentración de los agentes de captura y enlazadores es superior en la interfase como consecuencia del procedimiento de fabricación. Es decir, la formación de una primera capa usando 1 microlitro de

cada solución de agentes de captura y enlazadores y la formación a continuación de una segunda capa (y una interfase) añadiendo 1 microlitro de cada solución de agentes de captura y enlazadores a la primera capa preformada dará como resultado una densidad y distribución diferentes de los agentes de captura y enlazadores que la formación de una única capa a partir de 2 microlitros de cada solución de agentes de captura y enlazadores.

5 En una realización, una red multicapa puede tener una capa como núcleo y una o más capas adicionales formadas como hemisferios concéntricos o uno o más armazones que rodean el núcleo. Sin embargo, son posibles otras formas. Por ejemplo, las redes moleculares multicapa pueden tener una forma prácticamente cilíndrica o prácticamente rectangular. Por ejemplo, una red multicapa puede ser más estrecha en un extremo que en el otro (p. ej., de forma
10 cónica). En realizaciones preferidas, las capas están configuradas para que un líquido (p. ej., una muestra) en contacto con la capa más superior (o más exterior) pueda fluir consecutivamente a través de cada capa subsiguiente. Es decir, no todas las “capas” son simultánea o igualmente accesibles.

Se reconocerá que los enlazadores añadidos en la segunda etapa, además de los agentes de captura de reticulación
15 añadidos en la segunda etapa, también enlazarán los agentes de captura de la primera capa con los añadidos en la segunda capa, uniendo de ese modo las capas entre sí.

Hemos descubierto que las redes multicapa con composiciones particulares de enlazadores y agentes de captura en cada enlazador están dotadas de varias propiedades valiosas. Por ejemplo, las redes moleculares tienen la capacidad
20 de capturar simultáneamente múltiples clases diferentes de analitos de tamaños diferentes y con propiedades químicas diferentes. Esto permite la detección simultánea de múltiples indicios de infección (por ejemplo), lo que a su vez proporciona una confianza superior en el resultado. Además, hemos observado que las redes moleculares consiguen altas relaciones de señal a ruido altas y una unión inespecífica baja con respecto a otras estrategias de detección. Para un distintivo dado, la configuración de la red molecular facilita la unión y detección de más analito por
25 unidad de área, lo que da como resultado una señal detectable más fácilmente (p. ej., una señal de color detectable visualmente). Además, las redes moleculares son fácilmente adaptables a un abanico de formatos de dispositivo y son estables y almacenables.

E. Detección de dianas unidas

30 Los analitos unidos a la red molecular se pueden detectar usando procedimientos convencionales consecuentes con la naturaleza del analito. Con mayor frecuencia, el analito inmovilizado es unido por un antiligando marcado de manera detectable, el antiligando marcado no unido se lava de la red y se detecta el marcador. Por ejemplo, los analitos de proteínas (que incluyen células y fragmentos de células) se pueden detectar usando anticuerpos que unen
35 específicamente la proteína diana. Los analitos de carbohidratos se pueden detectar usando lectinas marcadas u otros agentes de unión a carbohidratos. Los analitos de ácidos nucleicos se pueden detectar usando ácidos nucleicos complementarios marcados de forma detectable o usando proteínas de unión a ácidos nucleicos. Las proteínas de unión a ácidos nucleicos ejemplares incluyen proteínas de unión a ADN bicatenario tales como bZIP, topoisomerasas, proteínas que contienen dedos de zinc, proteína con hélice-giro-hélice, nucleasas y otras; y proteínas de unión a ADN
40 monocatenario, ADN polimerasas y otras. Además, hemos desarrollado proteínas de unión novedosas, como se describe a continuación en esta solicitud.

Alternativamente, el antiligando puede estar sin marcar y a continuación se puede asociar con el marcador después de que se haya unido al analito unido. Por ejemplo, una IgG de cabra no marcada se puede asociar con un analito
45 unido por un agente de captura y a continuación detectar usando anticuerpos de IgG de ratón anticabra marcados de manera detectable. Como otro ejemplo, se pueden usar antiligandos conjugados a biotina y a continuación detectarlos usando marcadores detectables conjugados a estrepavidina.

En una realización diferente, una enzima unida (aunque no necesariamente ubicada) se puede detectar añadiendo un
50 sustrato que se puede convertir enzimáticamente para producir una señal detectable o un sustrato unido se puede detectar mediante la adición de una enzima y reactivos que producen una señal detectable. En algunos casos, el propio agente de captura puede experimentar un cambio conformacional después de unirse al analito para que se emita una señal detectable y/o para que se pueda detectar el complejo de analito-agente de captura.

55 Una combinación heterogénea de moléculas de detección de analitos, o reactivos de detección, se puede usar simultáneamente para detectar analitos unidos por agentes de captura. Las moléculas de detección de analitos ejemplares incluyen aptámeros; sondas de ácido polirribonucleico; sondas de ácido polidesoxirribonucleico; péptidos; proteínas; anticuerpos; enzimas funcionales o no funcionales; dominios de unión a sustratos; glucoproteínas; lipoproteínas; carbohidratos glucolípidos; receptores; dominios de unión a ligandos; ligandos; lípidos; colesterol;
60 esteroides; fármacos productos biológicos; antibióticos; antibacterianos; antivirales; antimicóticos; antiparasitarios; células de mamíferos y microbios; y de manera que dichas moléculas de detección de analitos heterogéneas se pueden marcar con uno o más marcadores detectables; donde la unión de uno o más tipos de moléculas de detección

de analitos a uno o más tipos de analitos inmovilizados por uno o más componentes de captura que pertenecen a una o más redes moleculares puede generar una señal o puede generar una señal mejorada; y puede indicar una prueba positiva.

- 5 Se apreciará que estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes, y que son posibles muchas otras estrategias. Por ejemplo, los analitos se pueden asociar con un marcador detectable antes de la inmovilización.

Se conocen numerosos marcadores detectables en la técnica, tales como etiquetas de afinidad colorimétricas, fluorescentes, radioactivas, luminiscentes, fosforescentes, enzimáticas (p. ej., fosfatasa alcalina, luciferasa) y similares.

- 10 En principio, se puede usar cualquier tipo de marcador detectable. Sin embargo, los más preferidos son los marcadores adecuados para la detección colorimétrica y/o fluorescente. Los marcadores visibles detectables a simple vista sin equipos especializados tienen ciertas ventajas. Los marcadores que emiten una señal sin la adición de sustratos o reactivos adicionales pueden proporcionar una lectura más rápida y menos costosa.

- 15 Los ejemplos de marcadores detectables fluorescentemente incluyen Cy3, Cy5, FITC, PE, Alexa, fluoresceína, fluoresceína-isotiocianato, Texas Red, rodamina, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente mejorada, lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, SyBR Green y similares. Los marcadores detectables colorimétricamente incluyen colorantes, oro o plata coloidales, perlas de látex coloreadas.

- 20 Una o más clases de moléculas de detección de analitos se pueden conjugar a una o más moléculas detectables tales como: enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, ATPasa, adenilato cinasa, betalactamasa, ureasa, lactasa, piruvato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, catalasa, fumarasa, superóxido dismutasa, dihidrofolato reductasa, ciclooxigenasa, cinasa, fosfatasa, luciferasa, citocromo P450 oxidasa y otras oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas; partículas ultrafinas tales como nanopartículas, nanocristales,

- 25 nanoagregados, nanopolvos y otras fabricadas de carbono, sílice, materiales cerámicos, polímeros, vidrio y materiales compuestos; fluoróforos tales como 9,10-difenilantraceno, 1-cloro-9,10-difenilantraceno, 2-cloro-9,10-difenilantraceno, 9,10-bis(feniletinil)antraceno, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, 2-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, 1,8-dicloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, 2,4-di-terc-butilfenil-1,4,5,8-tetracarboxinaftalenodiamida, rodamina B, 5,12-bis(feniletinil)naftaleno, violantrona, 16,17-(1,2-etilenodioxo)violantrona, 16,17-dihexiloxiviolantrona, 16,17-

- 30 butiloxiviolantrona, N,N'-bis(2,5-di-terc-butilfenil)-3,4,9,10-perilenedicarboximida, 1-N,N-dibutilaminoantraceno, yoduro de 6-metilacridinio, Cy3, Cy5, Cy7, Pacific Blue, FITC, PE, DiA, Nile Red, Total 1 y 3, Yoyo 1 y 3, SYBR Green, Sytox Orange, Popo1 y 3, Bobo1 y 3, Evoblu-30, DY-485, DY-500, DY-554, DY-633, DY-613, DY-590, DY-650, DY490XL, DY-520XL, DY-480XL, Alexa 488, Alexa 647, ProQ Emerald, ProQ Diamond, IRDye 700DX, Adams Apple Red 680, Adirondack Green 520, Yellow 580, Snake-Eye Red 900 y otros fluoróforos; marcadores dependientes de la

- 35 oxidación-reducción tales como 2,2'-bipiridina (complejo de Ru), nitrofenantrolina (complejo de Fe), ácido N-fenilantranílico, 1,10-fenantrolina (complejo de Fe), N-etoxicrisoidina, 2,2'-bipiridina (complejo de Fe), 5-6-dimetilfenantrolina (complejo de Fe), o-dianisidina, sulfonato sódico de difenilamina, difenilbenzidina, difenilamina, viológeno y otros; marcadores de oxidación-reducción dependientes del pH tales como 2,6-dibromofenol-indofenol sódico, 2,6-diclorofenol-indofenol sódico, o-cresol-indofenol sódico, tionina, azul de metileno, ácido

- 40 indigotetrasulfónico, ácido indigotrisulfónico, carmín de indigo, ácido indigomonosulfónico, fenosafranina, safranina T, rojo neutro y otros; colorantes visibles tales como azul brillante de Coomassie, Sypro Ruby, tinción de plata y otros; sustratos tales como luciferina, oxígeno, luminol, peróxido de hidrógeno, monofosfato de adenosina, difosfato de adenosina, trifosfato de adenosina, fosfato de para-nitrofenilo y otros; radioisótopos tales como tritio, carbono-14, fósforo-33, fósforo-32, tecnecio-99, molibdeno-99, azufre-35 y otros; polímeros tales como poliestirensulfonato y otros;

- 45 coloides tales como cristal coloidal, metal coloidal, partículas de oro coloidal de 10-60 nm, partículas de plata coloidal de 10-80 nm y otros; partículas magnéticas tales como hematita, acero inoxidable, cobre, hierro, magnetita, zinc, aleaciones, níquel, cobalto, gadolinio y otros; peróxido de hidrógeno y éster oxalato de fenilo.

- Los marcadores detectables sobre las moléculas de detección de analitos se pueden conjugar independientemente con colorantes tales como: tetraclorhidrato de 3-3'-diaminobencidina; cloruro de 1,9-azul de dimetilmetileno; púrpura de bromocresol; azul de bromofenol; azul de bromotimol; di-canforquinona; fluoresceína; violeta de genciana; almáciga; tinción de Leishman; violeta de metilo; cloruro de nitrozultetrazolio; rojo de fenol; ácido rosólico; azafrán; Szechrome; naranja de tiazol; cloruro de azul de metileno; colorantes de clorotriazina tales como, pero no limitados a, Cibacron Blue 3GA, Procion Red H-E7B, Procion Green H-4G y Yellow H-E3G; colorantes de triazina; tinciones de hematoxilina;

- 55 eosina; fucsina ácida; ácido pícrico; tinción de Wright; aldehído-fucsina; amarillo de metanilo; sal de plata; azul de toluidina; tinción de ácido peryódico de Schiff; tinción tricrómica de Masson; tinción tricrómica de Mallory; tinción elástica de Weigert; tinción tricrómica azán de Heidenhains; tinción de plata; tinción de orceína; Sirius Red F3BA; rojo nuclear rápido; azul de alcán; yodo; azul rápido Luxol; rojo neutro; Sudan Black B; Oil Red O; Nile Red; violeta cristal y otros colorantes visibles.

- 60 Los procedimientos para conjugar o asociar o incorporar de otro modo marcadores en un antiligando (por ejemplo) son ampliamente conocidos en la técnica.

Los procedimientos para detectar una señal de un marcador inmovilizado son igualmente conocidos y son dependientes de la naturaleza del marcador. Se dispone de muchos dispositivos para tal detección, que incluyen transiluminadores, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y similares.

5

Detección de múltiples analitos

Las redes moleculares son herramientas potentes, en parte, porque están bien adaptadas para la detección simultánea de múltiples analitos diferentes. En principio, se puede usar un único sistema de detección para detectar cada uno de
10 varios analitos diferentes unidos por una red. Por ejemplo, en una red en la que los agentes de captura unen los "analitos W, X, Y y Z", cada uno de los antiligandos del sistema de detección se podría marcar con el mismo marcador detectable. Esto haría posible determinar si ninguno, o al menos uno, de los analitos, habían sido capturados, pero no permitiría una discriminación fácil entre la unión de algunos analitos (p. ej., W e Y) y no otros (p. ej., X y Z). Esto se puede abordar localizando restos de captura en capas particulares. Por ejemplo, si la capa 1 contiene los analitos W
15 y X, la capa 2 contiene los analitos X e Y, y la capa 3 contiene los analitos Y y Z, si se observa una señal detectable de unión solo en la capa 3, se puede deducir que la muestra contiene el analito Z, pero no los analitos W, X o Y. Sin embargo, esto requiere localizar la señal en una capa particular, lo cual puede no ser conveniente.

Alternativamente, los analitos W, X, Y y Z se pueden marcar diferencialmente (p. ej., con un colorante de diferente
20 color) y la presencia o ausencia de un analito se puede deducir en base a los marcadores observados. Se apreciará que las dos estrategias (marcado diferencial y deducción basada en la unión en una capa particular) se pueden combinar. Por último, las muestras se pueden ensayar usando múltiples redes, tal como usando un dispositivo con múltiples redes. Por ejemplo, se puede usar un dispositivo con tres redes multicapa en el que la primera red tiene agentes de captura para los analitos W y X, la segunda red tiene agentes de captura para los analitos X e Y, y la
25 tercera red tiene agentes de captura para los analitos Y y Z.

Mezcla colorimétrica se refiere a los espectros de reflexión que emanan de una o más fuentes moleculares en presencia de luz. Dicha reflexión puede ser de naturaleza regular o difusa y puede ser de dispersión única o múltiple. Cuando las señales detectables están unidas en diferentes capas de redes multicapa (redes estratificadas o apiladas),
30 las moléculas coloreadas detectables unidas conjugadas a moléculas de detección de analitos pueden producir un color diferente; donde se puede producir una mezcla colorimétrica; donde se puede producir una o más reacciones metacromáticas; de manera que la presencia de marcadores de detección del color en un volumen de prueba puede ser un resultado positivo de la prueba; y de manera que dichas moléculas de detección de analitos coloreadas se pueden unir a uno o más analitos inmovilizados por uno o más componentes de captura retenidos mediante reticulación
35 dentro de una o más redes moleculares; y de manera que dichas moléculas de detección de analitos coloreadas se pueden unir al analito de una manera densa y compacta; y de manera que dichas moléculas de detección de analitos coloreados se pueden magnificar mediante lentes; se pueden polarizar mediante polarización magnética; se pueden detectar mediante sensores; y se pueden evaluar visualmente por unidad de volumen de prueba; y se pueden evaluar visualmente antes que con los procedimientos convencionales; y pueden indicar una prueba positiva más rápido que
40 muchos procedimientos convencionales.

Se describe una o más redes moleculares y/o una disposición de partes de redes moleculares; de manera que la disposición de las moléculas de captura y las propiedades químicas superficiales específicas correspondientes de las moléculas de captura y las preferencias de unión correspondientes para analitos específicos se pueden disponer en
45 secciones dentro de la red molecular; de manera que la unión e inmovilización de analitos específicos a moléculas de captura específicas puede generar un patrón de detección; y de manera que el patrón de detección se puede determinar mediante la inmovilización de moléculas de detección de analitos marcadas específicamente; y de manera que dichas moléculas de detección marcadas pueden proporcionar una o más señales; y de manera que el patrón y/o la disposición y/o el momento de emisión de la señal pueden proporcionar información en una prueba binaria o analítica,
50 puede, en combinación, producir una señal positiva diferente; puede producir una señal intensificada.

El grado de unión de las moléculas de detección de analitos a la red molecular se puede monitorizar mediante fotografía; visualmente o usando sensores del dispositivo de prueba se puede supervisar el grado de unión y/o la intensidad de unión de las moléculas de detección de analitos a la red molecular mediante: la frecuencia vibratoria y
55 cambios de la misma; la conductancia térmica y cambios de la misma; la producción de calor y cambios de la misma; la iridiscencia y cambios de la misma; la conductancia eléctrica y cambios de la misma; el potencial eléctrico y cambios del mismo; los campos magnéticos y cambios de los mismos; la producción de luz y cambios de la misma; la difracción de la luz y cambios de la misma; la absorbancia colorimétrica y cambios de la misma; el espectro cromático y cambios del mismo; el potencial electromagnético y cambios del mismo; el potencial electroquímico y cambios del mismo; el
60 espectro cromático electroquímico y cambios del mismo; la fosforescencia y cambios de la misma; la absorbancia de fluorescencia y cambios de la misma; la quimioluminiscencia y cambios de la misma; la electroluminiscencia y cambios de la misma; la sonoluminiscencia y cambios de la misma; la mecanoluminiscencia y cambios de la misma; la

piezoluminiscencia y cambios de la misma; la fractoluminiscencia y cambios de la misma; la termoluminiscencia y cambios de la misma; la triboluminiscencia y cambios de la misma; el potencial de oxidación-reducción y cambios del mismo; el pH y cambios del mismo; y otros procedimientos para detectar o monitorizar la unión de moléculas de detección por unidad de volumen de red molecular en un área de realización de pruebas; y de manera que la señal se puede mejorar mediante: la presencia de un amplificador; el tiempo de incubación; calor; luz; fotones; ácido; base; lentes de magnificación; corriente eléctrica; filtros; polarización y otros; y de manera que la señal se puede transmitir a, y se puede propagar mediante: una unidad central de procesamiento; procesadores; microprocesadores; unidades de lógica aritmética; almacenamiento de datos; memorias rápidas; transmisores; moduladores, dispositivos de almacenamiento; equipos informáticos; USB; ordenadores personales; ordenadores simples; ordenadores integrados; redes de ordenadores; ethernet y otros; y de manera que las señales se pueden analizar con algoritmos convencionales y se pueden analizar con programas informáticos convencionales.

Por "sonoluminiscencia" se entiende la emisión de una ráfaga breve de luz de las burbujas que implosionan en un líquido cuando es excitado mediante sonido. En un campo generado acústicamente, una burbuja se mueve hasta las etapas finales de colapso.

Por "mecanoluminiscencia" se entiende la emisión de luz que resulta de cualquier acción mecánica sobre un sólido. Las acciones mecánicas pueden incluir, pero no se limitan a, la aplicación de ultrasonidos, fuerza de tracción, fuerza de empuje, fuerza de torsión y otras.

Por "fractoluminiscencia" se entiende la emisión de luz que resulta del esfuerzo mecánico aplicado a las moléculas para producir fracturas moleculares. También se puede aplicar a la interacción molecular, de manera que se pueden producir fracturas dentro y entre pares de interacción.

Por "termoluminiscencia" se entiende la emisión de luz que resulta de una reacción entre especies atrapadas en una matriz rígida donde la luz se libera como resultado de un aumento de la temperatura.

Por "triboluminiscencia" se entiende la emisión de luz que resulta de frotar la superficie de ciertos sólidos. También se puede producir cuando se trituran sólidos.

Por "piezoluminiscencia" se entiende la emisión de luz que resulta de un cambio en la presión de ciertos sólidos.

Por "celda fotovoltaica" se entiende uno o un conjunto de materiales, tales como silicio cristalino, telurio de cadmio y seleniuro de cobre e indio, que pueden convertir la energía luminosa en electricidad de corriente continua.

Por "metacromático" se entiende un cambio de color que puede ser el resultado de la presencia o ausencia de calor.

Por "mezcla colorimétrica" se entiende los espectros de reflexión que emanan de una o más fuentes moleculares en presencia de luz. Dicha reflexión puede ser de naturaleza regular o difusa y puede ser de dispersión única o múltiple.

En una realización, un dispositivo puede detectar uno o más analitos diferentes en una muestra mediante la producción de luz a partir de una reacción enzimática. De manera que los analitos se pueden unir a una o más redes moleculares por volumen de prueba y pueden unir una o más clases de moléculas de detección de analitos por volumen de prueba. Dichas moléculas de detección de analitos se pueden conjugar a una o múltiples enzimas productoras de luz y se pueden inmovilizar sobre una o más redes moleculares por volumen de prueba. Una reacción productora de luz se puede producir cuando está presente un sustrato enzimático. Una reacción productora de luz se puede amplificar cuando está presente un catalizador. Una reacción productora de luz se puede amplificar cuando están presentes uno o más dispositivos de aprovechamiento de luz. Dicha luz de una reacción productora de luz se puede enfocar, amplificar y dirigir cuando están presentes uno o más dispositivos de aprovechamiento de la luz, tales como fibras ópticas, fotodiodos, semiconductores y otros. Dicha luz de una reacción productora de luz se puede detectar mediante sensores tales como celdas solares, películas solares, tubos fotomultiplicadores y otros sensores de fotones que pueden generar tensión o corriente a partir de energía fotónica.

En otra realización, un dispositivo puede detectar uno o más analitos diferentes en una muestra mediante la producción de luz de una reacción química. De manera que los analitos se pueden unir a una o más redes moleculares por volumen de prueba y pueden unir una o más clases de moléculas de detección de analitos por volumen de prueba. Dichas moléculas de detección de analitos se pueden conjugar a uno o múltiples colorantes productores de luz y se pueden inmovilizar sobre una o más redes moleculares por volumen de prueba. Una reacción productora de luz se puede producir cuando están presentes una o más moléculas nucleófilas. Una reacción productora de luz se puede amplificar cuando está presente un catalizador. Una reacción productora de luz se puede amplificar cuando están presentes uno o más dispositivos de aprovechamiento de luz. Dicha luz de una reacción productora de luz se puede enfocar, amplificar y dirigir cuando están presentes uno o más dispositivos de aprovechamiento de la luz, tales como

fibras ópticas, fotodiodos, semiconductores y otros. Dicha luz de una reacción productora de luz se puede detectar mediante sensores tales como celdas solares, películas solares, tubos fotomultiplicadores y otros sensores de fotones que pueden generar tensión o corriente a partir de energía fotónica.

5 F. Fabricación de redes moleculares con la especificidad deseada

La red molecular está particularmente bien adaptada para detectar múltiples analitos diferentes. Se apreciará que los analitos particulares unidos y detectados por una red o dispositivo particular variarán con el uso previsto del artículo.

A modo de ejemplo, cuando se desea detectar la presencia de un patógeno bacteriano infeccioso, se puede usar una única red o dispositivo para detectar múltiples indicios de infección tales como, por ejemplo, la presencia de proteína del patógeno, la presencia de ácidos nucleicos del patógeno, la presencia de células del patógeno, la presencia de carbohidratos del patógeno, la presencia de una respuesta inmunitaria del hospedador a la infección y similares. Detectando simultáneamente múltiples indicios independientes de infección, las redes moleculares permiten realizar determinaciones con mayor confianza.

Las redes moleculares también se pueden adaptar para inmovilizar y/o detectar simultáneamente analitos de tamaños diferentes. En algunos casos, lo que se inmoviliza son analitos pequeños o fragmentos de analitos más grandes. En otros casos, los analitos son analitos más grandes, complejos o células que contienen ciertos analitos. Como las capas superiores están menos limitadas estéricamente debido a la presencia de menos reticulaciones, son más accesibles para analitos más grandes. Por lo tanto, los analitos más pequeños y los fragmentos se unen a las subcapas de una red molecular, mientras que los analitos más grandes, los complejos y las células se unen a las capas superiores de una red molecular. Por tanto, las redes se pueden usar para la unión estratificada de analitos debido a la separación de las moléculas de captura interconectadas dentro de una o más capas de una red molecular o mediante la colocación de redes moleculares adyacentes. Un ejemplo es la inmovilización/detección simultánea de proteínas de esporas fúngicas, alérgenos, que solo incluyen un epítipo del alérgeno, y un fragmento de un alérgeno.

Se deben abordar al menos cuatro elementos de diseño principales en el diseño de una red molecular. Estos son (en orden arbitrario):

- Primero, se debe seleccionar un conjunto particular de analitos para los que el ensayo proporcionará información útil a un médico u operador.
- Segundo, se deben seleccionar agentes de captura para detectar la presencia o ausencia del conjunto particular de analitos.
- Tercero, se deben seleccionar los sistemas de detección para cada analito.
- Cuarto, se deben seleccionar enlazadores y se deben determinar las composiciones particulares de enlazadores y agentes de captura de cada capa de la red.

Selección de analitos

En el contexto del diagnóstico, se pueden seleccionar analitos para identificar y/o diferenciar infecciones causadas por diferentes agentes infecciosos. Preferiblemente, se seleccionan múltiples analitos para los (o cada uno de los) agentes infecciosos. En algunas realizaciones, se detectan al menos uno, dos, tres o los cuatro marcadores del patógeno siguientes: (1) proteína del patógeno, (2) ácido nucleico del patógeno, (3) polisacárido del patógeno, (4) lípido del patógeno. En algunas realizaciones, se detectan al menos uno, dos, tres o los cuatro marcadores del hospedador siguientes: (1) activación del complemento; (2) anticuerpos antipatógeno; (3) interferón; (4) proteínas de unión a lectina; (5) proteínas de la fase aguda; (6) 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dGUA); (7) péptidos antimicrobianos (AMP); (8) proteína de unión a LPS (LBP). La TABLA 4 proporciona ejemplos de analitos que se pueden usar para detectar infecciones, así como los agentes de captura ejemplares correspondientes. Se reconocerá que la TABLA 4 se facilita con fines ilustrativos y no está destinada a ser exhaustiva.

TABLA 4

AFECCIÓN O AGENTE INFECCIOSO	ANALITOS	AGENTE DE CAPTURA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Peptidoglucano de <i>S. aureus</i> ; <i>SsaA</i> de <i>S. aureus</i> ; TSST-1; α -toxina; <i>polisacáridos capsulares</i> de <i>S. aureus</i> ; secuencia de ADN <i>nuc</i> ;	Anticuerpos contra (1) peptidoglucano de <i>S. aureus</i> ; (2) <i>SsaA</i> de <i>S. aureus</i> ; (3) TSST-1; (4) α -toxina; (5) proteína de unión a lectina; proteína del complemento C3; péptido de unión a ADN 1; péptido de unión a ADN 2
<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina	PBP2a de <i>S. aureus</i> ; secuencia de ADN <i>mec A</i> ; secuencia de ADN <i>mec I</i> ; secuencia de ADN <i>mec R</i> ;	Anticuerpos contra PBP2a de <i>S. aureus</i> ; péptido de unión a ADN 1; péptido de unión a ADN 2; péptido de unión a ADN 6
Vírico general	Interferón-alfa Interferón-beta IPS-1 (MAVS) Viperina (cig5)	Anticuerpos contra (1) interferón-alfa; (2) interferón-beta; (3) IPS-1 (MAVS); (4) viperina (cig5)
Sepsis	Lípido A Lipopolisacárido Peptidoglucano Ácido teicoico secuencia de ADN de 16s Proteína de unión a LPS (LBP) Procalcitonina TREM-1 soluble	Anticuerpos contra (1) lípido A; (2) peptidoglucano; (3) ácido teicoide; (4) lipopolisacárido; (5) proteína de unión a LPS (LBP); (6) procalcitonina; (7) sTREM-1 Péptido de unión a ADN 1 Péptido de unión a ADN 2 Péptido de unión a ADN 6
Fúngico general	Quitina Quitinasa Galactomanano (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano Anfotericina Toxinas fúngicas Secuencias de ADNr de 18 s	Anticuerpos contra (1) quitina; (2) quitinasa; (3) galactomanano; (4) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano; (5) anfotericina; (6) toxinas fúngicas; Péptido de unión a quitina 1; Péptido de unión a quitina 2; Péptido de unión a ADN 7
Bacteriano	Lipopolisacáridos (gramnegativas) negative); Lípido A (gramnegativas) Proteína de unión a LPS (respuesta inmunitaria contra gramnegativas) Lipopéptido acilado y (micoplasmas gramnegativas) Peptidoglucano (grampositivas) Ácido teicoico (grampositivas) Proteínas de unión a la penicilina (grampositivas)	Anticuerpos contra (1) lipopolisacárido; (2) lípido A; (3) proteína de unión a LPS (LBP); (4) peptidoglucano; (5) ácido teicoico; (6) proteínas de unión a la penicilina; (7) micoloil-arabinogalactano (8) arabinomanano; (9) HSP65; Péptido de unión a ADN 1; Péptido de unión a ADN 2 Péptido de unión a ADN 6

AFECCIÓN O AGENTE INFECCIOSO	ANALITOS	AGENTE DE CAPTURA
	Micoloil-arabinogalactano (micobacterias) Arabinomanano (micobacterias) HSP65 (micobacterias) Secuencias de la región espaciadora de ARNr de 16S-23S (micobacterias) <i>Secuencias de ADN hsp65 (micobacterias)</i>	

Selección de agentes de captura y sistemas de detección

En la selección de agentes de captura y sistemas de detección, la especificidad para un analito particular puede provenir del agente de captura, el sistema de detección o ambos. Véase la TABLA 5.

TABLA 5

Agente de captura	Sistema de detección
Inespecífico o parcialmente específico <i>Ejemplo: proteína de unión a ADN inespecífica</i>	Específico <i>Ejemplo: sonda de ácido nucleico marcado</i>
Específico <i>Ejemplo: anticuerpos contra polisacáridos capsulares</i>	Inespecífico o parcialmente específico <i>Ejemplo: proteína del complemento C3 y proteínas de unión a lecitina</i>
Específico <i>Ejemplo: el anticuerpo une un epítipo de analito proteico</i>	Específico <i>Ejemplo: el anticuerpo une un segundo epítipo de analito proteico</i>

Selección de enlazadores y composiciones particulares de enlazadores y agentes de captura de cada capa

10

El cuarto elemento de diseño se puede seleccionar en base a una combinación de directrices y pruebas empíricas amplias. Típicamente, las combinaciones de agentes de captura se seleccionan para proporcionar redundancia en la detección de un patógeno u otro analito. Por ejemplo, una red para la detección de infección bacteriana puede detectar bacterias completas, una proteína bacteriana, un ácido nucleico bacteriano y un lipopolisacárido bacteriano, todos ellos indicativos de la infección. Esta redundancia proporcionó mayor confianza y sensibilidad superior al ensayo.

15

Normalmente, en redes multicapa en las que la porosidad varía de capa a capa, la porosidad tiende a reducir el movimiento desde el exterior de la red hacia el interior, o el movimiento desde un extremo de la red (p. ej., el superior) al otro (p. ej., el inferior) para que la muestra que fluye a través de la red fluya primero a través de capas de porosidad superior y después a través de capas de porosidad progresivamente inferior. Generalmente, la concentración de

20

agentes de captura viene impuesta por la concentración máxima de analito en la muestra clínica u otra y por la sensibilidad del sistema de detección.

Se requieren pruebas empíricas para diseñar una red molecular con propiedades adecuadas. Las pruebas empíricas pueden implicar:

25

(a) crear numerosas redes moleculares candidatas diferentes para cada conjunto contemplado de agentes de captura combinando una pluralidad de alícuotas individuales del conjunto de agentes de captura con una pluralidad de alícuotas individuales de uno o más conjuntos de agentes de enlace para producir una pluralidad de redes moleculares con composiciones diferentes, donde, opcionalmente, la concentración de agentes de captura y/o enlazadores individuales varía de red molecular a red molecular;

30

(b) evaluar la capacidad de cada red para unir analitos, donde dicha evaluación comprende poner en contacto las redes con una muestra que contiene los analitos, típicamente durante 5 a 60 minutos, y determinar qué redes unen más eficientemente dichos analitos, identificando de ese modo una o más redes principales;

35

(c) combinar una o más de dichas redes principales con uno o más segundos conjuntos de agentes de captura, que pueden ser los mismos que el primer conjunto, añadir uno o más agentes de enlace en condiciones en las que se forma una red multicapa y evaluar la capacidad de cada red multicapa para unir los primeros y segundos analitos, donde dicha evaluación comprende poner en contacto las redes multicapa con una muestra que contiene los analitos
5 y determinar qué redes multicapa unen más eficientemente dichos analitos.

(d) repetir la etapa (c) para añadir múltiples capas de la red;

(e) evaluar el ruido de fondo inespecífico y la sensibilidad de las redes candidatas y seleccionar aquellas con ruido de
10 fondo bajo y sensibilidad aceptables.

A pesar de la amplia exposición anterior, se apreciará que hay numerosos factores distintos implicados en el diseño de un sistema de diagnóstico u otro sistema de ensayo.

15 F. Estructura tridimensional de las redes moleculares

Las redes moleculares descritas en esta solicitud se pueden entender como estructuras tridimensionales con una composición pseudoaleatoria que incluye al menos agentes de captura y agentes de enlace. La estructura y las dimensiones de las redes moleculares se pueden entender mejor por referencia a ciertas configuraciones ejemplares
20 que pueden adoptar las redes moleculares.

La **figura 35** es un diagrama esquemático de una red molecular formada sobre la base 350, una base de poliestireno que tiene una superficie superior 352. La red molecular incluye una única especie de agentes de captura de anticuerpo monoclonal, varios de los cuales están representados. Mientras que los agentes de captura son idénticos en cuanto a
25 su estructura, su relación, o enlace, con la superficie 352 varía. El agente de captura 354 se puede considerar un agente de captura de primer orden, ya que está conectado a la superficie 352 por una vía de enlace más corta (a través del enlazador 356) que no incluye ningún otro agente de captura. El agente de captura 354 está enlazado a la superficie 352 por vías alternativas que no incluyen uno o más agentes de captura distintos (p. ej., agente de captura 358); sin embargo, el enlace que tiene el menor número de agentes de captura intermedios se define como el enlace
30 más corto y define el orden de un agente de captura, con respecto a la superficie de la base. Por tanto, el agente de captura 3510 es un agente de captura de segundo orden, ya que su enlace más corto incluye un agente de captura adicional (agente de captura 354 o 358). Similarmente, el agente de captura 3512 es un agente de captura de tercer orden que tiene un enlace más corto que incluye otros dos agentes de captura.

La **figura 36** representa una vista esquemática en sección transversal de una red molecular bicapa. La red está formada sobre una base 360, que tiene una superficie superior 362. A diferencia de la base 350 representada en la **figura 35**, la base 360 de la **figura 36** incluye dos regiones distinguibles: la región de poliestireno 364 y la subcapa elevada 366, formada a partir de albúmina sérica bovina reticulada con formaldehído que se ha permitido que se deposite. Por tanto, la superficie superior 362 es sustancialmente plana en algunas porciones y convexa en la región
40 por encima de la subcapa 366. En realizaciones alternativas (no representadas), una base que tiene características topográficas similares a la superficie superior 362 se puede ver afectada directamente en la base formada por un único material, tal como poliestireno microtexturizado. Volviendo a la **Figura 36**, se forma una primera capa 368 de la red molecular sobre 366. La capa 368 incluye una pluralidad de agentes de captura de ácido nucleico 3610. Se forma una segunda capa 3612 de la red molecular sobre la primera capa 368. La segunda capa 3612 incluye varios anticuerpos
45 monoclonales de IgG estructuralmente idénticos, representados como flechas. Las IgG son agentes de captura que tienen simetría bilateral, en la que la orientación es relevante para sus propiedades de captura. Como se representa, las puntas de cada flecha indican el extremo de la región variable de la IgG y la cola de cada flecha representa el extremo de la región constante de cada IgG. Aunque no se muestra, la primera y segunda capas de la red molecular tienen forma circular, cuando se visualizan desde arriba, en una vista en planta.

Debido a la naturaleza pseudoaleatoria de las redes moleculares, la segunda capa 3612 incluye agentes de captura que tienen orientaciones diferentes, lo que se puede entender más fácilmente por referencia al diagrama cartesiano de tres ejes 3614. Por ejemplo, la IgG 3612 representa tres ejes: eje y, que tiene una dirección positiva hacia la derecha de la figura; eje z, que tiene una dirección positiva hacia la parte superior de la figura; y eje x, que tiene una dirección
55 positiva hacia el exterior (hacia el observador) del plano de la figura. Por tanto, el plano de visualización de la sección transversal se puede entender como el plano y-z, con plano x-y (y plano x-z) que se prolongan hacia el exterior (hacia el observador) y hacia el interior (lejos del observador) del plano de visualización.

En lo que respecta al diagrama cartesiano 3614, la IgG 3614 se orienta en la dirección y positiva. Por el contrario, la
60 IgG 3616 se orienta en la dirección y negativa, rotada 180° de la IgG 3614, en cualquier plano. La IgG 3618 se orienta en la dirección z positiva, rotada 90° en sentido antihorario de la IgG 3614. La IgG 3620 se orienta en la dirección z negativa, rotada 90° en sentido horario de la IgG 3614. IgG 3622 se orienta en la dirección x positiva, hacia el exterior

del plano de visualización y rotada 90° de la IgG 3614, en el plano x-y. La IgG 3624 se orienta en la dirección x negativa, hacia el exterior del plano de visualización y también rotada 90° de la IgG 3614, en el plano x-y.

Por tanto, se entiende que la pseudoaleatoriedad de las redes moleculares permite que los agentes de captura
5 individuales de la red molecular se orienten en cualquier dirección.

La **figura 37** representa una vista esquemática en sección transversal de una red molecular tricapa 374, formada sobre la base 370, una base de poliestireno que tiene una superficie superior 372. La red molecular 374 está formada en un capilar que tiene un flujo de sustancialmente unidireccional de la muestra, como muestra la flecha 376. Cada
10 una de las tres capas de la red molecular 374 está formada para que presente un área superficial grande al flujo de muestra. La primera capa 378 incluye agente de captura de ácido nucleico 3714 específico para una primera diana. La segunda capa 3710 incluye agentes de captura de ácido nucleico 3714 y también agente de captura de proteína 3716 específico para una segunda diana. El agente de captura de ácido nucleico 3714 y el agente de captura de proteína 3716 de la tercera capa 3712 también incluyen agentes de captura de IgG 3718 específicos para una tercera
15 diana. Por tanto, la red molecular 374 permite la captura secuencial y dirigida de dianas de interés en la dirección del flujo. En realizaciones alternativas, se pueden usar redes moleculares similares a la red molecular 374 en un dispositivo de filtración.

La **figura 38A** representa una red molecular pentacapa 380 similar a la red molecular 374 de la **figura [BH3]**. Sin embargo, el flujo de muestra en la **figura 38** no es unidireccional; sino que las moléculas de la muestra se mueven hacia la red 380 mediante difusión multidireccional. Por tanto, la red molecular 380 está formada por dos una capa exterior 382, una capa intermedia 384 y una capa interior 386.

La **figura 38B** es una vista en planta de la red molecular 380. Como se muestra, la capa interior 386 es sustancialmente
25 circular. La capa intermedia 384 es de forma sustancialmente anular y está dispuesta alrededor de la capa interior 386. Por último, la capa intermedia 382 es forma anular y está dispuesta alrededor de la capa intermedia 384.

La **figura 39** representa tres vistas en sección transversal de tres redes moleculares diferentes, 390, 392 y 394. Cada una de las redes es de forma sustancialmente esférica.

30 La red molecular 390 es una red molecular monocapa, formada sobre perlas de poliestireno 396. La capa de la red 398 incluye agentes de captura 3910.

La red molecular 392 es una red molecular bicapa, formada sin una base de red. La red interior 3912 es una red
35 molecular autosustentable y prácticamente esférica que tiene agentes de captura 3914 que son específicos para una primera diana. Se forma una segunda capa de la red molecular 3916 sobre la capa de la red interior 3912. La segunda capa de la red molecular 3916 incluye moléculas de captura 3918 que son específicas para una segunda diana.

La red molecular 394 es una red molecular tricapa útil para la contención y/o administración de un compuesto. La
40 primera capa de la red 3920 se forma alrededor de un bolo 3922 de un compuesto, tal como un ingrediente farmacéutico activo (API). En realizaciones alternativas, el API se puede entremezclar con una o más capas de la red molecular, en lugar de ser proporcionado como un bolo independiente. La primera capa de la red 3920 incluye agentes de captura 3924 específicos para el API. La primera capa de la red 3920 sirve al menos para varios fines: protección del bolo de API 3922 del ambiente externo; contención del bolo de API 3922 y liberación controlada del bolo de API
45 3922. La segunda capa de la red 3926 incluye agentes de captura 3928, específicos para una diana externa. La segunda capa de la red 3926 puede funcionar como un filtro dirigido a compuestos en el medioambiente que pueden ser perjudiciales para el API. La tercera capa de la red 3930 incluye agentes de captura 3932, específicos para una diana externa que es indicativa de una ubicación de interés (p. ej., proteínas específicas para un órgano o una ubicación diana en una placa de ensayo *in vitro*).

50 IV. USO DE REDES MOLECULARES

Las redes moleculares son útiles como medio de fijación a analitos específicos. Tales redes moleculares se pueden usar para capturar e inmovilizar analitos específicos para que se puedan detectar por otros medios. Alternativamente,
55 estas redes moleculares tienen agentes de captura específicos de los analitos con propiedades que cambian tras la unión al analito.

Las redes moleculares tienen amplia aplicación en el diagnóstico médico, tal como la determinación inmediata de la presencia y naturaleza de un agente infeccioso, la detección de signos de cáncer, inflamación y enfermedades
60 crónicas, la determinación de sensibilidad a los fármacos, los diagnósticos veterinarios y similares. En esta aplicación, una muestra biológica (p. ej., sangre, orina, saliva, heces, exudado de heridas, etc.) se pone en contacto con una o más redes moleculares y se determina la presencia o ausencia de uno o más analitos.

Además de las aplicaciones de diagnóstico médico, las redes moleculares de la invención se pueden usar para otros tipos de detección de analitos, que incluyen la realización de pruebas de alimentos, agua y medioambientales (p. ej., para detectar contaminantes químicos o biológicos), la evaluación de amenazas biológicas y similares. Las redes moleculares también se pueden usar para la filtración por afinidad de sangre para eliminar fármacos, células autorreactivas, productos celulares, toxinas, patógenos o factores inmunitarios, y para el cribado de fármacos.

Las muestras se pueden procesar antes de su aplicación a una red molecular. Por ejemplo, las muestras se pueden romper mediante rotura mecánica, enzimática o química. Los tejidos, las células u otros complejos de moléculas se pueden procesar usando rotura mecánica, enzimática y química para hacer que los analitos de interés puedan ser unidos por la red. Por “rotura mecánica” se entiende un procedimiento mecanizado para romper tejidos, células u otros complejos de moléculas para liberar las moléculas constituyentes, p. ej., mediante molienda, sonicación, etc. Por “actividad o rotura enzimática” se entiende un procedimiento para romper tejidos, células u otros complejos de moléculas para liberar las moléculas constituyentes usando enzimas. Por “exposición a productos químicos o rotura química” se entiende un procedimiento para romper tejidos, células u otros complejos de moléculas para liberar las moléculas constituyentes mediante productos químicos tales como oxidantes, agentes reductores, detergentes, sales, calor, enzimas, fenol/cloroformo, nucleófilos y otros agentes. Las preparaciones de las muestras se pueden procesar mediante filtración y centrifugación y similares. En algunas realizaciones, la preparación de la muestra se lleva a cabo en un dispositivo que contiene una o más redes moleculares.

En algunas realizaciones, una muestra es rota por una red molecular, tal como la red más superior en una red molecular estratificada o la primera red en un dispositivo que contiene una serie de redes moleculares. Por ejemplo, la red puede ser una red de lavado y puede contener una combinación de detergentes; disolventes; ácidos; bases; tensioactivos; sales; agentes reductores, agentes oxidantes y otras moléculas; y se puede usar para lavar muestras; de manera que dicha red de lavado puede lisar; unir; degradar; debilitar la integridad estructural de: células de mamíferos, protozoos, bacterias, hongos, plantas, virus y productos de los mismos; y de manera que dicha red de lavado puede liberar proteínas, péptidos y otras moléculas orgánicas solubles de complejos moleculares más grandes dentro de alimentos, fluidos, tejidos o muestras medioambientales.

Con fines de diagnóstico, la red molecular básica es una que une analitos (p. ej., “redes de unión de analitos”). Sin embargo, también se pueden usar “redes auxiliares” con otras funciones, por ejemplo, para el procesamiento de muestras. Las redes auxiliares se pueden configurar como una o más capas en una red multicapa. Alternativamente, las redes auxiliares se pueden usar en serie en un circuito de múltiples redes (algunas o todas pueden ser redes multicapa). Por ejemplo, y sin limitación, una muestra biológica podría pasar a través de una red de lisis para lisar las células, una red de exclusión por tamaños para retirar las células no lisadas o residuos, y a continuación una red multicapa de unión de analitos en la que los analitos son unidos y detectados. Ejemplos de redes auxiliares son las redes de lisis, redes de lavado, redes de exclusión por tamaños y redes enzimáticas.

Una “red de lisis” es una red molecular que contiene moléculas capaces de lisar células de mamíferos y microbios, tales como lisozima, detergente, quelantes, perforinas, complejo de ataque a la membrana, sales y otras moléculas capaces de citólisis.

Una “red de lavado” es una red molecular que contiene un agente tamponador y/o una mezcla de sales, pH, detergentes, quelantes, metales, proteínas, polinucleótidos, carbohidratos y/o lípidos, que puede estar ubicada en un dispositivo. También se puede usar para unir o inmovilizar moléculas de la muestra inespecíficamente y se puede usar para retirar o lisar células de una muestra.

Una “red de exclusión por tamaños” es una red molecular que contiene moléculas que están dispuestas de manera que generan tamaños de poro irregulares entre las moléculas. Los tamaños de poro se generan en parte por la longitud y naturaleza de los brazos reactivos de los reticulantes químicos y por las propiedades químicas superficiales de las moléculas vecinas. La forma física y el tamaño de las moléculas vecinas también contribuyen al tamaño de los poros.

Una “red enzimática” es una red molecular que contiene uno o más tipos de enzimas que pueden tener una o más especificidades por el sustrato. La red enzimática también puede contener cofactores esenciales para las enzimas. La finalidad de la red enzimática es interactuar con un sustrato específico en la muestra y generar el producto correspondiente, que se puede detectar cuando se inmoviliza sobre una red posterior, tal como una red de selección positiva.

Las redes de selección negativa y redes de selección positiva son tipos de redes de unión de analitos. Una “red de selección negativa” es una red molecular que contiene una mezcla de sales, detergentes, quelantes, metales, proteínas, polinucleótidos, carbohidratos y/o lípidos, fármacos, antibióticos y otras moléculas, que puede estar ubicada en un dispositivo. También se puede usar para unir o inmovilizar moléculas de la muestra en base a la ausencia de

propiedades químicas superficiales, afinidades o propiedades específicas y se puede usar para inmovilizar subconjuntos de células de una muestra. Una "red de selección positiva" es una red molecular que contiene moléculas de captura que inmovilizan específicamente analitos específicos de una muestra. Dicha red puede estar ubicada en un dispositivo. También se puede usar para unir o inmovilizar moléculas de la muestra en base a la presencia de

5 propiedades químicas superficiales, afinidades o propiedades específicas y se puede usar para inmovilizar subconjuntos de células de una muestra.

Se puede usar cualquier cantidad de formatos para poner en contacto la muestra y la una o más redes moleculares, así como para las etapas de lavado y detección. En una realización, se fabrican redes en pocillos de una placa de

10 microtitulación y se usan transferencias de fluido manuales o robóticas convencionales para realizar el ensayo. En otra realización, se usa un formato de tira reactiva en el que la una o más redes se fijan a un sustrato que se pone en contacto con la muestra y los reactivos de detección. Otros formatos incluyen, sin limitación, chips, cartuchos, tarjetas, cubos, discos, adaptadores y placas.

15 Después de que los analitos están unidos en una red molecular, en ocasiones se incluye una etapa de lavado para mejorar la especificidad, sensibilidad y/o señal. Un sistema de tampón que se puede usar en la preparación de muestras o en las etapas de lavado en un dispositivo. Los puntos hidrófobos en una superficie habitualmente dan lugar a un aumento en la unión inespecífica porque la fisorción de proteínas a las superficies está mediada por interacciones hidrófobas. Además, un exceso de grupos cargados también aumenta generalmente la probabilidad de

20 unión inespecífica. Por ejemplo, algunas proteínas poseen una carga neta positiva a pH neutro y tenderán a asociarse con superficies cargadas negativamente. En algunas realizaciones, los sistemas de tampón que pueden contener concentraciones de sal y detergente altas pueden reducir la unión inespecífica sobre superficies de detección importantes en un dispositivo. Se pueden aplicar tampones para mejorar o extinguir una o más señales detectables. Por ejemplo, y sin limitación, los tampones pueden contener peróxido de hidrógeno; lejía; agentes oxidantes; quelantes;

25 aptámeros; moléculas orgánicas; sustratos y moléculas inorgánicas.

Redes moleculares para la captura de ácidos nucleicos

En algunas realizaciones, los agentes de captura son péptidos catiónicos que unen ácidos nucleicos. Los péptidos

30 catiónicos pueden incluir poli-arginina, poli-lisina o una combinación de ambos residuos enlazados entre sí mediante reticulantes reactivos a aminas primarias, tales como BS³ y BS-(PEG)₉. Sin desear ceñirnos a la teoría, se cree que los péptidos catiónicos unen inespecíficamente la cadena principal de polifosfato de ácidos nucleicos tales como dsADN, ssADN, ssARN, dsARN y cualquier otro ácido nucleico, natural o artificial, que tenga una cadena principal cargada negativamente. En otras realizaciones, los agentes de captura son anticuerpos contra proteínas de unión a

35 ácidos nucleicos, tales como histonas y ADN/ARN polimerasas. En algunas realizaciones, el agente de captura es específico para ácidos nucleicos de ciertas fuentes. Por ejemplo, un agente de captura que tiene una afinidad alta por los promotores eucariotas, las histonas, las proteínas de unión monocatenarias y los factores de transcripción, se unirá con mayor afinidad a ácidos nucleicos humanos y de otros eucariotas.

40 Las redes moleculares de este tipo se pueden fabricar según cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Un procedimiento de fabricación ejemplar es combinar una mezcla heterogénea de anticuerpos y péptidos catiónicos (de 9-40 aminoácidos) en tampón exento de amina, añadir concentraciones de solución madre de reticulantes directamente a las mezclas de péptidos, curar y repetir según sea necesario para construir capas adicionales.

45 Las redes moleculares que unen ácidos nucleicos se pueden usar para el aislamiento de ácidos nucleicos de una muestra. Ventajosamente, los procedimientos que usan redes moleculares pueden aislar un ácido nucleico en presencia de otras especies distintas de los ácidos nucleicos tales como proteínas.

Las redes moleculares que tienen los péptidos o anticuerpos de unión a ácidos nucleicos como agentes de captura se

50 pueden diseñar para evitar la interferencia de especies distintas de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la interferencia de las especies distintas de los ácidos nucleicos en la unión se puede reducir ajustando la longitud de los enlazadores para limitar el tamaño de los poros o las cavidades dentro y a lo largo de toda la red. Las dimensiones de una red de unión a ácidos nucleicos pueden ser la longitud en angstroms del enlazador más la longitud en angstroms de los péptidos de unión a ácidos nucleicos o anticuerpos contra la unión a ácidos nucleicos. Las dimensiones de una especie

55 diferente de red molecular pueden ser la longitud en angstroms del enlazador y la longitud en angstroms de un péptido de unión a ácidos nucleicos. Por ejemplo, el tamaño de los poros/cavidades puede excluir moléculas más grandes tales como las proteínas globulares. La interferencia de especies distintas de los ácidos nucleicos también se puede reducir construyendo una red molecular con una carga total positiva, que repele las moléculas hidrófobas y las moléculas que tienen una carga total positiva debido a fuerzas repulsivas.

60 En algunas realizaciones, una red molecular que tiene un péptido o anticuerpo de unión a ácidos nucleicos también tiene agentes de captura para proteínas que se asocian fuertemente con los ácidos nucleicos, aumentando de ese

modo la captura de ácidos nucleicos.

Las redes moleculares de ácidos nucleicos se pueden usar en dispositivos que amplifican los ácidos nucleicos, por ejemplo, dispositivos que realizan PCR o RT-PCR isotérmicas. En tales redes moleculares, los agentes de captura pueden ser polipéptidos de unión a ácidos nucleicos.

Redes moleculares como jaulas

En otro aspecto, las redes moleculares son útiles como estructura física para encapsular agentes independientemente de sus propiedades específicas. Los agentes ejemplares incluyen moléculas terapéuticas y células. La composición de las capas se puede ajustar para proporcionar la protección óptima del medioambiente en el que se emplea. Alternativamente, la red puede incluir componentes degradables de tal manera que el agente se pueda liberar de la red.

Estas redes moleculares pueden incluir componentes que tienen afinidad por ciertos tipos de propiedades químicas superficiales y, por tanto, sirven tanto para encapsular como para localizar agentes. Además, las propiedades de las redes moleculares degradables se pueden ajustar usando enlazadores de longitud, inestabilidad térmica o inestabilidad química diferentes.

V. EJEMPLOS DE REDES MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO (UNIÓN DE ANALITOS)

A. Red bacteriana

En una realización, una prueba puede contener una pluralidad de redes moleculares, donde una red molecular puede ser una red bacteriana y puede contener componentes de captura que pueden unir específicamente: moléculas de respuesta del hospedador que son inducidas específicamente en respuesta a una infección bacteriana, ADN bacteriano, flagelos, pili, fimbrias, cápsulas, capas S, peptidoglucano, polimerasas específicas de bacterias, proteínas de choque térmico específicas de bacterias, manosa y otros polisacáridos superficiales, subunidades ribosómicas bacterianas y otras moléculas específicas de bacterias.

Una red bacteriana puede contener componentes de captura específicos para bacterias grampositivas y sus productos, tales como ácido lipoteicoico, bacteriocinas, proteínas de unión a peptidoglucanos específicos de grampositivas y otros indicativos de una infección bacteriana grampositiva. Una red bacteriana puede contener componentes de captura específicos para bacterias gramnegativas y sus productos, tales como lipopolisacárido, lípido A, bombas de la membrana exterior, proteínas de unión a la membrana exterior específicas para bacterias gramnegativas y otros indicativos de una infección bacteriana gramnegativa. Una prueba también puede contener una red vírica, donde los componentes de captura pueden unir específicamente: ácidos nucleicos víricos, proteínas de la cápside, proteínas espiculares, hemaglutinina, neuraminidasa, polimerasas víricas, transcriptasas inversas, productos víricos, moléculas del hospedador que son inducidas específicamente en respuesta a una infección vírica y citocinas antivíricas tales como interferón-alfa e interferón-beta. Una prueba también puede contener una red fúngica, donde los componentes de captura pueden unir específicamente: moléculas de respuesta del hospedador que son inducidas específicamente en respuesta a una infección bacteriana, quitina, aflatoxina, glucoproteínas fúngicas, polisacáridos fúngicos, ureas diaciladas y otras moléculas específicas de los hongos. Una prueba también puede contener una red protozoaria, donde los componentes de captura pueden unir específicamente moléculas de respuesta del hospedador que son inducidas específicamente en respuesta a una infección protozoaria, estructuras de carbohidratos específicos de protozoos, glucoproteínas específicas de protozoos, secuencias de ADN específicas de protozoos y otras moléculas específicas de protozoos.

En otra realización, una prueba puede contener redes de gramnegativas, grampositivas y bacterianas en una disposición apilada o estratificada. Las moléculas de detección de analitos se pueden marcar con diferentes marcadores de detección; y de manera que la unión de analitos a más de una red molecular puede producir una señal mejorada, señales mixtas, señales múltiples y señales diferentes. Un ejemplo de tales resultados positivos de la prueba puede ser la presencia de una señal azul para indicar una muestra positiva para bacterias, en combinación con la presencia de una señal roja para indicar una muestra positiva para bacterias grampositivas, de manera que la combinación de la señal roja y azul produce una señal púrpura. Otro ejemplo de tales resultados positivos de la prueba puede ser la presencia de una señal azul para indicar una muestra positiva para bacterias, en combinación con la presencia de una señal amarilla para indicar una muestra positiva para bacterias gramnegativas, de manera que la combinación de la señal azul y amarilla produce una señal verde.

B. Red de factor de necrosis tumoral total

En una realización preferida, una prueba puede contener una red molecular que puede medir el factor de necrosis

tumoral (TNF) total en una muestra. Dicha red de TNF puede contener componentes de captura que pueden capturar e inmovilizar: ligando de TNF soluble; receptores de TNF I y II solubles; fragmentos de receptores de TNF solubles que pueden unir ligando de TNF, tales como TNF-BP-I, TNF-BP-2 y otros TNF-BP; anticuerpos anti-TNF; complejos TNF:anticuerpo anti-TNF; complejos TNFR:anticuerpo anti-TNFR; complejos inmunitarios TNF:TNFR:anticuerpo anti-TNFR; complejos TNF:TNF-BP1:anticuerpo anti-TNF; complejos TNF:TNF-BP-2:anticuerpo anti-TNF; complejos TNF:TNF-BP-1:anticuerpo anti-TNF-BP; complejos TNF:TNF-BP-2:anticuerpo anti-TNF-BP y otros complejos unidos al TNF en una muestra. Dicha prueba de TNF puede contener una o más redes de TNF de manera que dicha red de TNF puede estar compuesta por componentes de captura tales como, pero no limitados a: anticuerpos anti-TNF; anticuerpos anti-TNFR; anticuerpos anti-TNF-BP-1; anticuerpos anti-BP-2; TNFR-I; TNFR-II; heparina y otras moléculas de unión al TNF. Dicha prueba de TNF puede contener tampones de lavado para retirar las moléculas de la muestra no unidas. Dicha prueba de TNF puede contener moléculas de detección de analitos que se pueden marcar con una o más moléculas de indicador. Donde la unión de dichas moléculas de detección de analitos al analito unido después de las etapas de lavado se puede considerar una prueba positiva.

15 C. Prueba de resistencia a los antibióticos

En otra realización, una prueba puede ser una prueba de resistencia a los antibióticos y puede contener una de las redes microbianas antes mencionadas que pueden capturar e inmovilizar el organismo completo en estado vivo; y de manera que dicha prueba puede emplear moléculas de detección de analitos marcadas diferencialmente para identificar la resistencia; o dianas de resistencia; o procedimientos que confieren resistencia.

En una realización, una prueba puede ser una prueba de indicador de resistencia a los antibióticos que usa una red de matriz extracelular para capturar e inmovilizar bacterias completas en estado vivo, y de manera que dicha prueba puede emplear moléculas de detección marcadas de manera diferente; de manera que dichas moléculas de detección son antibióticos marcados; de manera que cada clase de antibióticos se marca con un indicador diferente; de manera que dichas bacterias vivas se incuban en presencia de una población heterogénea de moléculas de detección marcadas; de manera que se aplica un lavado; de manera que la una o más moléculas de detección unidas pueden indicar sensibilidad a los antibióticos.

30 D. Red de matriz extracelular

En otra realización preferida, una prueba puede contener una o más redes de matriz extracelular, de manera que dicha red de matriz extracelular se puede usar para capturar e inmovilizar bacterias o cualquier otro microbio o cualquier célula de mamífero. Dichos componentes de captura pueden unir específicamente una o más glucoproteínas, polisacáridos, manosas, proteínas, lípidos, glucolípidos, lipoproteínas superficiales u otras moléculas superficiales. Dicha prueba se puede usar para unir células vivas; y de manera que dicha prueba puede emplear moléculas de detección de analitos específicas; y de manera que dicha prueba se puede usar para analizar las características, la dinámica, las propiedades y la respuesta de dichas células unidas.

40 E. Prueba de indicador de vigilancia de infecciones

En otra realización, una prueba puede ser una prueba de indicador de vigilancia de infección que usa redes moleculares bacterianas, víricas, fúngicas y protozoarias, o una combinación de las mismas, para identificar uno o más indicios de infección específicos del hospedador y uno o más indicios de infección específicos de microbios.

45 F. Red de SARM

En una realización, las redes moleculares se usan en pruebas que detectan SARM.

50 Los analitos de SARM capturados se pueden detectar usando anticuerpos dirigidos contra epítomos sobre la proteína Pbp2a de SARM y sondas de ácidos nucleicos dirigidas de nuevo a la región SCCmec de SARM. Los anticuerpos y las sondas de ácidos nucleicos se pueden conjugar a FITC.

Otros marcadores que forman parte del distintivo de las proteínas de SARM incluyen los enumerados en la tabla siguiente, junto con los posibles proveedores de agentes de captura de anticuerpos dirigidos a tales marcadores.

Marcador de proteínas de SARM	Proveedores de anticuerpos
Pbp2a	AbCam, AbD Serotec, GenWay Biotech
MecR	Covance, Pierce, Genscript
VraRS	Covance, Pierce, Genscript

Marcador de proteínas de SARM	Proveedores de anticuerpos
PhoU	Covance, Pierce, Genscript
PstS	Covance, Pierce, Genscript
PstC	Covance, Pierce, Genscript
PstA	Covance, Pierce, Genscript
PstB	Covance, Pierce, Genscript
PVL (LukF y LukS)	Covance, Pierce, Genscript
Alfa-toxina	AbCam, GenWay Biotech
Modulina alfa soluble en fenol	Covance, Pierce, Genscript

Otros marcadores que forman parte del distintivo de los ácidos nucleicos de SARM incluyen los enumerados en la tabla siguiente, junto con los posibles proveedores de agentes de captura de sondas dirigidas a tales marcadores.

Marcador de ácidos nucleicos de SARM	Proveedores de sondas
<i>agr Grupo I y Grupo III</i>	IDT
<i>mecA</i>	IDT
<i>mecR</i>	IDT
<i>fmtA</i>	IDT
<i>sarA</i>	IDT
<i>tcaA</i>	IDT
<i>msrR</i>	IDT
<i>vraRS</i>	IDT
<i>SCCmec</i>	IDT

5

G. Red para sepsis

En otra realización, las redes moleculares se usan en pruebas que determinan la etiología de la sepsis. Por ejemplo, tal prueba puede identificar la sepsis como bacteriana grampositiva, bacteriana gramnegativa, vírica o fúngica.

10

F. Identificación de alérgenos

Las redes moleculares descritas en esta solicitud se pueden usar para la inmovilización simultánea y posterior detección, si se desea, de inmunocitos específicos de alérgenos y productos de inmunocitos específicos de alérgenos.

15 El alérgeno de interés puede ser de origen biológico o no biológico. El alérgeno puede ser un fragmento antigénico, o una región de un alérgeno, o un alérgeno completo. En ciertas realizaciones, los analitos son alérgenos, IgE, mastocitos, inmunocitos específicos de alérgenos y/o productos inmunitarios específicos de alérgenos en una muestra biológica, alimentaria o medioambiental.

20 En otra realización preferida, se puede usar una prueba para identificar alérgenos en una muestra alimentaria o medioambiental de manera que dicha prueba contiene una o más redes moleculares para capturar e inmovilizar alérgenos completos o procesados; de manera que la prueba puede producir una o más señales en una o más áreas de prueba; y de manera que dicha área de realización de pruebas contiene una o más redes moleculares y puede ser de volumen denso; y de manera que la naturaleza densa del complejo red molecular-moléculas de detección de
25 analitos puede producir una señal positiva intensificada y puede producir una señal más rápida por unidad de volumen.

Las moléculas de captura pueden ser un anticuerpo o una combinación de anticuerpos contra IgE humana, o un fragmento antigénico, una región de un alérgeno, un alérgeno completo o un complejo de alérgeno. En algunas realizaciones, los agentes de captura son múltiples anticuerpos contra la región constante de IgE humana que forman
30 una red molecular con afinidad por un alérgeno o una combinación de alérgenos. En otras realizaciones, los agentes de captura son múltiples fragmentos antigénicos iguales o diferentes, pero relacionados, alérgenos, complejos de alérgeno u organismos alérgicos que forman una red molecular con afinidad por una, o una combinación de, IgE, mastocitos, linfocitos T específicos de alérgenos, o linfocitos B específicos de alérgenos en una muestra.

Las realizaciones preferidas de los agentes de captura para ciertos analitos se proporcionan en la Tabla siguiente:

Tabla 6

AGENTE DE CAPTURA	ANALITO	APLICACIÓN
Fragmento alergénico	IgE, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Péptido alergénico	IgE, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Alérgeno, completo	IgE, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Complejo de alérgeno	IgE, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Anticuerpos contra histamina	Histamina	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Dominio de unión a la histamina del receptor de histamina	Histamina	Pruebas de alergia/hipersensibilidad
Anticuerpos contra uno o más fragmentos alergénicos	Alérgeno (fragmento, completo y complejos)	Pruebas alimentarias y medioambientales
Anticuerpos contra uno o más péptidos alergénicos	Alérgeno (fragmento, completo y complejos)	Pruebas alimentarias y medioambientales
Anticuerpos contra uno o más alérgenos	Alérgeno (fragmento, completo y complejos)	Pruebas alimentarias y medioambientales
Anticuerpos contra uno o más alérgenos	Alérgeno (fragmento, completo y complejos)	Pruebas alimentarias y medioambientales

5

En ciertas realizaciones, las redes moleculares descritas en esta solicitud tienen la composición descrita en la tabla siguiente:

Tabla 7

10

CAPA DE LA RED	AGENTE DE CAPTURA	EJEMPLO DE UNO O MÁS AGENTES DE CAPTURA	EJEMPLO DE UNO O MÁS ANALITOS
Subcapas	Anticuerpos contra epítomos sobre uno o múltiples alérgenos (relacionados)	Anticuerpos contra la proteína de soja. Anticuerpos contra semillas de soja	Fragmentos de proteína de soja Fragmentos de proteínas de semillas soja o de origen vegetal
Capas superiores	Anticuerpos contra epítomos sobre uno o múltiples alérgenos (relacionados)	Anticuerpos contra la proteína de soja. Anticuerpos contra semillas de soja	Proteína de soja completa y fragmentos Proteínas completas y fragmentos de semillas soja o de origen vegetal
Capa exterior	Anticuerpos contra epítomos sobre uno o múltiples alérgenos (relacionados)	Anticuerpos contra la proteína de soja. Anticuerpos contra semillas de soja	Fragmentos, proteína completa y complejos de proteínas de soja. Fragmentos, proteína completa y complejos de proteínas de semillas de soja o de origen vegetal

En ciertas realizaciones, los alérgenos que son inmovilizados y detectados por las redes moleculares incluyen los siguientes:

- Productos de origen animal que incluyen, pero no se limitan a:
 - Fel d1 (alergia a los gatos)
 - 5 ◦ pelo y caspa
 - cáliz de cucaracha
 - 10 ◦ lana
 - excreción de ácaros del polvo
- Fármacos que incluyen, pero no se limitan a:
 - 15 ◦ penicilina
 - sulfonamidas
 - 20 ◦ salicilatos (también se encuentran de forma natural en numerosas frutas)
 - anestésicos locales
- Alimentos que incluyen, pero no se limitan a:
 - 25 ◦ apio y apionabo ^[24]
 - maíz o choclo
 - 30 ◦ huevos (típicamente albúmina, la clara)
 - fruta que incluye, pero no se limita a:
 - calabaza
 - 35 ◦ legumbres que incluyen, pero no se limitan a:
 - alubias
 - guisantes
 - 40 ▪ cacahuetes
 - semillas de soja
 - 45 ◦ leche
 - marisco
 - 50 ◦ sésamo
 - soja
 - frutos secos que incluyen, pero no se limitan a:
 - 55 ▪ nueces
 - almendras
 - trigo
 - 60
- Picaduras de insectos que incluyen, pero no se limitan a:

- veneno de picadura de abeja
 - veneno de picadura de avispa
 - picaduras de mosquito
 - Esporas de moho
 - Otros
 - látex
 - metales
 - Polen de plantas (fiebre del heno) que incluye, pero no se limita a:
 - hierba que incluye, pero no se limita a: cizaña, anea
 - malas hierbas que incluyen, pero no se limitan a: ambrosía, llantén, ortiga, artemisa, cenizo, acedera común
 - árboles que incluyen, pero no se limitan a: abedul, aliso, avellano, carpe, castaño, sauce, álamo, plátano, tilo, olivo, enebro de Ashe
- 25 En otras realizaciones, estos alérgenos se pueden usar en su lugar en redes moleculares como agentes de captura para inmunocitos y productos de inmunocitos.

En ciertas realizaciones, las redes moleculares se pueden usar en un dispositivo de tira reactiva para evaluar la presencia de alérgenos en el medioambiente y una respuesta inmunitaria del individuo. Por ejemplo, el dispositivo puede ser un dispositivo de cromatografía lateral en el que se aplica una muestra medioambiental a una primera región que contiene una red molecular para inmovilizar alérgenos de la muestra, y a continuación se aplica una muestra de sangre aguas arriba de la muestra ambiental. La muestra de sangre entra en contacto con el alérgeno inmovilizado y a continuación se mueve aguas abajo a una región que contiene una red molecular que inmoviliza histamina, inmunocitos activados y productos de inmunocitos. Esta estrategia múltiple permite realizar pruebas simultáneas para:

35 (i) anticuerpos e inmunocitos en una muestra de sangre que reaccionan a una muestra medioambiental y (ii) la presencia de alérgenos en una muestra medioambiental.

VI. DISPOSITIVOS QUE CONTIENEN REDES MOLECULARES

40 La descripción proporciona un dispositivo analítico para determinar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra usando redes moleculares. El dispositivo puede comprender un conjunto de estructuras, cámaras y canales internos; de manera que una o más de dichas estructuras pueden tener una superficie que soporta y/o inmoviliza una o más redes moleculares que se pueden fijar covalente o no covalentemente; o adaptar; a una superficie, que puede estar fabricada de un polímero orgánico tal como poliestireno o polietileno; metal; nitrocelulosa; fluoruro de polivinilideno; material fibroso; vidrio u otros materiales, y de manera que la red molecular inmovilizada puede ser capaz de unir más de una clase diferente de analitos en una muestra. Las redes moleculares se pueden formar; colocar; adsorber; adherir; pegar; reticular y/o adaptar sobre una superficie. Las superficies pueden ser, sin limitación; porosas; no porosas; mordentadas con corona y/o moldeadas y pueden tener más de una propiedad química superficial. Las superficies pueden ser planas, perlas u otras. Las perlas ejemplares incluyen perlas de agarosa, perlas poliméricas,

50 perlas de vidrio, perlas metálicas o perlas fibrosas. Las redes moleculares se pueden usar para revestir perlas en Luminex o inmunoensayos similares.

El dispositivo también puede comprender una pluralidad de redes moleculares en una o más disposiciones; en una o más áreas de realización de pruebas de un dispositivo, o de manera que las redes moleculares individuales se pueden

55 separar en áreas de realización de pruebas individuales, donde todas las áreas de realización de pruebas se pueden exponer a dicha muestra de prueba o a una muestra de prueba separada, semipurificada o fraccionada para permitir que uno o más analitos sean inmovilizados por múltiples moléculas de captura en una o más redes moleculares en una o más áreas de realización de pruebas de dicho dispositivo.

60 Se describe un dispositivo que contiene una o más redes moleculares, o paredes de redes moleculares, que contienen moléculas de captura y nanopartículas metálicas modificadas intercaladas; de manera que la unión de analito puede alterar las propiedades físicas, magnéticas, eléctricas, químicas, vibratorias, compresivas, colorimétricas, térmicas y

espaciales de dichas redes moleculares o paredes de redes moleculares; de manera que dichas propiedades alteradas pueden ser una señal y se pueden detectar mediante sensores para producir información en una prueba binaria o analítica de dicho dispositivo.

- 5 El dispositivo puede contener puertos de entrada; canales; particiones; cámaras de almacenamiento de tampón; cámaras de procesamiento de muestras; cámaras de detección de muestras; cámaras de contención de residuos; puertos de descarga y otros compartimentos. Los compartimentos pueden contener reactivos necesarios para un ensayo, tales como tampones, lavados, cebadores de ácidos nucleicos, enzimas, productos químicos, sustratos, catalizadores y otras moléculas necesarias para el procesamiento de muestras y/o la amplificación de analitos; sondas
- 10 de ácidos nucleicos, anticuerpos, polipéptidos, enzimas y otras moléculas de detección de analitos marcadas; sustratos, catalizadores químicos, cofactores y otras moléculas de reacciones productoras de señales; amplificadores, lentes, filtros y otros agentes implicados en la amplificación de señales; y fotodetectores, semiconductores y otros agentes de detección de señales.
- 15 Las superficies poliméricas lumenales de los canales se pueden revestir con uno o más de uno de los siguientes: integrinas; péptidos de poli-arginina; aminoácidos con una carga total positiva en soluciones neutras, ácidas y básicas; lípidos policationicos; receptores recombinantes; metales; óxidos de metales; proteínas de unión a ADN monocatenario; ácido etilendiaminotetraacético; ácido etilenglicoltetraacético; colectinas; anticuerpos; proteína A; proteína G; ligandos recombinantes; receptores de reconocimiento de patrones (PRR); dominios de PRR; dominios
- 20 de proteínas que contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS); detergentes liofilizados o en gel tales como tween-20, tween-80, CHAPS, octiltioglucoídos, triton X-100 y/o NP40; dodecilsulfato de sodio; ADN de esperma de salmón; proteínas de unión a lipopolisacáridos (LBP); y cualquier otra molécula que una preferentemente covalente o no covalentemente componentes en una muestra no procesada o semipurificada. Las superficies de unión internas del dispositivo se pueden lavar mediante cambios de presión; cizallamiento mecánico; vibración; ondas de
- 25 fluido; ondas sonoras; microburbujas de gas; gradientes de pH; detergentes; cambios de salinidad; cambios de viscosidad; cambios de temperatura y cambios de caudal; y pueden eliminar la unión inespecífica de moléculas en una o más cámaras.

- El dispositivo se puede adaptar para un procedimiento para detectar múltiples analitos diferentes en una muestra extrayendo muestra al volumen para realización de pruebas de un dispositivo que puede contener redes moleculares y/o partes de redes moleculares dispuestas en un entorno que confiere propiedades de microfluidez y/o nanofluidez a la muestra a medida que pasa a través del dispositivo; y/o colocando redes moleculares y/o partes de redes moleculares en una muestra contenida; de manera que dichas redes moleculares y partes de las mismas pueden contener microcanales y nanocanales y propiedades químicas superficiales que pueden conferir microfluidez y/o
- 30 nanofluidez dentro, y alrededor de, la red molecular (y las partes de la misma); microfluidez digital; y/o usando microfluidez y/o nanofluidez de flujo continuo y/o no continuo para mover la muestra a través de un volumen de realización de pruebas que contiene redes moleculares dispuestas en un entorno que confiere microfluidez y/o nanofluidez.
- 35 De esta manera, se detectan múltiples analitos diferentes en una muestra de una manera que puede producir una señal o una combinación de múltiples señales diferentes en una o más zonas de la red molecular; y/o en una o más zonas de partes de la red molecular; y/o en una o más ubicaciones dentro de un dispositivo.

- Las redes moleculares se pueden usar en una unidad de filtración medioambiental, de manera que las redes moleculares se usan para retirar analitos específicos de una muestra; de manera que las redes moleculares e pueden introducir en un medio líquido; o de manera que las redes moleculares se pueden colocar en tubos y/o tuberías y/o mangueras y la muestra líquida se puede mover a través de los tubos y/o las tuberías y/o las mangueras para inmovilizar analitos de dicha muestra.
- 45

- 50 Las redes moleculares se pueden usar como paredes moleculares, de manera que el analito de la muestra se puede unir a una o varias paredes moleculares simultáneamente; y de manera que la unión del analito se puede detectar; analizar y/o cuantificar mediante el cambio en las propiedades de la red molecular dentro de un volumen definido de la cámara de detección de un dispositivo. La inmovilización de analitos de la muestra se puede detectar y/o cuantificar mediante, por ejemplo, el valor absoluto y/o el cambio en: la resistencia física; la forma; las propiedades de dispersión
- 55 de la luz; las propiedades químicas; las fuerzas de compresión físicas; el potencial eléctrico; la frecuencia vibratoria; el magnetismo; la absorbancia térmica; la conductancia y otras propiedades físicas y electroquímicas que confieren los analitos a la red molecular tras la inmovilización.

- Las redes moleculares se pueden usar como esponjas moleculares con el fin de absorber e inmovilizar analitos y retirarlos de la muestra; de manera que las redes moleculares se pueden depositar en una muestra y de manera que los componentes de captura pueden unirse y/o interactuar con dichos analitos y de manera que dichos analitos se pueden retirar de la muestra cuando, y si, las redes moleculares se retiran de la muestra; y/o de manera que el
- 60

movimiento de la muestra no unida fuera de las redes moleculares puede separar; filtrar y/o fraccionar la muestra.

Las redes moleculares usadas con la finalidad de filtración de muestras biológicas se pueden empaquetar en una columna, cartucho, tubo, tubería, manguera y otro dispositivo; de manera que las redes moleculares contienen
5 componentes de captura que pueden unir analitos que son células y analitos que son productos celulares de reactividad específica a través de interacciones basadas en la afinidad; y de manera que los no analitos y el fluido pueden pasar a través de dichas redes moleculares y pueden ser devueltos a la fuente biológica.

Los dispositivos pueden tener redes moleculares que contienen componentes de captura que pueden unir receptores
10 de factores de crecimiento y otros marcadores de células tumorales sobre la superficie de las células tumorales; y de manera que dichas redes moleculares pueden inmovilizar dichas células tumorales dentro de la columna; el cartucho; el tubo y otro dispositivo; y de manera que las células no tumorales pueden pasar a través de dicho dispositivo.

Los dispositivos pueden tener redes moleculares que contienen componentes de captura que pueden unir e inmovilizar
15 receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, complejos principales de histocompatibilidad y otros marcadores de la superficie celular de reconocimiento de antígenos sobre la superficie de las células; y de manera que dichas redes moleculares pueden unir e inmovilizar productos celulares específicos; y de manera que dichas redes moleculares pueden inmovilizar inmunocitos y/o productos de los inmunocitos dentro de la columna; el cartucho; el tubo y otro dispositivo; y de manera que las células no inmovilizadas, los productos celulares y el fluido pueden pasar
20 a través de dicho dispositivo; y de manera que dichos agentes no inmovilizados pueden ser devueltos a la fuente biológica.

Los dispositivos pueden tener redes moleculares contienen componentes de captura que pueden unir metales pesados,
25 colesterol, triglicéridos, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de alta densidad, citocinas, insulina, hormonas, fármacos y otras moléculas que pueden estar anómalamente elevadas en los mamíferos.

Los dispositivos pueden tener redes moleculares que contienen componentes de captura que pueden ser moléculas
30 orgánicas e inorgánicas y/o células microbianas vivas que pueden unir y/o absorber y/o almacenar productos químicos tales como petróleo, metales pesados, productos petroquímicos, gasolina, herbicidas, pesticidas y otros contaminantes medioambientales.

Las redes moleculares se pueden contener dentro de un dispositivo Vacutainer, de manera que la presión negativa
del Vacutainer extrae muestra al volumen de realización de pruebas que contiene una o más redes moleculares; y donde los analitos de la muestra pueden ser inmovilizados por dicha red molecular; y donde los analitos inmovilizados
35 se pueden detectar dentro del dispositivo Vacutainer; o donde las redes moleculares con analitos unidos se pueden retirar del dispositivo Vacutainer y se pueden colocar en un segundo dispositivo para la detección de analitos.

El dispositivo, en algunos aspectos de la descripción, está fabricado de una combinación de moléculas y/o polímeros
40 químicamente sensibles que se pueden aplicar en capas sobre un molde para formar un sistema ordenado de canales y cámaras, capaz de detectar simultáneamente muchas clases diferentes de analitos en muestras biológicas o medioambientales rápidamente. Un aspecto del dispositivo es que el sistema ordenado de canales y cámaras se puede formar usando un procedimiento de microfabricación, minimizando de ese modo el tamaño de la muestra y permitiendo que el dispositivo se fabrique de manera económica.

45 En otro aspecto de la descripción, se inmoviliza una red multicapa en un dispositivo y la muestra fluye secuencialmente a través de las capas de la red. Alternativamente, un dispositivo puede comprender múltiples redes moleculares y está configurado para que una muestra fluya a través de varias redes. En cualquier caso, las muestras pueden fluir mediante acción capilar o mediante bombeo activo. También son posibles otros procedimientos de transporte (p. ej., electroforesis), pero los procedimientos que requieren equipos especializados son menos convenientes en varios
50 aspectos.

Preferiblemente, el dispositivo es un dispositivo portátil autónomo. Típicamente, el dispositivo contiene un puerto o
compartimento para la introducción de la muestra biológica, así como compartimentos que contienen reactivos de
detección y cualquier otro reactivo necesario para el ensayo. Otros reactivos pueden incluir tampones y agentes de
55 procesamiento de muestras (p. ej., solución de lisis celular). En aspectos de la descripción en los que los sistemas de detección generan una señal que no se puede analizar visualmente (p. ej., un sistema no colorimétrico), el dispositivo puede incluir elementos para detectar la señal, o puede estar acoplado a un instrumento para la detección de la señal. En algunos aspectos de la descripción, la muestra se puede procesar antes de entrar en contacto con la una o más
60 redes, por ejemplo, para lisar células, retirar células o concentrar muestras.

Por consiguiente, se describe un dispositivo analítico para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de prueba. El dispositivo puede comprender un conjunto de estructuras, donde una o más de dichas

estructuras tienen una superficie que proporciona una red molecular fijada covalente o no covalentemente o adaptada a una superficie polimérica. La red molecular inmovilizada es capaz de unir más de un analito de una muestra.

5 El dispositivo también puede comprender una pluralidad de redes moleculares separadas en cámaras donde todas están expuestas a dicha muestra de prueba o una población subfraccionada de la muestra de prueba para permitir que uno o más analitos sean inmovilizados por interacción con las moléculas de captura de cada red molecular.

10 El dispositivo puede comprender un conjunto de estructuras, en el que cada estructura tiene una superficie que proporciona una red molecular inmovilizada fijada covalente o no covalentemente a dicha estructura, y capaz de unir específicamente un analito; una pluralidad de redes moleculares independientes sobre la superficie del dispositivo dentro de cámaras independientes donde dicha muestra de prueba que contiene uno o más analitos pasa a través de la red de canales y pasa a través de uno o más filtros, tamices o redes moleculares, de manera que la muestra de prueba se fracciona y fluye progresivamente a una o más de una cámara, conteniendo cada cámara una o más redes moleculares compuestas por componentes de captura diferentes; un sistema de tampón para reducir o inhibir la interacción inespecífica entre los agentes de la muestra fraccionados y la red molecular, un reactivo marcado que comprende un miembro de unión específica conjugado a un marcador detectable, donde dicho marcador detectable es capaz de producir una señal cuando es inmovilizado por un analito de unión que está inmovilizado sobre una red molecular para indicar la presencia o cantidad de dicho analito en una muestra de prueba.

20 El dispositivo puede contener una o más cámaras de detección, dicha cámara contiene una o más redes moleculares inmovilizadas mediante fricción, suspensión o fijación a una superficie de la cámara, donde dicha red molecular es capaz de unir al menos una clase de población de analitos de una muestra fraccionada mediante inyección de dicha muestra en el dispositivo; inyección de un tampón de lavado en el dispositivo para retirar la unión inespecífica de muestra a la red molecular; inyección de una solución de detección de manera que los agentes de detección unen específicamente el analito inmovilizado; e inyección de un tampón de lavado en el dispositivo para retirar los agentes de detección no unidos.

30 Los dispositivos pueden generar señales diferenciales de diagnóstico tanto para analitos individuales como para mezclas de analitos. Los dispositivos pueden separar los analitos deseados de los analitos no deseados. Los dispositivos pueden separar analitos diferencialmente en regiones independientes dentro del dispositivo de tal manera que en una región se seleccionan los analitos A y B y en otra región del dispositivo, se selecciona contra los analitos A y B, seleccionando de ese modo los analitos C, D, E y F. El dispositivo, en algunos aspectos de la descripción, está fabricado de una combinación de moléculas y/o polímeros químicamente sensibles que se pueden aplicar en capas sobre un molde para formar un sistema ordenado de canales y cámaras, capaz de detectar simultáneamente muchas clases diferentes de analitos en muestras biológicas o medioambientales rápidamente. Un aspecto del dispositivo es que el sistema ordenado de canales y cámaras se puede formar usando un procedimiento de microfabricación, minimizando de ese modo el tamaño de la muestra y permitiendo que el dispositivo se fabrique de manera económica.

40 En un ejemplo de un dispositivo, un canal principal puede ser contiguo al puerto de muestreo y puede conducir a un punto o nudo de bifurcación en el que pueden estar presentes múltiples canales subsiguientes. Cada canal posterior puede contener un filtro y/o un tamiz y conducir a una cámara donde dicha cámara puede contener características de selección en forma de filtros y/o tamices y/o redes moleculares soportados por, y fijados a, las características de la cámara. La cámara puede estar conectada a un canal adicional y puede conducir a una segunda cámara que contiene una red molecular diferente soportada y sujeta a las características de la cámara. Un canal puede conducir de la segunda cámara a un puerto de descarga de residuos.

50 En otro ejemplo de un dispositivo, puede contener un puerto de entrada de muestras conectado a un canal continuo con una serie de filtros diferentes, de tamaños de poro gradualmente más pequeños para seleccionar moléculas subcelulares o virus y puede conducir a un nudo de canales que conducen a una o más cámaras. Cada cámara puede contener una o más redes moleculares y puede estar conectada por otro canal a un puerto de descarga de residuos.

55 En otro ejemplo, un dispositivo puede contener un puerto de entrada de muestras conectado a una serie alterna de canales y cámaras. Cada canal puede consistir en un gradiente creciente de moléculas de selección fijadas a la superficie luminal del canal y puede unir componentes de la muestra específicos mediante interacción con las propiedades químicas superficiales. Dichos canales pueden estar conectados a un nudo que puede estar conectado a cámaras que pueden contener una red molecular compuesta por moléculas de captura que pueden unir moléculas de una muestra que tienen propiedades químicas superficiales similares a los analitos de interés, pero pueden unirse preferentemente a la red, mientras que los analitos de interés pasan sin inhibición al canal adjunto que puede conducir a la cámara final o puede conducir a un puerto de entrada de muestras.

60 En otro aspecto de la descripción, un dispositivo puede contener un puerto de entrada de muestras y puede contener un agente absorbente que es contiguo a un canal. El canal puede contener una serie de redes moleculares diferentes

de manera que la muestra del puerto de entrada difunde lentamente a, y a lo largo de todo, el canal. Dichas redes moleculares contienen componentes de captura de propiedades químicas superficiales y conformaciones diferentes que permiten la unión máxima de componentes no deseados de una muestra. Los componentes restantes de la muestra se pueden retirar a continuación mediante succión a través de un puerto de entrada de muestras.

5

En otro aspecto de la descripción, un dispositivo puede contener una mezcla de elementos de selección que incluyen: revestimientos en gradiente sobre la superficie luminal, filtros, tamices y redes moleculares y pueden estar ubicados en canales y pueden estar ubicados en cámaras. Dichos elementos de selección pueden estar fijados a la superficie luminal o pueden estar suspendidos o adaptados contra un borde luminal.

10

En otro aspecto de la descripción, un dispositivo para la preparación de muestras con características seleccionables puede distinguir los componentes de la muestra en base al tamaño, la afinidad, las propiedades químicas superficiales, la forma, la hidrofobicidad, hidrofiliidad y la actividad.

15 En otro aspecto de la descripción, un dispositivo puede contener superficies luminales con características físicas elevadas y puede estar compuesto por polímero y puede contener propiedades químicas superficiales que favorecen la unión de moléculas específicas tales como componentes de una red molecular.

20 En un aspecto preferido de la descripción de un dispositivo, un dispositivo polimérico puede contener puertos en ambos extremos del dispositivo. El dispositivo puede tener direccionalidad, ya que el dispositivo puede tener un puerto de entrada de muestras y un puerto de salida de muestras. El dispositivo puede contener un canal continuo grande y dicho canal puede contener una serie de filtros y/o tamices y/o redes moleculares diferentes fijados a las características del canal.

25 En otro ejemplo, los puertos de entrada y salida pueden ser conectores de tipo Luer Lock. Los puertos de entrada y salida pueden ser conectores Luer Lock hembra. El uso de conectores Luer Lock hembra permitirá introducir un fluido mediante una jeringa. Típicamente, las jeringas incluyen un conector Luer Lock macho en el extremo dispensador de la jeringa. Para las muestras líquidas, los conectores Luer Lock pueden permitir transferir las muestras directamente de una jeringa, mediante la aplicación de fuerza en el émbolo de la jeringa, a dicho puerto de entrada del dispositivo.

30

En otro ejemplo, un dispositivo es un adaptador que enlaza dos jeringas diferentes. Una jeringa puede contener muestra no procesada y la muestra se puede empujar al adaptador y a través del dispositivo adaptador para separar la muestra no deseada de los analitos. La otra jeringa puede estar conectada al extremo opuesto del dispositivo adaptador y recibir analitos semipurificados o purificados.

35

En otro ejemplo, un dispositivo puede tener secciones estratificadas que están ensambladas para producir un sistema de canales y cámaras en el que la muestra se pasa de la capa más exterior, a través de múltiples capas interiores y se pasa a la capa más exterior opuesta. Dicha muestra se puede purificar en parte o en su totalidad a medida que pasa a través de capas consecutivas del dispositivo para producir analitos semipurificados o purificados que pueden estar presentes para los análisis.

40

En otro ejemplo, un dispositivo puede incluir una superficie externa con polímeros transparentes y translúcidos que sirven como superficie de ventana de una cámara.

45 *Sistemas ejemplares:*

La descripción incluye aparatos para analizar una muestra para determinar la presencia de un tipo específico de analito usando una red molecular. En algunos aspectos de la descripción, tal aparato incluye uno o más sensores acoplados operativamente a la red molecular. Estos sensores pueden proporcionar una señal que es indicativa o no indicativa de la presencia de cierto analito atrapado dentro de la red y, por tanto, presente originalmente en la muestra. En algunos aspectos de la descripción, la falta de una señal puede ser indicativa o no indicativa de la presencia de cierto analito en la muestra.

50

En algunos aspectos de la descripción, se puede aplicar energía a los sensores para provocar que ciertos analitos generen señales. La energía puede ser aplicada a la red molecular por el sensor, donde porciones de la red molecular emiten una señal de respuesta (p. ej., fluorescencia, vibración). En algunos aspectos de la descripción, la presencia del analito solo provocará que el sensor genere una señal. Por ejemplo, la red molecular puede estar fijada estructuralmente a uno o más sensores piezoeléctricos, donde la captura del analito provoca que la estructura de la red molecular cambie (p. ej., se endurezca, se contraiga) y, por tanto, aplique tensión mecánica al sensor piezoeléctrico.

60

Bajo esta tensión, el sensor piezoeléctrico emite una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito.

Los sistemas y dispositivos descritos en esta solicitud incluyen generalmente una estructura, que puede ser una

carcasa o una subcarcasa de una estructura mayor, para contener una o más redes moleculares. Las estructuras incluyen generalmente una o más superficies de soporte configuradas para soportar una o más redes moleculares. En algunos aspectos de la descripción, tales superficies de soporte forman al menos una porción de una cámara configurada para contener una muestra de fluido. Por consiguiente, en algunos aspectos de la descripción se entiende que una “cámara” es un elemento estructural que incluye una o más superficies de soporte. En algunos aspectos de la descripción, las estructuras son modulares y/o portátiles. En algunos aspectos de la descripción, la estructura es un cartucho relativamente pequeño (es decir, portátil) que se puede interconectar con un dispositivo de computación. En algunos aspectos de la descripción, las estructuras incluyen partes móviles, que se pueden accionar físicamente para procesar una muestra.

10

La **figura 8A** muestra un diagrama esquemático simplificado de un sistema de detección de analitos ejemplar 800, según un aspecto de la divulgación. El sistema 800 incluye un dispositivo de computación 802. El dispositivo de computación 802 incluye generalmente al menos un procesador para ejecutar instrucciones de la máquina. El dispositivo de computación 802 puede estar conectado a subsistemas adicionales tales como una impresora, un teclado, un disco fijo, un monitor, que están acoplados a un adaptador de pantalla. Los dispositivos periféricos y de entrada/salida (I/O), que se acoplan a un controlador de I/O, se pueden conectar al dispositivo de computación 802 mediante cualquier número de medios conocidos en la técnica tales como un puerto serie. Por ejemplo, se puede usar un puerto serie o una interfaz externa diferente (p. ej., USB, inalámbrica, etc.) para conectar el aparato de computación a una red de área amplia tal como Internet, un dispositivo de entrada de ratón o un escáner. La interconexión mediante el sistema de bus permite que el procesador se comuniquen con cada subsistema y controle la ejecución de instrucciones de la memoria del sistema o el disco fijo, así como el intercambio de información entre subsistemas. La memoria del sistema y/o el disco fijo pueden representar un medio legible por ordenador.

15

20

El sistema 800 también incluye al menos un sensor 804 acoplado operativamente al dispositivo de computación 802. El sensor 804 está configurado generalmente como se describe en esta solicitud y puede incluir un amplificador integrado o no integrado. Se muestra una red molecular 806 acoplada operativamente al sensor 804. Se debe entender que, en algunos aspectos de la divulgación, la red molecular 806 puede incluir una pluralidad de redes moleculares. Se debe entender además que la red molecular 806 se puede configurar de manera similar a cualquiera de las redes moleculares descritas en esta solicitud y combinaciones de las mismas.

30

En uso, una muestra que contiene potencialmente un cierto analito se aplica físicamente a la red molecular 806, que está preconfigurada para capturar ese analito. El sensor 804 detecta la presencia del analito y envía una señal apropiada al dispositivo de computación 802. El dispositivo de computación 802 procesa la señal para indicar a un usuario si el analito está presente o no dentro de la red molecular y, por tanto, originalmente en la muestra. Sin embargo, en algunos aspectos de la descripción, se debe entender que la falta de una señal predeterminada puede ser indicativa de la presencia de cierto analito. Por ejemplo, el sensor 804 puede aplicar una cierta longitud de onda electromagnética (p. ej., luz láser) a la muestra, donde la absorbancia de la longitud de onda por el analito es indicativa de su presencia. Por tanto, detectar la ausencia de cierta longitud de onda mostrará un indicio positivo.

35

40

El sistema 800, en algunos aspectos de la descripción, puede incluir una o más estructuras para contener el dispositivo de computación 802 y/o el sensor 804 y/o la red molecular 806. Son posibles diversos materiales y configuraciones para estas estructuras. En algunos aspectos de la descripción, las estructuras se pueden construir de polímeros y/o metales. Por ejemplo, una estructura se puede configurar como una carcasa de chapa metálica o plástico moldeado que tiene una pluralidad de paredes exteriores e interiores para soportar estructuralmente los elementos físicos del sistema 800. Se pueden configurar porciones de las estructuras como tubos, cámaras y conductos para enviar muestras a través del sistema 800. También pueden componer el sistema 800 aspectos adicionales, tales como bombas, fuentes de alimentación y equipos eléctricos. En algunos aspectos de las descripciones, el sensor 804 y la red molecular 806 se pueden configurar dentro de una estructura modular que se interconecta individualmente con el dispositivo de computación 802. Un ejemplo de tal subsistema se muestra en la **figura 8B** como dispositivo 808.

45

La **figura 8B** muestra una vista en perspectiva y en detalle de un dispositivo ejemplar 808, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 808 incluye una estructura 810, que se muestra como una carcasa alargada portátil. La estructura 810 incluye al menos una superficie 812 configurada para soportar una red molecular 814. La superficie 812 se puede configurar según las superficies y sustratos de soporte de redes moleculares descritos en esta solicitud.

55

La superficie 812 define al menos una porción de una cámara de detección de muestras 816. Se puede acoplar un sensor 818 a la superficie 812 o a otra superficie que defina la cámara de detección de muestras 816. La cámara de detección de muestras 816 incluirá generalmente un puerto de entrada u otra abertura para la aplicación física de una muestra a la red molecular 814. La estructura puede incluir una ventana de visualización 820 para confirmar la aplicación de la muestra y/o para visualizar un indicio visual de la presencia de un cierto analito atrapado dentro de la red molecular 814. El sensor también puede incluir un conector 822 acoplado operativamente al sensor 818. El conector 822 se puede configurar según un estándar de conector conocido (p. ej., USB) para la conexión al sistema de computación 802.

60

La **figura 8C** muestra un sistema multicámara ejemplar 824, según un aspecto de la descripción. El sistema 824 está configurado como un sistema isotérmico de realización de pruebas de afinidad de ácidos nucleicos que usa redes moleculares. El sistema 824 incluye una cámara de modificación 826 en la que se puede procesar una muestra (p. ej.,
 5 desnaturalizar, modificar, etc.) mediante alteración química. La cámara de modificación 826 está generalmente donde comienza un procedimiento de detección y, por tanto, incluye un puerto de entrada. Una cámara de retención de tampón 828 está en comunicación fluida con la cámara de modificación 826. La cámara de retención de tampón 828 está configurada para liberar agentes modificadores y/o de procesamiento y/o una solución de tampón en la cámara de modificación 826. Una cámara de amplificación 830 está en comunicación fluida aguas abajo con la cámara de
 10 modificación 826. La cámara de amplificación 830 puede incluir una o más redes moleculares 832 que subdividen la cámara de amplificación 830 atravesando una o más superficies conectivas.

Las redes moleculares 832 dentro de la cámara de amplificación 830 pueden incluir factores de amplificación, tales como enzimas, que amplifican la presencia detectable de uno o más tipos determinados de analitos que pasan a través
 15 de la cámara de amplificación 830. Estas enzimas se pueden configurar para unirse con los analitos. Se muestra una cámara de lavado 834 en comunicación fluida con la cámara de amplificación 830 y/o una cámara de detección 836. La cámara de lavado 834 está configurada para almacenar un fluido de lavado que se puede liberar en la cámara de amplificación 830 y/o la cámara de detección 836. La cámara de detección 836 está configurada para incluir una o más redes moleculares 838 que, a su vez, están configuradas para capturar uno o más tipos específicos de analitos
 20 modificados y/o procesados y/o amplificados. Las redes moleculares 838 están configuradas para subdividir la cámara de detección 834. El fluido de lavado resultante, que incluye porciones no unidas de la muestra, se puede enviar a una cámara de residuos 840, que está en comunicación fluida con la cámara de detección 836, para liberarlo de un puerto de salida.

Lógicamente, son posibles otras configuraciones del sistema 824. En algunos aspectos de la descripción, la cámara de amplificación 830 y/o la cámara de lavado 834 se pueden configurar como cámaras de detección, de manera similar a la cámara de detección 836. En aspectos adicionales de la descripción, uno o más sensores se pueden colocar dentro de las cámaras para la detección de uno o más tipos determinados de analitos. En otros aspectos adicionales de la descripción, se colocan una o más válvulas entre las cámaras para provocar selectivamente la comunicación
 30 fluida entre las cámaras. Por ejemplo, para liberar solución de tampón y/o fluido de lavado en ciertos momentos durante el procedimiento de realización de pruebas. En otros aspectos adicionales de la descripción, la presión positiva y/o negativa mediante una bomba acoplada de manera fluida provoca que el fluido de muestra entre a un puerto de entrada, pase a través de diversas cámaras y salga a través de un puerto de salida.

La **figura 8D** muestra otro sistema multicámara ejemplar 842, según un aspecto de la descripción. El sistema 842 incluye una estructura 844 para albergar diversas cámaras y otros componentes. El sistema 842 también incluye una cámara de filtración 846 que soporta un filtro 848. La cámara de filtración 846 está generalmente en comunicación fluida con un puerto de entrada para recibir una muestra. El filtro 848 se puede configurar como una red de lavado, un elemento de filtro o un tamiz. Una cámara de filtración de lavado 850 está en comunicación fluida con la cámara del
 40 filtro 848. La cámara de filtración de lavado 850 incluye uno o más filtros 852 que están configurados para evitar que ciertas porciones de una muestra pasen a su través. Una cámara de detección 854 está en comunicación fluida con la cámara de filtración de lavado 850; estas cámaras pueden estar separadas por una o más válvulas de fluido unidireccionales 853 para evitar el retrolavado. La cámara de detección 854 incluye al menos una red molecular 856, que está configurada para capturar al menos un cierto tipo de analito.

El sistema 842 incluye además una pluralidad de cámaras de retención 858. Cada cámara de retención 858 puede incluir uno o más tipos de fluido, tales como lavados, reactivos, tampones, etc. Cada cámara de retención 858 se puede configurar para liberar un fluido correspondiente tras el accionamiento por el usuario de al menos uno de una pluralidad de interruptores 860, que se muestran aquí como pulsadores. Los interruptores 860 se pueden configurar
 50 para activar válvulas electromecánicas o mecánicas. En algunos aspectos de la descripción, los interruptores no son accionados por el usuario de una manera directa y contemporánea, sino que están configurados para accionarse por un acontecimiento, tal como la activación de las válvulas unidireccionales 853, diversos detectores y/u otros mecanismos.

El sistema 842 incluye además un dispositivo de computación 862, que se puede configurar de manera similar al dispositivo de computación ejemplar 802. El dispositivo de computación 862 puede incluir sensores, circuitos de amplificación y circuitos de procesamiento de señales configurados para detectar la presencia de un cierto analito atrapado dentro de la red molecular 856. Se puede acoplar una pantalla 864 al dispositivo de computación 862 para visualizar los resultados y las configuraciones de la prueba. En algunos aspectos de la descripción, la pantalla 864 es
 60 una pantalla táctil que puede aceptar entradas del usuario para controlar los interruptores 860 y otros aspectos del sistema 842. Se puede conectar una interfaz externa 866 (p. ej., puerto USB) al dispositivo de computación 862 para extraer datos del dispositivo de computación 862.

La **figura 8E** muestra un dispositivo de pistola multicámara ejemplar 868, según un aspecto de la descripción. El dispositivo de pistola 868 incluye una pluralidad de cámaras conectadas de forma fluida configuradas de manera similar a las cámaras de los dispositivos 824 y 826, e incluye generalmente al menos una red molecular. Sin embargo, el dispositivo de pistola 1068 incluye una porción posterior 870 conectada de forma móvil a una porción anterior 872. Como se muestra, la porción anterior 872 está completamente retirada hacia la porción posterior 870. El accionamiento relativo de la porción posterior 870 lejos de la porción anterior 872 da como resultado una presión negativa relativa dentro de las cámaras y, por tanto, extraerá una muestra o un tampón a un puerto 874 del dispositivo de pistola 868 para la realización de pruebas o el tamponamiento de una muestra. Por el contrario, el accionamiento relativo de la porción posterior 870 hacia la sección anterior 872 da como resultado una presión positiva relativa dentro de las cámaras y, por tanto, expulsará una muestra o un tampón desde el puerto 874 después de la captura potencial de un cierto analito dentro de la red molecular.

Componentes de detección

Los dispositivos también pueden contener detectores de señales (es decir, sensores), tales como tubos fotomultiplicadores; celda fotovoltaica; hoja delgada de silicio multicristalino; película fina fotovoltaica; oblea fotovoltaica; módulo fotovoltaico; materiales imprimibles de recogida de luz; sistemas eléctricos solares basados en seleniuro de cobre-indio-galio; silicio monocristalino; silicio policristalino; silicio de película delgada de junta en tándem; fotodiodo; diodo semiconductor y otros fotodetectores capaces de convertir la energía de la luz indistintamente en corriente o tensión.

En algunos aspectos de la descripción, un dispositivo puede incluir diferentes conjuntos de sensores instalados dentro de las cámaras correspondientes. Un dispositivo (o volumen para la realización de pruebas/red de un dispositivo) puede incluir una o más fibras ópticas que se pueden conectar a uno o más amplificadores de señales; y puede contener uno o más detectores de señales; y puede transmitir una o más señales detectadas a uno o más circuitos eléctricos; y puede transmitir información eléctrica a un ordenador para su análisis.

Disposiciones de detección ejemplares

La **figura 9A** muestra un esquema detallado de una disposición de sensores ejemplar 900, según un aspecto de la descripción. La disposición de sensores 900 se usa para realizar un procedimiento de detección de analitos que usa una red molecular. La disposición de sensores 900 está configurada dentro de una cámara 902 que tiene una pluralidad de sensores 904 que definen al menos algunas porciones de la cámara 902. Cada sensor 904 puede incluir circuitos/dispositivos de amplificación, que amplifican la presencia de analitos y/o la señal producida por los sensores 904. Cada sensor 904 se puede configurar de una manera diferente para detectar aspectos diferentes de un analito, o una pluralidad de tipos diferentes de analitos. En algunos aspectos de la descripción, los sensores 904 se pueden configurar para detectar un movimiento, una temperatura, un potencial eléctrico, una luz (UV/visible), una vibración, una rigidez, una acidez, una basicidad, cambios de pH, una conductancia de energía (corriente, térmica, etc.), una tensión mecánica, una torsión mecánica, una elasticidad, campos magnéticos predeterminados y combinaciones de los mismos.

Una red molecular 906 construida a partir de diversas moléculas de captura y reticulantes se muestra acoplada a al menos uno de los sensores 902(a). Además, se muestra una pluralidad de analitos 908 capturados por la red molecular 906 y una pluralidad de moléculas de detección 906 unidas a los analitos mediante un procedimiento de amplificación. Lógicamente, muchos analitos carecen de propiedades que son fácilmente detectables por los sensores disponibles habitualmente. Para compensar esto, las moléculas de detección 910 incluyen propiedades fácilmente detectables por los circuitos y se usan para unirse a los analitos y, por tanto, permitir su detección. Por ejemplo, las moléculas de detección 910 se pueden unir con una sustancia ferrosa y el sensor 904(a) puede incluir un detector de tensión piezoeléctrico. Los sensores restantes 904(b)(c) y/o el sensor 904(a) pueden incluir imanes permanentes o electroimanes. Estos imanes pueden provocar que las moléculas de detección 910 se alejen o se acerquen a la red molecular 906 con una fuerza que provoca que el detector de tensión piezoeléctrico emita una señal eléctrica y, por tanto, indique la presencia de los analitos 908. En otro ejemplo, las moléculas de detección 910 se pueden unir con una sustancia conductora o resistiva, que altera la relación conductiva y/o capacitiva entre los sensores 904. En otro ejemplo, las moléculas de detección 910 se pueden unir con una sustancia fluorescente, lo que permite que los sensores 904 detecten la presencia de una cierta longitud de onda de la luz cuando se exponen a una longitud de onda de la luz diferente. En otro ejemplo, cada sensor 904 incluye una red molecular. Lógicamente, son posibles muchas más disposiciones de sensores.

La **figura 9B** muestra un esquema detallado de una disposición de sensores ejemplar 912, según un aspecto de la descripción. La disposición de sensores 912 incluye una red molecular 914 configurada de manera similar a la red molecular 906 de la Fig. 9A. Sin embargo, en esta disposición, las moléculas de detección están configuradas para

unirse a ciertas sustancias que tienen un cierto color visible, o varios colores. Se pueden disponer una o más lentes microscópicas 916 a la vista de la red molecular 914, para proporcionar una vista de los colores a simple vista. Por tanto, en algunos aspectos de la descripción, los analitos son detectables sin necesidad de aplicar energía a la disposición de sensores 912. En algunos aspectos de la descripción, la red molecular 914 está dispuesta de una
 5 manera específica, para mostrar un símbolo predeterminado, tal como una letra o un número. En algunos aspectos de la descripción, una superficie de soporte 918 para sostener la red molecular es transparente, para permitir que pase la luz pase a su través. En algunos aspectos de la descripción, la superficie de soporte 918 puede incluir un circuito de fuente de luz simple, tal como un LED acoplado de manera conmutable a una batería, para proporcionar luz de una longitud de onda específica o luz blanca.

10

La **figura 9C** muestra una disposición molecular ejemplar 920 de una pluralidad de moléculas de detección reticuladas, según con una realización de la invención. Las moléculas de detección 922 están configuradas para unirse a uno o más analitos determinados. Las moléculas de detección 922 se pueden reticular químicamente entre sí y/o PEGilar a factores de amplificación de señales 924, que se representan como círculos oscuros. Los factores de amplificación
 15 924 están presentes para mejorar la señal o para proporcionar la presencia de una señal. Los factores de amplificación 924 pueden incluir enzimas, nanopartículas metálicas, colorantes, fluoróforos, productos químicos, cofactores, sustratos y combinaciones de los mismos.

La **figura 9D** muestra una configuración de red molecular ejemplar 926, según una realización de la invención. Se muestra una vista macroscópica de la configuración de la red molecular 926 que tiene superficies irregulares 928. La configuración de red molecular 926 puede incluir densidades irregulares, cavidades y canales, múltiples propiedades químicas superficiales y otras propiedades físicas. Esto se muestra en la vista microscópica en la que diferentes tipos de moléculas de captura y elementos de amplificación están conectados mediante reticulaciones. Los canales y las cavidades proporcionan un área de superficie relativamente grande para capturar analitos y, por tanto, hacen un uso
 20 eficiente de una red molecular compacta. Tales canales y cavidades se pueden formar aireando la red molecular antes y/o durante el procedimiento de reticulación. En algunas realizaciones, se pueden usar micropartículas que no se unen para proporcionar los canales y las cavidades antes y/o durante el procedimiento de reticulación. Estas micropartículas que no se unen se pueden retirar después del procedimiento de reticulación mediante diversos procedimientos, tales como lavado, evaporación o disolución, y proporcionan, por tanto, los espacios vacíos para los canales y las cavidades.

25

Dispositivos, subsistemas y aspectos estructurales ejemplares

Como se señaló anteriormente con referencia a la **figura 8A**, se pueden configurar diversas configuraciones de los sensores y las redes moleculares descritos en esta invención dentro de una estructura modular que se interconecta
 30 independientemente con un dispositivo de computación externo, tal como el dispositivo de computación 802. Por el contrario, algunos aspectos de la descripción no requieren un dispositivo de computación. En un ejemplo, tal aspecto de la descripción se muestra en la **figura 10A**.

La **figura 10A** muestra un dispositivo de realización de pruebas ejemplar 1000 para detectar la presencia de diversos analitos, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 1000 está configurado como una estructura alargada que tiene una pluralidad de pocillos. En algunos aspectos de la descripción, el dispositivo 1000 está configurado como una tira de plástico desechable. Cada pocillo puede incluir una red molecular específica configurada respectivamente para
 40 indicar la presencia de un analito específico. Por ejemplo, el pocillo 1002 puede incluir una red molecular configurada para indicar la presencia de un virus específico mostrando un símbolo no visible anteriormente tras la aplicación de una muestra. De manera similar, el pocillo 1004 se puede configurar para indicar la presencia de una bacteria específica. De manera similar, el pocillo 1006 se puede configurar como un pocillo de control positivo para confirmar la funcionalidad operativa del pocillo 1002 y el pocillo 1004 si no aparecen símbolos víricos y bacterianos.

Las figuras 10B y 10C muestran una representación estructural simplificada de una cámara de realización de pruebas ejemplar 1008, según un aspecto de la descripción. La cámara 1008 incluye una superficie interior 1010 que soporta uno o más sensores 1012 y una o más redes moleculares 1014. Se puede introducir una muestra en la cámara 1008 a través de un tubo o canal fijado 1016. El canal 1016 puede incluir superficies lumbales, diversos filtros y tamices (colectivamente 1017) para retirar porciones de una muestra. Como se muestra en la **figura 10C**, una porción 1018 de la superficie interior 1010 incluye características físicas 1020 para soportar redes moleculares. Las características
 50 físicas se configuran como protuberancias multifacéticas con superficies de unión y no unión. Las superficies superiores 1022 pueden soportar las redes moleculares, mientras que las superficies laterales 1024 se pueden configurar para reducir la unión inespecífica de analitos. Estas características físicas también se pueden usar dentro del canal 1016, por ejemplo, las características físicas pueden estar ubicadas en las paredes del canal para detectar analitos específicos, así como para filtrar otros analitos.

55

La **figura 10D** muestra un esquema simplificado de una disposición de redes moleculares ejemplar 1026, según una realización de la invención. En esta disposición 1026, la detección de analitos se puede lograr inmovilizando los

60

analitos a través de la unión por redes moleculares sobre las paredes de la cámara 1028 de una cámara de prueba. El modo de unión se configura mediante las redes moleculares para alterar las propiedades físicas, químicas, magnéticas, eléctricas, mecánicas, de dispersión de la luz, refracción de la luz y/o reflexión de la luz de las paredes. Las paredes de la cámara se calibran generalmente según cualidades conocidas de las propiedades, tanto antes como
5 después de la realización de pruebas. Los sensores se pueden usar para comprobar estas propiedades para determinar si un analito está unido a la red molecular.

La **figura 11A** muestra una vista en perspectiva de un adaptador ejemplar 1100 para el procesamiento de muestras y/o fraccionamiento de muestras, según un aspecto de la descripción. El adaptador 1100 está configurado como un
10 tubo alargado 1102 que tiene características de fijación 1104 para la conexión fluidica a dispositivos de introducción y retirada de muestras, tales como jeringas y tubos. En este ejemplo, se muestran conectores de tipo Luer en cada extremo de un lumen interno 1106. Diversos filtros y tamices fraccionan el lumen 1106 en subáreas. Los filtros, los tamices y las superficies lumbales del lumen pueden incluir redes moleculares para capturar ciertos analitos. En uso, una muestra sin procesar se puede aplicar en un extremo mediante una primera jeringa. Cuando la muestra llena casi
15 por completo el lumen, se puede fijar una segunda jeringa al otro extremo y a continuación llenarla con reemplazamiento de la primera jeringa. De esta manera, la segunda jeringa se llena con una muestra purificada o procesada que no contiene los analitos capturados por los filtros, los tamices y las paredes del lumen.

La **figura 11B** muestra una vista lateral de una unidad de filtración ejemplar 1108, según un aspecto de la descripción.
20 De manera similar al adaptador 1100, la unidad de filtración 1108 incluye una o más redes moleculares internas configuradas como filtros, tamices y/o superficies lumbales. La unidad de filtración 1108 está configurada como un cartucho tubular, y es fácilmente sustituible por un cartucho idéntico o similar después de la saturación con analitos, como indica la presencia de una señal. La unidad de filtración 1108 se puede configurar dentro de un circuito cerrado y admite y expulsa fluido a la misma fuente de muestra. En algunas descripciones, la unidad de filtración 1108 está
25 configurada para unir células, restos celulares, desechos celulares, productos celulares, metales, quelantes, fármacos, productos biológicos, nitrógenos, citocinas, ácidos nucleicos, proteínas, virus, hongos, protozoos y otras moléculas y/o agentes que pueden ser retirados de una muestra biológica.

La **figura 12** muestra una vista en perspectiva de un dispositivo de contención punzante ejemplar 1200, según un
30 aspecto de la descripción. El dispositivo 1200 incluye una estructura 1202 configurada como un cartucho de plástico. Una micro- o macroaguja 1204 se prolonga desde la estructura 1202 y está en comunicación fluida con una cámara polimérica interna 1206 o tubo. La cámara 1206 puede incluir diversas propiedades químicas de revestimiento hidrófobas o hidrófilas. Un bulbo deformable y elástico 1208 se prolonga desde la parte superior de la estructura 1202 y está en comunicación fluida con la cámara 1206. Un puerto de muestreo 1208 se opone a la aguja 1204 y también
35 está en comunicación fluida con la cámara 1206. El puerto de muestreo 1208 puede incluir un adaptador para conectarlo a una jeringa o un dispositivo de diagnóstico. La cámara 1206 incluye una o más redes moleculares, y también puede incluir uno o más sensores. En uso, la aguja 1204 se puede aplicar al tejido diana para acceder a la vasculatura. El bulbo 1208 se bombea a continuación para extraer sangre a la cámara 1206 y sobre la red molecular. A continuación, se puede fijar una jeringa o un dispositivo de diagnóstico al puerto de muestreo 1210 para determinar
40 la presencia de un analito dentro de la red molecular.

La **figura 13A** muestra una vista en perspectiva de una red de lavado ejemplar 1300, según una realización de la invención. La red de lavado 1300 está construida a partir de una red molecular, que está configurada con 1302 para
45 filtrar una muestra que contiene uno o más analitos no deseados. La red de lavado 1300 se puede dimensionar para abarcar de manera manual y flexible un recipiente o tubo en un laboratorio o una instalación, o alternativamente preinstalar en una estructura de filtro. En uso, la red de lavado 1300 se puede aplicar para cubrir la abertura de un recipiente, tal como un cuenco o cilindro graduado. Una muestra no filtrada 1304 se puede verter a continuación sobre la red de lavado 1300 de manera que da como resultado una muestra filtrada 1306 que fluye al recipiente.

La **figura 13B** muestra una representación esquemática de una red de multiplexación ejemplar 1308 de redes
50 moleculares, según una realización de la invención. Una pluralidad de redes moleculares 1310 se estratifican, apilan o suspenden una sobre otra, y se pueden fijar además a una estructura mayor, tal como un marcador de detección. Cada red molecular incluye diversas moléculas de detección configuradas para producir una o más señales (S^1 , S^2 , S^3). Los ejemplos de singles incluyen, sin limitación, señales colorimétricas, fluorescentes, luminiscentes y
55 fosforescentes. Las moléculas de detección pueden estar configuradas para producir una única señal o múltiples señales (p. ej., múltiples colores) tras la captura de uno o más analitos determinados. Por ejemplo, S^1 = azul, S^2 = rojo y S^3 = amarillo. Además, $S^1 + S^2$ = púrpura y $S^1 + S^3$ = verde. Las señales de vinculación (p. ej., colores) y/o las combinaciones de señales para tipos específicos de analitos a través de las moléculas de detección correspondientes pueden, por tanto, indicar visualmente la presencia de diversos analitos.

La **figura 13C** muestra una representación esquemática de un volumen de prueba ejemplar 1312, según un aspecto
60 de la descripción. El volumen de prueba 1312 está configurado como una cámara con una entrada y una salida. El

volumen de prueba 1312 alberga una pluralidad de redes moleculares 1314 apiladas de manera alterna con una pluralidad de sensores. Los sensores 1316 pueden estar configurados para detectar luz u otras energías de onda, y pueden incluir celdas solares de silicio, celdas solares sensibilizadas con colorantes, celdas solares poliméricas, celdas solares orgánicas y/o nanoantenas únicas o multifacéticas sobre polímeros. El volumen de prueba 1312 incluye además un amplificador 1318 acoplado a los sensores 1316. El amplificador puede estar configurado como un concentrador solar luminiscente fabricado de materiales de silicio o polímero, y puede estar conectado a una celda solar FV multifacética de silicio o polimérica. El amplificador también puede estar configurado como un concentrador fotovoltaico o una red de nanoantenas. En uso, se fabrica una muestra para llenar el volumen de prueba, lo que puede provocar que una o más clases de analitos sean capturados por las redes moleculares. La presencia de los analitos puede influir en la propagación de luz y energía a través del volumen de prueba 1312, que es detectable por los sensores 1316. Las propiedades de luminancia y/o térmicas y/o fotovoltaicas de los sensores 1316 se pueden comparar a continuación con las propiedades esperadas que son indicativas o no indicativas de la presencia de analitos y, por consiguiente, determinan su presencia en la muestra.

15 La **figura 14A** muestra una representación simplificada de una red molecular ejemplar configurada como una esponja 1400, según una realización de la invención. La esponja 1400 está construida a partir de una estructura de red molecular absorbente de celda abierta (macro o micro), de manera similar a una esponja artificial u orgánica. En algunas realizaciones, la esponja está construida de un híbrido de material de esponja artificial (p. ej., espuma polimérica de celda abierta) entrelazado con redes moleculares. Como se muestra en la **figura 14B**, en uso, la esponja 1400 se puede colocar en un recipiente que contiene una muestra. La esponja 1400, a lo largo del tiempo, puede absorber analitos "A" mediante interacción física con las moléculas de captura "C" de la esponja 1400. Esto se produce debido a las propiedades absorbentes de la esponja que atraen a la fuerza el fluido de la muestra. La esponja 1400 puede retirarse de la muestra después de la saturación y analizarse para detectar la presencia de analitos.

25 La **figura 15A** muestra una vista superior de un dispositivo multicámara ejemplar 1500, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 1500 incluye una carcasa estructural 1502 que tiene tubos y cámaras internos. El dispositivo incluye un puerto de entrada 1504, una primera entrada de lavado 1506, una entrada de reactivo de detección 1508 y una segunda entrada de lavado 1510, todos en comunicación fluida con un canal principal 1511. El canal principal 1511 está además en comunicación fluida con una pluralidad de cámaras de prueba 1512 que contienen una o más redes moleculares. El canal principal 1511 termina en última instancia en un puerto de residuos. En uso, se puede introducir una muestra en el canal principal 1511, en el puerto de entrada 1504, mediante presión positiva o negativa. La muestra puede ser alterada químicamente debido a la entrada de diversos lavados y reactivos en las entradas 1504, 1506 y 1508. Por tanto, cuando la muestra alcanza las cámaras de prueba 1512, estará químicamente alterada en comparación con cuando se introdujo originalmente en el dispositivo 1500.

35 La **figura 15B** muestra una vista superior de otro dispositivo multicámara ejemplar 1515, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 1515 está configurado de manera similar al dispositivo 1500 de la **figura 15A**. Sin embargo, el dispositivo 1515 incluye cámaras internas 1516, 1518 que están en comunicación fluida con una cámara de distribución de muestras 1520. Las cámaras internas 1516 y 1518 pueden contener diversos reactivos, enzimas, lavados, productos químicos y similares. Se puede hacer que las cámaras internas 1516 y 1518 estén en comunicación fluida con la cámara de distribución de muestras 1520 mediante el accionamiento de un interruptor 1522 y una lengüeta 1524, respectivamente. En uso, se introduce inicialmente una muestra en la cámara de distribución 1520. Un usuario puede activar manualmente el interruptor 1522 y la lengüeta 1524 en un orden deseado para liberar sustancias a la cámara de distribución de muestra 1520 y provocar que la muestra cambie químicamente antes de, o durante, la introducción en las cámaras de prueba 1512.

La **figura 16** muestra una vista despiezada de otro dispositivo multicámara ejemplar 1600, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 1600 está construido de una pluralidad de capas 1602(a-f), que tienen, cada una, una o más aberturas. Cuando se ensamblan las capas 1602(a-f), las aberturas forman canales y cámaras que recorren horizontal y/o verticalmente el interior del dispositivo 1600. Los canales y las cámaras pueden incluir una o más redes moleculares. En uso, una muestra puede migrar horizontal o verticalmente dentro y a través del dispositivo para llenar cada cámara. Por consiguiente, las cámaras se pueden analizar a continuación para detectar la presencia de diferentes tipos de analitos. Los sensores se pueden integrar dentro de cada capa para emitir la señal. Alternativamente, se puede retirar cada capa y leer mediante un lector.

55 La **figura 17** muestra una vista superior de otro dispositivo multicámara ejemplar 1700, según un aspecto de la descripción. El dispositivo 1700 está construido de manera similar al dispositivo 1500. Sin embargo, el dispositivo 1500 incluye cuatro vías distintas (R_1 , R_2 , R_3 , R_4) para la detección diferencial de analitos de la muestra. Cada ruta R_1 -4 incluye una pluralidad de cámaras (1-12) interconectadas por una pluralidad de canales (a-p). Cada cámara puede incluir diferentes redes moleculares con características químicas y mecánicas de preparación de muestras, características de selección, características de filtración, características de fraccionamiento, sensores, puntos de acceso y/o puntos de entrada/salida de datos diferentes. Cada canal puede incluir revestimientos luminales,

características de selección y/o características de filtración diferentes. En uso, una muestra puede migrar a través de todo el dispositivo para llenar la cámara de prueba. Las propiedades químicas de selección y las características de fraccionamiento en combinación con los sensores pueden determinar a continuación la presencia de uno o más tipos de analitos dentro de cada cámara de prueba.

5

VI. EJEMPLOS

EJEMPLO 1: RED MOLECULAR PARA DETECTAR UNA INFECCIÓN VÍRICA

10 Este ejemplo profético describe la fabricación de una red molecular tricapa para la detección de una infección vírica. La red une 1) interferón alfa; 2) interferón beta, 3) SARM vírico y 4) viperina vírica.

Materiales

15 Agentes de captura

1) Anticuerpos policlonales contra interferón-alfa (solución madre = 1 mg/mL)

2) Anticuerpos policlonales contra interferón-beta (solución madre = 1 mg/mL)

20

3) Anticuerpos policlonales contra IPS-1 (MAVS) (solución madre = 1 mg/mL)

4) Anticuerpos policlonales contra viperina (cig5) (solución madre = 1 mg/mL)

25 Enlazadores

5) EGS (solución madre = 25 mM en DMSO)

Procedimientos

30

1. Mezclar los agentes de captura 1-4 (anticuerpos) en una relación 1:1:1:1.

2. Subcapa: añadir una alícuota de 10 uL que contenga 100 ug de mezcla de anticuerpos a la superficie del sustrato (nitrocelulosa). Dejar absorber durante la noche a 4 °C. Retirar el líquido restante, que incluye todos los anticuerpos no inmovilizados.

35

Primera capa

3. Pipetear 10 uL de mezcla de anticuerpos sobre la subcapa. Añadir inmediatamente 1 uL de EGS. Incubar a temp. ambiente durante 1 h.

40

4. Extinguir añadiendo 10 uL de tampón Tris 50 mM pH 7,5, deje reposar durante 10 min.

5. Retirar el líquido restante con pipeta. Lavar la red 3x veces pipeteando 50 uL de PBS pH 7,4 sobre la red y retirar.

45

Capas Adicionales

6. Repetir las etapas 4-7 para generar la segunda capa.

50

7. Repetir las etapas 4-7 para generar la tercera capa.

Liofilizar o añadir 50 uL de PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 °C hasta su uso.

55

TABLA 8 Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente(s) de captura	Enlazador(es)
Primera	Anticuerpos contra IFN- α , IFN- β , IPS1, viperina	EGS
Segunda	Los mismos	Los mismos
Tercera	Los mismos	Los mismos

EJEMPLO 2: RED MOLECULAR PARA DETECTAR UNA INFECCIÓN BACTERIANA

Este ejemplo profético describe la fabricación de una red molecular tricapa para la detección de una infección bacteriana. La red une 1) lipopolisacárido de bacterias gramnegativas, 2) lípido A de bacterias gramnegativas, 3) ácido teicoico de bacterias grampositivas y 4) ADN bacteriano de CpG.

Materiales

10 Agentes de captura

- | | | |
|----|---|----------------------------|
| | 1) Anticuerpos policlonales contra lipopolisacárido | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 15 | 2) Anticuerpos policlonales contra lípido A | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 3) Anticuerpos policlonales contra peptidoglucano | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 4) Anticuerpos policlonales contra ácido teicoico | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 20 | 5) Péptido de unión a ADN 1 (VLF GKLA) (SEQ ID NO: 12). | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 6) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (SEQ ID NO: 13) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 7) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (SEQ ID NO: 14) | (solución madre = 1 mg/mL) |

25

Enlazadores

- | | | |
|----|--------------------------|-----------------------------------|
| | 8) EGS | (solución madre = 25 mM en DMSO) |
| 30 | 9) EMCS | (solución madre = 25 mM en DMSO) |
| | 10) BS(PEG) ₉ | (solución madre = 250 mM en DMSO) |

Procedimientos

35

1. Mezclar los agentes de captura 1-4 (anticuerpos) en una relación 1:1:1:1 en el Tubo A (1 µg/mL).
2. Mezclar los agentes de captura 5-7 (péptidos de unión a ADN) en una relación 1:1:1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).

40

3. Mezcle partes iguales del Tubo A + Tubo B en un nuevo Tubo C.

4. Subcapa: añadir una alícuota de 10 µL del Tubo C a la superficie del sustrato (nitrocelulosa). Dejar absorber durante la noche a 4 °C. Retirar el líquido restante, que incluye todos los anticuerpos no inmovilizados.

45 Primera capa

1. Pipetear 10 µL de mezcla del Tubo C sobre la subcapa. Añadir inmediatamente 1 µL cada EGS, BS(PEG)₉ y EMCS. Incubar a temp. ambiente durante 1 h.
2. Mezclar agitando ligeramente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
3. Extinguir añadiendo 10 µL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
4. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 µL de PBS con pipeta

55

Capas Adicionales

1. Repetir las etapas 1-4 para generar la segunda capa.
2. Repetir las etapas 5-8 para generar la tercera capa.
3. Liofilizar o añadir 50 µL de PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 °C hasta su uso.

TABLA 9 Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente(s) de captura	Enlazador(es)
Primera	Anticuerpos y péptidos de unión a ADN	EGS, BS(PEG)9, EMCS
Segunda	Los mismos	Los mismos
Tercera	Los mismos	Los mismos

5

EJEMPLO 3: LAS REDES MULTILAYER SON SUPERIORES A LAS REDES MONOCAPA FABRICADAS CON EL MISMO CONTENIDO DE AGENTES DE CAPTURA

Se prepararon redes monocapa, bicapa, tricapa y cuatricapa que unen 1) peptidoglucano bacteriano, 2) ácido lipoteicoico, 3) lipopolisacárido bacteriano, 4) lípido A bacteriano y 5) ADN de CpG bacteriano. Como se muestra en la Fig. 2, las multicapas fueron más efectivas en la unión de analitos que las monocapas fabricadas usando la misma cantidad total de agentes de captura.

Materiales

15

Agentes de captura para redes bacterianas

1) anticuerpos contra peptidoglucano

20

2) anticuerpos contra lípido A

3) anticuerpos contra lipopolisacárido

25

4) péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)

5) péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)

6) péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

30 Enlazadores

7) EMCS (solución madre = 25 mM)

35

8) EDC (solución madre = 25 mM)

9) BS(PEG)9 (solución madre = 25 mM)

Leche desnatada (100 %)

40 Solución salina tamponada con fosfato pH 7,4

Tampón Tris 50 mM pH 7,5

Sustrato de poliestireno

45

Redes bi-, tri- y cuatricapa

1) Mezclar los anticuerpos contra lípido A, lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 ug/mL)

50

2. Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).

3) Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

55

Primera capa

ES 2 808 408 T3

4) Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 1ª capa.

5) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EGS, EMCS y BS(PEG)₉ sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces

6) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente

7) Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.

10

8) Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta

La segunda, tercera y cuarta se capas prepararon repitiendo las etapas 11-15 anteriores, pipeteando cada vez los componentes sobre las una o más capas ya formadas. Las redes resultantes se almacenaron a 4 grados Celsius en PBS y 0,001 % de azida sódica y se almacenaron a 4 grados Celsius hasta su uso.

15

Redes monocapa con 1x, 2x o 3x la concentración de captura

1) Mezclar los anticuerpos contra lípido A, lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 ug/mL (1x), 10 ug/mL (2x), 100 ug/mL (3x)).

20

2) Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL (1x), 10 mg/mL (2x), 100 mg/mL (3x)).

25

3) Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo 1xC, 2xC, 3xC.

Primera capa

4) Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla de cada tubo C (1xC-3xC) a la superficie para generar la 1ª capa.

30

5) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EGS, EMCS y BS(PEG)₉ sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces

35

6) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente

7) Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.

8. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta

40

9) Añadir 50 uL PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 grados Celsius hasta su uso (también se puede liofilizar y almacenar a temperatura ambiente o 4 grados hasta su uso).

Procedimiento de ensayo

45

1) Las redes mono-, bi-, tri- y cuatricapa se construyeron por triplicado y se compararon con el formato de ELISA (moléculas de captura absorbidas no reticuladas) y se construyeron redes individuales con 1x, 2x y 3x las concentraciones de componentes de captura en presencia de concentraciones equimolares de EGS, EMCS y BS(PEG)₉.

50

2) Las muestras de sangre completa tratadas con EDTA se enriquecieron con 50 pg/mL de lipoproteína acilada bacteriana marcada con rodamina y se añadieron a 10 µL/pocillo.

55

3) Las muestras y las moléculas de detección se incubaron durante 15 minutos (o 60 minutos para ELISA) a temperatura ambiente.

4) Los pocillos se lavaron con 300 uL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween 20 y 10 % de albúmina (tampón de lavado).

60

5) Los pocillos se excitaron a 549 nm y se midió la absorbancia a 566 nm mediante un lector de placas.

Resultados

Este es un ejemplo del principio de las redes multicapa y la capacidad de unión inherente. Las mono-, bi- tri- y cuatricapa se construyeron por triplicado con componentes de captura a una concentración de 1x por capa en pocillos de una placa de poliestireno. También se construyeron redes monocapa con 1x, 2x y 3x las concentraciones de componentes de captura. Todas las redes de este experimento se construyeron usando reticulantes de EGS, EMCS y BS(PEG)₉. El rendimiento de las redes se comparó con el formato de ELISA estándar (formato de ELISA estándar = moléculas de captura absorbidas no reticuladas). Las muestras de sangre completa tratadas con EDTA se enriquecieron con 50 pg/mL de lipoproteína acilada bacteriana y se añadieron a 10 µL/pocillo. Las muestras y las moléculas de detección se incubaron durante 15 minutos con cada red molecular (o 60 minutos para ELISA) y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina (tampón de lavado). Se midió la absorbancia a 566 nm mediante un lector de placas. Los valores representan la absorbancia media de las redes por triplicado. Las barras de error representan el error estándar de la media (EEM). Los valores de p se obtuvieron mediante la prueba t de Student de datos emparejados. Véase la **Fig. 2**.

Los datos representan múltiples redes moleculares incubadas con o sin exceso de analito (lipoproteína acilada) en sangre completa durante 15 minutos, antes del lavado y el análisis de fluorescencia. Los datos demuestran la importancia de la estratificación de una red molecular y la capacidad de unión inherente de las redes moleculares estratificadas. Los datos también señalan la importancia de la estratificación, ya que 3x captura no es mejor que una red tricapa con el mismo número de agentes de captura en la red.

EJEMPLO 4: EJEMPLO DEL VALOR DE LAS REDES ESTRATIFICADAS EN LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE ANALITOS ESPECÍFICOS EN UNA MUESTRA DE SANGRE MIXTA

Para comparar las propiedades de una red estratificada y una red no estratificada que tienen el mismo volumen, se construyeron dos variantes de redes de captura bacterianas (12 réplicas por variante) y se evaluó la capacidad para unir dos analitos bacterianos con propiedades químicas muy diferentes.

Las redes tricapa se construyeron con moléculas de captura y enlazadores BS(PEG)₉, EMCS y EGS. Se construyó una red monocapa de volumen equivalente a la red tricapa usando los mismos enlazadores y el mismo número de moléculas de captura, BS (PEG)₉, EMCS y EGS.

Las concentraciones clínicas de analitos bacterianos marcados con fluoróforo se incorporaron a sangre completa y se incubaron con cada variante de las redes durante 15 minutos y a continuación se lavaron. El analito inmovilizado se midió mediante la emisión de fluorescencia a 525 y 566 nm.

Se prepararon redes que unían

1) peptidoglucano bacteriano

2) ácido lipoteicoico

3) lipopolisacárido bacteriano

4) lípido A bacteriano

5) ADN de CpG bacteriano

Materiales

Agentes de captura para redes bacterianas

4) anticuerpos contra peptidoglucano

5) anticuerpos contra lípido A

6) anticuerpos contra lipopolisacárido

4) péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)

5) péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)

6) péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

Enlazadores

5 7) EMCS (solución madre = 10 µM)

8) EDC (solución madre = 2,5 µM)

10 9) BS(PEG)₉ (solución madre = 5 µM)

Leche desnatada (100 %)

Solución salina tamponada con fosfato pH 7,4

15 Tampón Tris 50 mM pH 7,5

Superficie de poliestireno

Procedimientos para construir redes estratificadas

20 9) Mezclar los anticuerpos contra lípido A, lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 ug/mL)

10) Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).

25 11) Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

12) Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 1ª capa.

30 13) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EGS, EMCS y BS(PEG)₉ sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente el sustrato hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

14) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

35 Primera, segunda y tercera capas

1) Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla del tubo C a la subcapa para generar la 1ª capa.

40 2) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EGS, EMCS y BS(PEG)₉ sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces

3) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Las etapas 1-3 se repitieron para añadir las capas 2 y 3, pipeteando las mezclas agentes de captura y enlazadores sobre la una o más capas inferiores existentes.

Procedimientos para construir redes monocapa con un volumen equivalente a redes estratificadas

50 1. Mezclar los anticuerpos contra lípido A y lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 ug/mL).

2. Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).

55 3. Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

4. Añadir [pipetear] 40 uL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 1ª capa.

60 5. Añadir inmediatamente [pipetear] 4 uL de EGS, EMCS y BS(PEG)₉ sobre el depósito de mezcla del tubo C y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

6. Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

7. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Bloquear las redes con leche 100 % desnatada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5 Procedimiento de ensayo

1) Se construyeron redes mono- o tricapa de volumen equivalente en réplicas de 12.

10 2) Las muestras de sangre completa tratada con EDTA se enriquecieron con 50 pg/mL de lipoproteína acilada bacteriana marcada con rodamina y se añadieron a 10 µL/pocillo o 5 pg/mL de dipéptido muramilo bacteriano marcado con FITC y se añadieron a 10 µL/pocillo.

3) Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

15 4) Los pocillos se lavaron con 300 uL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina (tampón de lavado).

20 5) Los pocillos se excitaron a 490 nm y 549 nm y se midió la absorbancia a 525 nm y 566 nm, respectivamente, mediante un lector de placas.

Resultados

25 Los resultados se resumen en la **Fig. 3**. Los valores representan la fluorescencia promedio detectada en las 12 réplicas de cada variante de las redes. Las barras de error representan el error estándar de la media (EEM). Se usó la prueba t de Student de muestras no emparejadas para comparar la significación. Se determinó la significación entre las redes tricapa y las redes monocapa de igual volumen en la unión de dipéptido muramilo (valor de $P = 0,005$). No hubo una diferencia significativa en la unión de lipoproteína acilada entre las redes tricapa y las redes monocapa de igual volumen.

30 Esta red está optimizada para unir distintivos de peptidoglucano bacteriano, los componentes de los carbohidratos, ácido *N*-acetilmurámico (NAM) y *N*-acetilglucosamina (NAG) y el componente proteico, un di-, tri- o pentapéptido (dipéptido muramilo). Este ejemplo de red molecular no está optimizado para detectar un analito hidrófobo conectado al peptidoglucano, tal como una lipoproteína acilada bacteriana. Sin embargo, se puede realizar una modificación de
35 la red molecular para favorecer la interacción de una lipoproteína acilada mediante la incorporación de agentes de captura lipófilos y el aumento de las interrelaciones.

EJEMPLO 5: UNIÓN DE ANALITOS BACTERIANOS A UNA RED USANDO SANGRE COMPLETA

40 Los datos representan una serie de estudios que analizan la unión de numerosos distintivos bacterianos (y humanos) a una red molecular diseñada para inmovilizar distintivos bacterianos. Los datos muestran (i) que la red puede unir niveles muy bajos de numerosos analitos en sangre completa, (ii) que la red puede unir numerosas moléculas con propiedades químicas superficiales diferentes simultáneamente, (iii) la red puede unir más analito más rápidamente que el ELISA y (iv) la red excluye la unión de una proteína notablemente adherente, el fibrinógeno humano, para la
45 que no fue diseñada para unirse.

Este ejemplo y la **figura 4** muestran una comparación de la capacidad de unión de múltiples analitos del ELISA y la red molecular. Los analitos bacterianos marcados con fluoróforo (A, lipopolisacárido; B, lipopéptido acilado; C, dipéptido muramilo; D y E, oligonucleótidos de CpG bacteriano; y F, fibrinógeno humano como control) se incorporaron
50 a sangre completa tratada con EDTA en concentraciones clínicamente relevantes con réplicas del ELISA o la red molecular construidas con componentes de captura contra los antígenos bacterianos: componentes de la membrana exterior de bacterias gramnegativas (lipopolisacárido y lípido A) y componentes de la pared celular de bacterias grampositivas (peptidoglucano) y ADN de CpG bacteriano. Debido a limitaciones en los fluoróforos, se incorporó LPS y ADN de CpG 2 a las mismas muestras de sangre, se incorporó lipopéptido acilado y ADN de CpG 1 y se incorporaron
55 dipéptido muramilo y fibrinógeno se a las mismas muestras de sangre. Las muestras se incubaron con el ELISA durante 60 minutos o con la red molecular durante 15 minutos antes del lavado. La fluorescencia se evaluó usando un lector de placas fluorescente. Los valores representan la fluorescencia promedio emitida por los analitos inmovilizados en el formato de ELISA (línea gris) o la red molecular (línea negra).

60 Se prepararon redes que unían:

6) peptidoglucano bacteriano

- 7) ácido lipoteicoico
- 8) lipopolisacárido bacteriano
- 9) lípido A bacteriano
- 10) ADN de CpG bacteriano

10 Materiales

Agentes de captura para redes bacterianas

- 7) anticuerpos policlonales contra peptidoglucano (solución madre = 1 mg/mL)
- 8) anticuerpos policlonales contra lípido A (solución madre = 1 mg/mL)
- 9) anticuerpos policlonales contra lipopolisacárido (solución madre = 1 mg/mL)
- 4) péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 5) péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 6) péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

Enlazadores

- 7) MCS (solución madre = 2 M)
- 8) GS (solución madre = 1,5 M)
- 9) BS(PEG)9 (solución madre = 1 M)
- 10) formaldehído (Solución madre = 0,115 % v/v)

Leche desnatada (100 %)

Solución salina tamponada con fosfato pH 7,4

Tampón Tris 50 mM pH 7,5

Poliestireno

Procedimientos para construir redes estratificadas

- 15 Mezclar los anticuerpos contra lípido A y lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 mg/mL).
- 16 Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).
- 17 Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

Primera capa

- 18 Añadir [pipetear] 10 L de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 1ª capa.
- 19 Añadir inmediatamente [pipetear] 4 uL de cada uno de los siguientes: formaldehído, EGS, EMCS y BS(PEG)9 sobre los depósitos de mezcla del tubo C y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
- 20 Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Segunda capa

- 21) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 2ª capa.
- 5 22) Añadir inmediatamente [pipetear] 4 µL de EGS y a continuación 4 L de EMCS sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
- 23) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

10

Tercera capa

- 24) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 3ª capa.
- 15 25) Añadir inmediatamente [pipetear] 4 µL de cada uno de los siguientes: EGS, EMCS y BS(PEG)9 sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
- 26) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

20

Cuarta capa

- 27) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla del tubo C a la superficie para generar la 4ª capa.
- 25 28) Añadir inmediatamente [pipetear] 4 µL de EGS, EMCS y BS(PEG)9 sobre la mezcla del tubo C depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
- 29) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.
- 30 30) Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 µL de PBS con pipeta.
- 31) Bloquear las redes con 100 µL de leche 100 % desnatada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Métodos para el revestimiento de ELISA

35

8) Mezclar los anticuerpos contra lípido A y lipopolisacárido y peptidoglucano en una relación 1:1:1 en el tubo A (1 mg/mL).

40

9) Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).

10) Mezclar los anticuerpos antibacterianos y péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

11) Revestir 50 µL de Tubo C por pocillo y dejar que se absorban durante la noche a 4 °C.

45

12) Lavar los pocillos con 3 x 100 µL de PBS.

13) Bloquear con 100 µL de leche 100 % desnatada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Procedimiento de ensayo

50

1) La sangre completa tratada con EDTA de ocho donantes agrupados se dividió en 19 alícuotas para las diluciones en serie.

55

2) Se usaron 5 analitos bacterianos marcados con fluoróforo y 1 analito humano marcado con fluoróforo (como control) con propiedades químicas superficiales diferentes.

3) Se preparó un conjunto de dos clases de analitos por dilución (LPS + ADN de CpG 2; lipoproteína acilada + ADN de CpG 1 y dipéptido muramilo + fibrinógeno).

60

4) Se realizaron diluciones en serie 1:2 con los analitos siguientes:

a. Lipopolisacárido - Intervalo: 0,03-2 ng/mL

- b. Lipopéptido acilado - Intervalo: 0,03-1 ng/mL
- 5 c. Dipéptido Muramilo - Intervalo: 0,03-1 ng/mL
- d. ODN de CpG 1 - Intervalo: 0,015-0,5 pMol
- e. ODN de CpG 2 - Intervalo: 0,015-0,5 pMol
- 10 f. Fibrinógeno humano - Intervalo: 0,06-2 µg/mL
- 5) Se añadieron 20 µL de PBS a cada pocillo.
- 6) Se añadieron 5 µL de cada dilución a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos (para las redes) y 60 minutos (ELISA) a temperatura ambiente.
- 7) Los pocillos se lavaron una vez con 300 uL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina (tampón de lavado).
- 20 8) Los pocillos se excitaron a 490, 495, 549, 592 nm y se midió la absorbancia a 525, 519, 566 y 618 nm, respectivamente, mediante un lector de placas.

EJEMPLO 6: RED MOLECULAR PARA DETECTAR UNA INFECCIÓN POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

25 Este ejemplo profético describe la fabricación de una red molecular tricapa para la detección de una infección por *Staphylococcus aureus*. La red une 1) *Staphylococcus aureus*, 2) peptidoglucano de *S. aureus*, 3) SsaA de *S. aureus*, 4) TSST-1 de *S. aureus*, 5) α-toxina de *S. aureus*, 6) polisacáridos capsulares y 7) ADN de CpG bacteriano.

Materiales

30

Agentes de captura

- | | |
|--|----------------------------|
| 1) Anticuerpos policlonales contra <i>Staphylococcus aureus</i> | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 35 2) Anticuerpos policlonales contra peptidoglucano de <i>S. aureus</i> | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 3) Anticuerpos policlonales contra SsaA de <i>S. aureus</i> | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 40 5) Anticuerpos policlonales contra TSST-1 | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 5) Anticuerpos policlonales contra α-toxina | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 6) Complemento C3 | (solución madre = 1 ug/mL) |
| 45 7) Proteína de unión a lectina | (solución madre = 1 ug/mL) |
| 8) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| 9) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| 50 10) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |

Enlazadores

- | | |
|---------------------|-----------------------------------|
| 55 11) EGS | (solución madre = 25 mM en DMSO) |
| 12) EMCS | (solución madre = 25 mM en DMSO) |
| 13) BS(PEG)9 | (solución madre = 250 mM en DMSO) |
| 60 14) Formaldehído | (Solución madre = 37 % v/v) |

Procedimientos

- 5 1. Mezclar los agentes de captura 1-7 (anticuerpos y receptores proteicos) en una relación 1:1:1:1 en el Tubo A (1 ug/mL).
2. Mezclar los agentes de captura 8-10 (péptidos de unión a ADN) en una relación 1:1:1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).
3. Añadir partes iguales del Tubo A y Tubo B a un nuevo Tubo C.

10 Primera capa

4. Pipetear 10 uL de mezcla del Tubo C sobre el sustrato (poliestireno). Añadir inmediatamente 1 uL de cada EGS, BS(PEG)₉ y EMCS. Incubar a temp. ambiente durante 1 h.
- 15 5. Mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
6. Extinguir añadiendo 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
7. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

20 Segunda capa

8. Repetir las etapas 4-7; a continuación, añadir 10 uL de solución de 0,1 % (p/v) de formaldehído en PBS, dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

25 Tercera capa

9. Repetir las etapas 4-8 para generarla.
- 30 Liofilizar o añadir 50 uL de PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 °C hasta su uso.

TABLA 10 - Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente(s) de captura	Enlazador(es)
Primera	Anticuerpos, proteínas de unión a ADN, lectina, C3	EGS, BS(PEG) ₉ , EMCS
Segunda	Los mismos	Los mismos
Tercera	Los mismos	Los mismos

35 EJEMPLO 7: RED MOLECULAR PARA DETECTAR UNA INFECCIÓN POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A LA METICILINA

Este ejemplo profético describe la fabricación de una red molecular tricapa para la detección de una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. La red une proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) y ADN de CpG bacteriano.

40 Materiales

Agentes de captura

- 45 1) Anticuerpos contra PBP2a (clones AC10, 332/423, 198) (solución madre = 1 µg/mL)
- 2) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 3) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 50 4) Péptido de unión a ADN 7 (RRRRRRRRRRRR) (solución madre = 1 mg/mL)
- 5) pAb contra *S. aureus* (solución madre = 1 µg/mL)
- 55 6) mAb contra *S. aureus*, IgM (solución madre = 1 µg/mL)

ES 2 808 408 T3

- 7) mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13 (solución madre = 1 µg/mL)
8) mAb contra *S. aureus*, clon 704 (solución madre = 1 µg/mL)
5 9) pAb contra proteína A (solución madre = 1 µg/mL)

Enlazadores

- 10 5) BMPH (solución madre = 285 nM)
6) EGS (solución madre = 5,9-6,03 µM)
7) EMCS (solución madre = 0,03 µM)
15 8) BS³ (solución madre = 14,4 µM)
8) Formaldehído (solución madre = 37 % p/v)

Agentes de detección

- 20 9) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante GCCAGCAGCGCGGTAATACG (n.º de entrada de GenBank M87484) (SEQ ID NO: 13).
25 10) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante GGACTACCAGGGTATCTAATCC (n.º de entrada de GenBank M87484) (SEQ ID NO: 14).
11) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante GGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATATAGG (SEQ ID NO: 15).
30 12) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante AATAGAGAAAAAAAAAAGATGGCAAAG (SEQ ID NO: 16).
13) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante AATAGAGAAAAGAAAAAAAAAGATGGCAAAG (SEQ ID NO: 17).
14) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante AGATGTGCACAGTTATTACACATAT (SEQ ID NO: 18).
35 10) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante GCTATTATTTACTTGAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAACT (SEQ ID NO: 19).
11) Sonda de *S. aureus* marcada con colorante ACGACA AVVATGCAVVAVVTG (n.º de entrada de GenBank X68417) (SEQ ID NO: 20).
40 11) Sonda de *mecA* marcada con colorante GCAATACAATCGCACTACATTAATAG (n.º de entrada de GenBank X52593) (SEQ ID NO: 21).
45 12) Sonda de *mecA* marcada con colorante CATT TTTGAGTTCTGCAGTACCG (n.º de entrada de GenBank X52593) (SEQ ID NO: 22).
13) Sonda de *mecA* marcada con colorante TCATAGCGTCATTATTCC (SEQ ID NO: 23).
50 14) Sonda de *mecA* marcada con colorante ATCACTTGGTATATCTTCACC (SEQ ID NO: 24).
15) Sonda de *mecA* marcada con colorante TATCCACCCTCAAACAGGTGAATT (SEQ ID NO: 25).
16) Sonda de *mecA* marcada con colorante CCAAACCCGACA ACTAC (SEQ ID NO: 26).
55 17) Sonda de *mecA-mecRI* marcada con colorante CGTGT CAGATACATTTCCG (SEQ ID NO: 27).
18) Sonda de *mecI* marcada con colorante CCGGAATTCGCATATGGATTTCCAC (SEQ ID NO: 28).
19) Sonda de *mecI* marcada con colorante GATGGTTTCGTAGGTTATGTTG (SEQ ID NO: 29).
60 20) Sonda de *mecI* marcada con colorante CGGATCCGAAATGGAATTAATATAATG (SEQ ID NO: 30).

ES 2 808 408 T3

21) Sonda de *mecl* marcada con colorante CGGAATTCGACTTGATTGTTTCCT (SEQ ID NO: 31).

Albúmina sérica bovina (BSA) (solución madre = 1 mg/mL)

5 Procedimientos

1. Los anticuerpos contra PBP2a se diluyen a (1 ug/mL) en el tubo A.
2. Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).
3. Mezclar los anticuerpos contra PBP2a y los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

Subcapa

4. Añadir [pipetear] 5 uL de BSA sobre el sustrato.
5. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EDC a la BSA depositada, añadir 1 uL de formaldehído a la BSA añadida.
6. Mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
7. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 hora [esta etapa formará una base muy reticulada para cumplir una función estructural].
8. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
9. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Primera capa

10. Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla del tubo A la superficie para generar la 1ª capa.
11. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de DTSSP sobre la mezcla del tubo A depositada y mezclar agitando suavemente hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm 5 a 10 veces [para construir brazos de espaciador más largos entre un subconjunto de moléculas de captura].
12. Esperar 5 minutos y a continuación añadir 1 uL de sulfo-DST al depósito y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [para construir brazos de espaciador más cortos entre un subconjunto de moléculas de captura y generar una 2ª capa-1ª capa completas para capturar analito de PBP2a fragmentado].
13. Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.
14. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
15. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Segunda capa

16. Añadir 5 uL del tubo B a la parte superior de las moléculas de captura estratificadas.
17. Añadir rápidamente 1 uL de DTSSP sobre la mezcla del tubo B depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [para construir la capa de captura de ácidos nucleicos 1].
18. Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.
19. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
20. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Tercera capa

21. Añadir 10 uL de tubo C a la red estratificada.

5 22. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de DTSSP sobre la mezcla depositada y mezclar agitando suavemente hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [esta etapa permite construir brazos de espaciador más largos entre un subconjunto de moléculas de captura].

10 23. Esperar 5 minutos y a continuación añadir 1 uL de sulfo-DST al depósito y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [esta etapa permite construir brazos de espaciador más cortos entre un subconjunto de moléculas de captura y generar una 3ª capa completa, esta capa puede capturar analito de PBP2a fragmentado, más grande o completo y ácidos nucleicos fragmentados, más largos o completos].

15 24. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.

25. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

20 26. Añadir 50 uL de PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 grados Celsius hasta su uso (también se puede liofilizar y almacenar a temperatura ambiente o 4 grados hasta su uso).

TABLA 11 - Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente de captura	Enlazadores
Primera	Anticuerpos	DTSSP, DST
Segunda	Péptidos de unión a ADN	DTSSP
Tercera	Anticuerpos y péptidos de unión a ADN	DTSSP, DST

EJEMPLO 8 ENSAYO DE SEPSIS POR BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

25 Este ejemplo demuestra que la red molecular diseñada para capturar distintivos de bacterias gramnegativas puede unir niveles clínicamente relevantes de endotoxina y UFC completas en muestras de sangre no procesadas en un plazo de 15 a 30 minutos. Véase la Fig. 5.

Antecedentes

30 Este ejemplo describe una red molecular para diagnosticar septicemia en un paciente a partir de una muestra de sangre. Los pacientes sépticos pueden tener 5-1000 pg/mL LPS y 0-200 UFC/mL de bacterias en su sangre. Se prepara una red que une 1) lipopolisacárido (LPS), 2) lípido A, 3) ADN de CpG bacteriano, 4) lipoproteína acilada y 6) bacterias *Escherichia coli*.

Materiales

Agentes de captura

- 40 1) Anticuerpos contra lipopolisacárido (LPS) (solución madre = 1 µg/mL)
 2) Anticuerpos contra lípido A (solución madre = 1 µg/mL)
 3) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
 45 4) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
 5) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

Enlazadores

- 50 5) EMCS (solución madre = 25 mM)
 7) EDC (solución madre = 25 mM)
 55 8) Formaldehído (solución madre = 3,7 % v/v)

Sistema de detección

- 5 1) Anticuerpos contra lipopolisacárido conjugados a colorante
- 2) Anticuerpos contra lípido A conjugados a colorante
- 3) CCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTT conjugada a colorante (*Pseudomonas*) (SEQ ID NO: 3)
- 10 4) GGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATT conjugada a colorante (*Escherichia*) (SEQ ID NO: 33)
- 5) ACGACAGCCATGCAGCACCT conjugada a colorante (n.º de entrada de GenBank AF233451) (SEQ ID NO: 34)

Albúmina sérica bovina (BSA) (solución madre = 1 mg/mL)

15 Solución salina tamponada con fosfato pH 7,4

Tampón Tris 50 mM pH 7,5

20 Superficie de poliestireno

Procedimientos

- 25 1. Mezclar los anticuerpos contra lípido A y lipopolisacárido en una relación 1:1 en el tubo A (1 ug/mL).¹
2. Mezclar los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el Tubo B (1 mg/mL).
3. Mezclar los anticuerpos anti-PBP2a y los péptidos de unión a ADN en una relación 1:1 en el tubo C.

30 Subcapa

4. Añadir [pipetear] 5 uL de BSA sobre la superficie.
- 35 5. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de EDC a la BSA depositada, añadir 1 uL de formaldehído a la BSA añadida.
6. Mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.
- 40 7. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 h [esta etapa formará una base muy reticulada para cumplir una función estructural].
8. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
9. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

45

Primera capa

10. Añadir [pipetear] 10 uL de mezcla del tubo A la superficie para generar la 1ª capa.
- 50 11. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de DTSSP sobre la mezcla del tubo A depositada y mezclar agitando suavemente hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [para construir brazos de espaciador más largos entre un subconjunto de moléculas de captura].
12. Esperar 5 minutos y a continuación añadir 1 uL de sulfo-DST al depósito y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [para construir brazos de espaciador más cortos entre un subconjunto de moléculas de captura y generar una 2ª capa-1ª capa completas para capturar analito de PBP2a fragmentado].
- 55 13. Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.
- 60 14. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.

ES 2 808 408 T3

15. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Segunda capa

- 5 16. Añadir 5 uL del tubo B a la parte superior de las moléculas de captura estratificadas.
17. Añadir rápidamente 1 uL de DTSSP sobre la mezcla del tubo B depositada y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [para construir la capa de captura de ácidos nucleicos 1].
- 10 18. Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.
19. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
- 15 20. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.

Tercera capa

- 20 21. Añadir 10 uL de tubo C a la red estratificada.
22. Añadir inmediatamente [pipetear] 1 uL de DTSSP sobre la mezcla depositada y mezclar agitando suavemente hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [esta etapa permite construir brazos de espaciador más largos entre un subconjunto de moléculas de captura].
- 25 23. Esperar 5 minutos y a continuación añadir 1 uL de sulfo-DST al depósito y mezclar agitando suavemente la superficie hacia delante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces [esta etapa permite construir brazos de espaciador más cortos entre un subconjunto de moléculas de captura y generar una 3ª capa completa, esta capa puede capturar analito de PBP2a fragmentado, más grande o completo y ácidos nucleicos fragmentados, más largos o completos].
- 30 24. Extinguir añadiendo [pipeteando] 10 uL de tampón Tris 50 mM, dejar reposar durante 10 min.
25. Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 uL de PBS con pipeta.
- 35 26. Añadir 50 uL de PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 grados Celsius hasta su uso (también se puede liofilizar y almacenar a temperatura ambiente o 4 grados hasta su uso).

Los procedimientos de ensayo fueron los siguientes:

- 40 1. Se construyeron réplicas de redes estratificadas según los procedimientos anteriores y se bloquearon en 20 % de BSA en PBS durante 30 minutos.
2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.
- 45 3. Las muestras de sangre completa humana se enriquecieron con *E. coli* o LPS purificado.
4. Las muestras se incubaron a continuación con 50 uL de una dilución 1:46 del sistema de detección marcado colorante con cada red durante 30 minutos.
- 50 5. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,5 % de Tween-20, 0,75 % de albúmina y 0,5 % de caseína (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.
6. Los pocillos se midieron mediante un lector de placas.

55 **TABLA 12** - Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente de captura	Enlazadores
Primera	Anticuerpos	DTSSP, DST
Segunda	Péptidos de unión a ADN	DTSSP
Tercera	Anticuerpos y péptidos de unión a ADN	DTSSP, DST

EJEMPLO 9:CRIBADO DE REDES MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN MEJORADA DE ANALITOS DE UNA INFECCIÓN BACTERIANA O VÍRICA

5 Se cribaron 30 candidatos de redes por triplicado en pocillos de poliestireno. En cada caso, los agentes de captura eran anticuerpos contra la membrana exterior de bacterias gramnegativas (lipopolisacárido y lípido A) y péptidos de unión a ADN bacteriano, siendo las variables (i) la combinación del uno o más agentes de reticulación química y (ii) el número de capas de las redes. Como referencia (en lo sucesivo denominado "ELISA"), la mezcla del agente de captura
10 sin agentes de reticulación se adsorbió al sustrato y los analitos se unieron y detectaron.

Se prepararon redes que unían:

- 15 1) interferón- α humano
2) interferón- β humano

Se prepararon redes que unían:

- 20 1) peptidoglucano bacteriano
2) lipopolisacárido bacteriano

Materiales

25 Agentes de captura para redes para infecciones víricas

- 1) Anticuerpos anti interferón humano (solución madre = 1 mg/mL)
30 2) Anticuerpos anti interferón humano (solución madre = 1 mg/mL)

Agentes de captura para redes para infecciones bacterianas

- 35 1) Anticuerpos antilipopolisacárido (solución madre = 1 mg/mL)
2) Anticuerpos antipeptidoglucano (solución madre = 1 mg/mL)

Enlazadores

- 40 1) Formaldehído (solución madre = 16 % p/v)
2) EGS (solución madre = 25 mM en DMSO)
3) EMCS (solución madre = 25 mM en DMSO)

Muestras

- 45 1) Sangre completa infectada con virus tratada con EDTA de donante femenina 1
50 2) Sangre completa infectada con virus tratada con DTA de donante femenina 2
3) Sangre completa tratada con EDTA de donante masculino sano 1
4) Sangre completa tratada con EDTA de donante masculino sano 2
55 5) UFC de colonias bacterianas aisladas sobre una placa veteada (fuente = muestra humana)

Agentes de detección biotinilados para redes para infecciones víricas

- 60 1) Anticuerpos anti interferón- α humano
2) Anticuerpos anti interferón- β humano

Agentes de detección biotinilados para redes para infecciones bacterianas

- 5 1) Anticuerpos antilipopolisacárido
2) Anticuerpos antiptidoglucano

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

10 Tween-20

Tampón Tris 50 mM pH 7,5

Albúmina de huevo

15 Leche desnatada

Procedimientos

20 Preparación de moléculas de detección

1. Para la reconstitución con biotina, la biotina se equilibró a temperatura ambiente y a continuación se resuspendió en 0,246 mL de DMSO para proporcionar una concentración final de biotina de 83 mM.
- 25 2. Se combinaron 50 µL de cada tipo de anticuerpos en un único tubo (uno para víricos y otro para bacterianos) y se llevaron a temperatura ambiente antes de la adición de 8 uL de biotina para alcanzar una concentración final de 6,8 mM de biotina/tubo.
- 30 3. Cada reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos hasta que se completó la reacción.
4. Las moléculas de detección agrupadas se dializaron durante la noche en PBS a 4 °C.
5. Almacenamiento a largo plazo en PBS a -20 °C.
- 35

Procedimiento para el revestimiento de ELISA

1. Las moléculas de detección se agruparon en una relación 1:1 de agentes de captura para las redes víricas.
- 40 2. Las moléculas de detección se agruparon en una relación 1:1 de agentes de captura para las redes bacterianas.
3. El ELISA se revistió añadiendo 10 uL de componentes de captura vírica o bacteriana (aproximadamente 10 ug de componentes de captura/pocillo) en pocillos de una placa de poliestireno durante la noche a 4 °C.
- 45 4. Al día siguiente, se retiraron las placas de poliestireno de 4 °C, se permitió que alcanzaran la temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con el formato de ELISA para retirar las moléculas de captura vírica y bacteriana no absorbidas.

Procedimiento de construcción de la red

- 50 1. A los pocillos en los que se iban a construir redes bacterianas y víricas, se añadieron 10 uL de componentes de captura vírica o bacteriana + 1 uL de cada reticulante a los pocillos correspondientes.
- 55 2. Se mezcló brevemente con una placa agitadora.
3. Se dejó reposar durante 1 hora.
4. Se retiraron las moléculas de captura no unidas, se lavaron con PBS.
- 60 5. Se repitieron las etapas 3 a 6 para las capas adicionales.
6. Se bloquearon las redes en leche 100 % desnatada durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Procedimiento de ensayo

- 5 1. Las redes mono-, bi-, tri- y cuatricula se construyeron por triplicado según los procedimientos anteriores.
2. Muestras de sangre completa tratadas con EDTA (para la red vírica: sangre tomada de un individuo infectado con virus diluida 1:1000 en PBS; para la red bacteriana: una colonia bacteriana diluida 1:1500 en PBS y a continuación diluida 1:5 en sangre completa) y añadidas a cada red a 10 µL/pocillo.
- 10 3. A las muestras, se añadieron moléculas de detección biotiniladas a 5 L/pocillo.
4. Las muestras y las moléculas de detección se incubaron con cada red durante 15 minutos (o 60 minutos para ELISA).
- 15 5. Los pocillos se lavaron con 0,3 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina de huevo (tampón de lavado).
6. Para la etapa de detección, se usaron anticuerpos de cabra antibiotina conjugados a partículas de oro coloidal (20 nm) en una dilución 1:1000 en leche desnatada y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (10 L/pocillo).
- 20 7. Los pocillos se lavaron con 0,3 mL de tampón de lavado por pocillo.
8. Se midió absorbancia de cada pocillo mediante un lector de placas.
- 25 El número y la composición de las capas son 1, 2, 3 y 4 capas compuestas por formaldehído (F), y/o EMCS, y/o EGS, solos o en combinación (**TABLA 13**).

TABLA 13 - Contenido de la red molecular en el experimento de cribado

30

Capa	Agente de captura	Enlazadores
Primera	Anticuerpos	EGS, EMCS, EGS+EMCS, EGS+F o EMCS+F
Segunda	Anticuerpos	EGS, EMCS, EGS+EMCS, EGS+F o EMCS+F
Tercera	Anticuerpos	EGS, EMCS, EGS+EMCS, EGS+F o EMCS+F
Cuarta	Anticuerpos	EGS, EMCS, EGS+EMCS, EGS+F o EMCS+F

EJEMPLO 10: DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS Y ANALITOS DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS EN SANGRE HUMANA

- 35 La sangre completa tratada con EDTA se incorporó a las concentraciones encontradas en sangre del paciente con sepsis clínica (enriquecida con una mezcla de lo siguiente: lipoproteína acilada - 30 pg/mL; LPS - 3 pg/mL; ADN de *E. coli* - 0,06 pmol; *E. coli* - 40 UFC/mL y *Candida albicans* (control de levadura) - 40 células/mL). Se incubaron 50 uL de muestra enriquecida en redes moleculares por triplicado con 5 uL del sistema de detección colorimétrico de gramnegativas y se incubaron durante 15 minutos. Para los pocillos de ELISA, se incubaron 50 uL de la muestra de
- 40 sangre idéntica durante 60 minutos antes de la adición de 5 uL del sistema de detección (el mismo que el usado con las redes moleculares) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con 300 uL de tampón de lavado y las placas se cuantificaron leyendo la absorbancia a 510 en un lector de placas.

Las redes moleculares se prepararon para inmovilizar los analitos siguientes asociados a infecciones bacterianas gramnegativas:

45

- lipopolisacárido
 - lípido A-lipoproteína acilada
 - ADN bacteriano de CpG
- 50

- UFC bacterianas gramnegativas

Composición y fabricación de la red

5 Agentes de captura:

- 1) Anticuerpos contra lipopolisacárido (solución madre = 1 ug/mL)
- 10 2) Anticuerpos contra lípido A (solución madre = 1 ug/mL)
- 3) Anticuerpos contra peptidoglucano (solución madre = 1 ug/mL)
- 3) Péptido de unión a ADN 1 (VLF GKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 15 4) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 5) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

Los enlazadores son:

- 20 1) BS(PEG)₉ (solución madre = 7,9 mM en DMSO)
- 2) EGS (solución madre = 2,5 mM en DMSO)
- 25 3) EMCS (solución madre = 1,4 mM en DMSO)
- 4) Formaldehído (solución madre = 3,7 % v/v en ddH₂O)

Moléculas que se van a detectar mediante el sistema de detección de gramnegativas

- 30 1) UFC bacterianas gramnegativas
- 2) Membrana exterior de gramnegativas
- 35 3) Lipopolisacárido
- 4) Lípido A
- 5) Lipopéptido acilado
- 40 6) ADNr de 16s de CpG de gramnegativas

Moléculas en el sistema de detección de gramnegativas

- 45 1) anticuerpos policlonales contra lípido A (solución madre = 1 mg/mL)
- 2) anticuerpos policlonales contra lipopolisacárido (solución madre = 1 mg/mL)
- 50 3) sonda bacteriana gramnegativa 5'-biotina-ACGACAGCCATGCAGCACCT (solución madre = 500 pmol)

Colorantes

- 1) Concentrado de colorante "Super Black"
- 55 2) Concentrado de colorante "Royale Blue"

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Tween-20

- 60 Tampón Tris 50 mM pH 7,5

Avidina (de clara de huevo)

Leche desnatada

5 Superficie de poliestireno

Procedimientos

Marcado colorimétrico de sistemas de detección

10

1) Se generó una mezcla de lo siguiente y se denominó "azul-negro1": 1 parte de azul, 2 partes de negro.

15

2) Para las sondas de ADN biotiniladas: se incubaron 100 pmol por sonda con 50 µL de 100 % clara de huevo (fuente de avidina) en solución salina tamponada con fosfato hasta un volumen total de 100 µL; la reacción de unión tuvo lugar durante la noche a 4 °C.

20

3) Se añadieron sondas de ADN unidas a avidina a los tubos correspondientes que contenían 100 µL de colorante y 50 L de anticuerpos por tubo.

4) Se incubó con colorante durante 48 horas a 4 °C.

5) Se añadió 3,7 % (p/v) de formaldehído final para conjugar los colorantes adsorbidos, se incubó a TA o 1 h.

25

6) Se dializó en 50x el volumen de solución salina tamponada con fosfato durante la noche a 4 °C.

7) Al día siguiente, se sustituyó la solución salina tamponada con fosfato con tampón de solución salina fresco, se incubó durante la noche a 4 °C.

30

8) Al día siguiente, se sustituyó la solución salina tamponada con fosfato con tampón de solución salina fresco, se incubó durante la noche a 4 °C.

9) Se retiró del casete de diálisis y se evaluó la unión usando ensayos de redes.

Procedimiento para el revestimiento de ELISA

35

1. Se agruparon las moléculas de detección en una relación 1:1 volumen a volumen de agentes de captura para las redes bacterianas.

40

2. Se revistió el ELISA añadiendo 10 uL de componentes de captura bacteriana (aproximadamente 10 ug de componentes de captura/pocillo) en pocillos de una placa de poliestireno durante la noche a 4 °C.

45

3. Al día siguiente, se retiraron las placas de poliestireno de 4 °C, se permitió que alcanzaran la temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con formato de ELISA para retirar las moléculas de captura vírica y bacteriana no absorbidas.

Procedimiento de construcción de la red

Subcapa

50

32) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie.

33) Añadir inmediatamente [pipetear] 5 µL de formaldehído sobre las moléculas de captura depositadas y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

55

34) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Primera capa

60

35) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 1ª capa.

36) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás

una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

37) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

5 Segunda capa

38) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 2ª capa.

10 39) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

40) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

15 Tercera capa

41) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 3ª capa.

20 42) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

43) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

25 44) Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 µL de PBS con pipeta.

45) Bloquear las redes con 100 µL de una relación 1:1 de clara de huevo y leche 100 % desnatada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

30 Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron redes tricapa por triplicado según los procedimientos anteriores.

35 2. Las muestras de sangre completa tratadas con EDTA se enriquecieron con una mezcla de lo siguiente: lipoproteína acilada - 30 pg/mL; LPS - 3 pg/mL; ADN de *E. coli* - 0,06 pMol; *E. coli* - 40 UFC/mL y *Candida albicans* (control de levadura) - 40 células/mL y se añadieron a 50 µL por pocillo.

3. A las muestras, se añadieron moléculas de detección a 5 µL/pocillo.

40 4. Las muestras y las moléculas de detección se incubaron con cada red durante 15 minutos (o 60 minutos para ELISA).

45 5. Los pocillos se lavaron con 0,3 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina de huevo (tampón de lavado).

6. Se midió la absorbancia de cada pocillo mediante un lector de placas.

Número y composición de la red de captura bacteriana compuesta por formaldehído, BS(PEG)₉, EGS y EMCS (TABLA 14).

50

TABLA 14 - Contenido de la red molecular en el experimento de cribado

Capa	Agente de captura	Enlazadores
Subcapa	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	Formaldehído
Primera	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉
Segunda	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉
Tercera	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉

Los resultados se muestran en la **figura 6**. Los datos de la **figura 6** demuestran que se pueden inmovilizar múltiples
55 analitos, que tienen cada uno una pluralidad de propiedades químicas superficiales, sobre la misma red en un plazo

de 15 minutos en una muestra de sangre compleja. Además, los datos demuestran la especificidad de la red molecular construida para capturar analitos de gramnegativas, ya que los analitos de levadura no se unieron. La realización de pruebas convencionales examina la presencia de UFC en la sangre mediante cultivo o la presencia de endotoxina en la sangre mediante el ensayo de lisado de límulo. La importancia de la presente invención es la reducción del tiempo de respuesta (15 minutos) y el alcance de los diferentes analitos que se pueden analizar en una única muestra (células enteras, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos que son característicos de bacterias gramnegativas).

EJEMPLO 11: DETECCIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS GRAMNEGATIVAS Y GRAMPOSITIVAS EN SANGRE

10 Se incorporaron células de *Listeria monocytogenes* (grampositiva) y células de *E. coli* (gramnegativas) a 20 UFC/mL en sangre completa de un donante humano. Se incluyeron células fúngicas (20 células/mL) como control negativo.

Las redes moleculares se prepararon para inmovilizar los analitos siguientes asociados a infecciones bacterianas gramnegativas:

- 15 - lipopolisacárido
- lípido A
- 20 - lipoproteína acilada
- ADN bacteriano de CpG
- UFC bacterianas gramnegativas
- 25 - UFC bacterianas grampositivas
- Peptidoglucano

30 Composición y fabricación de las redes

Agentes de captura:

- 35 1) Anticuerpos contra lipopolisacárido (solución madre = 1 ug/mL)
- 2) Anticuerpos contra lípido A (solución madre = 1 ug/mL)
- 3) Anticuerpos contra peptidoglucano (solución madre = 1 ug/mL)
- 40 4) Péptido de unión a ADN 1 (VLF GKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 5) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 6) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)

45 Los enlazadores son:

- 1) BS(PEG)₉ (solución madre = 7,9 mM en DMSO)
- 50 2) EGS (solución madre = 2,5 mM en DMSO)
- 3) EMCS (solución madre = 1,4 mM en DMSO)
- 4) formaldehído (solución madre = 3,7 % v/v en ddH₂O)

Moléculas que se van a detectar mediante el sistema de detección de gramnegativas

- 7) UFC bacterianas gramnegativas
- 60 8) Membrana exterior de gramnegativas
- 9) Lipopolisacárido

10) Lípido A

11) Lipopéptido acilado

5

12) ADNr de 16s de CpG de gramnegativas

Moléculas que se van a detectar mediante el sistema de detección de grampositivas

10 13) Peptidoglucano

14) ADNr de 16s de CpG de grampositivas

Moléculas en el sistema de detección de gramnegativas

15

1) anticuerpos policlonales contra lípido A (solución madre = 1 mg/mL)

2) anticuerpos policlonales contra lipopolisacárido (solución madre = 1 mg/mL)

20 3) Sonda bacteriana gramnegativa 5'-biotina-ACGACAGCCATGCAGCACCT (solución madre = 500 pmol)

Moléculas en el sistema de detección de grampositivas

1) Anticuerpos contra peptidoglucano (solución madre = 1 mg/mL)

25

2) Sonda bacteriana grampositiva 5'-biotina-ACGACAACCATGCACCACCTG (solución madre = 100 pmol)

Colorantes

30 3) Concentrado de colorante "Super Black"

4) Concentrado de colorante "Royale Blue"

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

35

Tween-20

Tampón Tris 50 mM pH 7,5

40 Avidina (de clara de huevo)

Leche desnatada

Superficie de poliestireno

45

Procedimientos

Marcado colorimétrico de sistemas de detección

50 10) Se generó una mezcla de lo siguiente y se denominó "azul-negro1": 1 parte de azul, 2 partes de negro para el sistema de detección de gramnegativas.

11) Se generó una mezcla de lo siguiente y se denominó "negro": 1 parte de negro para el sistema de detección de grampositivas.

55

12) Para las sondas de ADN biotinilado: se incubaron 100 pmol por sonda con 50 µL de 100 % clara de huevo (fuente de avidina) en solución salina tamponada con fosfato hasta un volumen total de 100 µL; la reacción de unión tuvo lugar durante la noche a 4 °C.

60 13) Se añadieron sondas de ADN unido a avidina a los tubos correspondientes que contenían 100 µL de colorante y 50 L de anticuerpos por tubo.

14) Se incubó con colorante durante 48 horas a 4 °C.

15) Se añadió 3,7 % (p/v) de formaldehído final para conjugar los colorantes adsorbidos, se incubó a TA o 1 h.

5 16) Se dializó en 50x el volumen de solución salina tamponada con fosfato durante la noche a 4 °C.

17) Al día siguiente, se sustituyó la solución salina tamponada con fosfato con tampón de solución salina fresco, se incubó durante la noche a 4 °C.

10 18) Al día siguiente, se sustituyó la solución salina tamponada con fosfato con tampón de solución salina fresco, se incubó durante la noche a 4 °C.

19) Se retiró del casete de diálisis y se evaluó la unión usando ensayos de redes.

15 Procedimiento para el revestimiento de ELISA

1. Se agruparon las moléculas de detección en una relación 1:1 volumen a volumen de agentes de captura para las redes bacterianas.

20 2. Se revistió el ELISA añadiendo 10 uL de componentes de captura bacteriana (aproximadamente 10 ug de componentes de captura/pocillo) en pocillos de una placa de poliestireno durante la noche a 4 °C.

25 3. Al día siguiente, se retiraron las placas de poliestireno de 4 °C, se permitió que alcanzaran la temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con formato de ELISA para retirar las moléculas de captura vírica y bacteriana no absorbidas.

Procedimiento de construcción de la red

Subcapa

30 46) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie.

47) Añadir inmediatamente [pipetear] 5 µL de formaldehído sobre las moléculas de captura depositadas y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

35 48) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Primera capa

40 49) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 1ª capa.

50) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

45 51) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Segunda capa

50 52) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 2ª capa.

53) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

55 54) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

Tercera capa

60 55) Añadir [pipetear] 10 µL de mezcla de captura a la superficie para generar la 3ª capa.

56) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 µL de EGS, a continuación 4 µL de EMCS y a continuación 2 uL de

BS(PEG)₉ sobre la mezcla de captura y mezclar agitando suavemente la superficie hacia adelante y hacia atrás una distancia de 5 cm de 5 a 10 veces.

57) Dejar reposar durante 1 h a temperatura ambiente.

58) Retirar el líquido restante con pipeta, lavar 3 veces con 50 µL de PBS con pipeta.

59) Bloquear las redes con 100 µL de una relación 1:1 de clara de huevo y leche 100 % desnatada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Número y composición de la red de captura bacteriana compuesta por formaldehído, BS(PEG)₉, EGS y EMCS (TABLA 15).

TABLA 15 - Contenido de la red molecular en el experimento de cribado

Capa	Agente de captura	Enlazadores
Subcapa	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	Formaldehído
Primera	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉
Segunda	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉
Tercera	Anticuerpos y moléculas de captura de ADN	EGS, EMCS, BS(PEG) ₉

Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron redes tricapa por triplicado según los procedimientos anteriores.

2. Las muestras de sangre completa tratadas con EDTA se enriquecieron con una mezcla de lo siguiente: *Listeria monocytogenes* - 40 UFC/mL, *Eschericia coli* - 40 UFC/mL y *Candida albicans* (control de levadura) - 40 células/mL y se añadieron a 50 µL por pocillo.

3. A las muestras, se añadieron moléculas de detección a 5 µL/pocillo.

4. Las muestras y las moléculas de detección se incubaron con cada red durante 15 minutos (o 60 minutos para ELISA).

5. Los pocillos se lavaron con 0,3 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,05 % de Tween-20 y 10 % de albúmina de huevo (tampón de lavado).

6. Se midió la absorbancia de cada pocillo mediante un lector de placas.

Los resultados se muestran en la **figura 7**. Los datos demuestran la capacidad de una aplicación de la invención para producir una señal visible cuando los analitos inmovilizados en la red eran detectados por el sistema de detección cromogénica. Además, los datos demuestran que una red construida para capturar analitos que son muy abundantes en las bacterias puede producir una señal visible cuando se incubaba en presencia de sistemas de detección cromogénica que detectan bacterias gramnegativas o bacterias grampositivas. Por último, las redes moleculares y los sistemas de detección de gramnegativas y grampositivas demuestran su especificidad, ya que no reconocen los analitos de levadura.

EJEMPLO 12: PROCEDIMIENTOS PARA GENERAR ENLACES AMPLIADOS

Se pueden usar enlazadores ampliados para fabricar una capa especialmente porosa. Se pueden fabricar/adquirir moléculas de extensión que contienen una o más de una clase de los siguientes: aminas libres, hidroxilos, carboxilos o sulfhidrilos. Ejemplos de moléculas de extensión:

- PROTEÍNA: poli-arginina (5 a 50 aminoácidos enlazados en una cadena polipeptídica)
- PROTEÍNA: poli-lisina (5 a 50 aminoácidos enlazados en una cadena polipeptídica)

- CARBOHIDRATO: celulosa • CARBOHIDRATO: amilosa
- CARBOHIDRATO: xilano

5 • ÁCIDO NUCLEICO: ADN de esperma de salmón

Procedimientos:

1. Una población homogénea de una molécula de extensión se puede mezclar con una población homogénea de reticulante heterobifuncional, de tal manera que solo un extremo funcional de cada molécula de reticulante está unido a una molécula de extensión para dar lugar a la construcción siguiente: Ejemplo: EMCH-{Amilosa}-EMCH
2. La reacción de extensión del enlace se puede extinguir con Tris 50 mM pH 7,5
3. Los enlaces extendidos se pueden separar de los monómeros no enlazados mediante cromatografía de exclusión por tamaños y mediante diálisis.
4. Los enlaces extendidos se pueden mezclar con moléculas de captura para generar una capa en una red molecular. Ejemplo: molécula de captura que contiene sulfhidrilo-EMCH-amilosa-EMCH-molécula de captura que contiene sulfhidrilo.

EJEMPLO 14: LOS ACONTECIMIENTOS DE UNIÓN POSITIVA SE PUEDEN MONITORIZAR MEDIANTE UN CAMBIO EN LA INTENSIDAD FLUORESCENTE (IF) DE UNA RED

25 Este ejemplo demuestra que las redes moleculares se pueden usar para detectar SARM directamente en un formato de ensayo que no es de tipo sándwich. En este ejemplo, las propiedades de la red están predeterminadas, la muestra se incuba con la red y se mide el cambio en las propiedades de la red.

30 **Tabla 17:** Uso de algunos componentes del sistema de detección de SARM como componentes de captura en una red para la detección directa de SARM en una muestra

Agente de captura	Modificación	Proveedor	Cant. de solución madre usada (ug para los Ab y pMol para las sondas)
mAb contra SARM, clon 332/423	Biotina	AbD Serotec	1
mAb contra SARM, clon 198	Biotina	AbCam	1
mAb contra SARM, clon AC10	Biotina	AbCam	1
ACACCATTTTATATTGAGCATCTACT	Biotina	IDT	1
ACACCATTTTACCACGTTCTGATTTT	Biotina	IDT	1
ACACCATTCCACATTGTTT	Biotina	IDT	1
ACACCAGTCATTTCTACTTCACCATTA	Biotina	IDT	1
ACACCATGTTATGTTTTTAAGAAGC	Biotina	IDT	1
ACACCAGATAAATCTTTAAGTACAAG	Biotina	IDT	1

35 Las redes se construyeron como se indica a continuación: se mezcló 1 ug/mL de cada anticuerpo biotinilado y 1 pMol de cada sonda biotinilada. Los componentes de captura biotinilados se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C con avidina-fluoróforo (Invitrogen) en una relación 1:3 y sirvieron como componentes de captura para la red. Las subcapas (2 uL cada una) se construyeron usando una mezcla 1:1 de 10 % (p/v) de albúmina y 37 % (p/v) de formaldehído y se curaron durante 15 minutos. Se construyeron redes tricapa (2,5 uL por capa) con componentes de captura marcados con fluoróforo y solución madre de trabajo de enlazador que contenía BS³(363 nM), BMPH (27,5 nM), EMCS (750 nM) y EGS (150 nM) en una relación 2:0,5 de captura a enlazador.

40 Se midió la fluorescencia de las redes para 48 redes antes del bloqueo en 0,5 % de BSA. Las redes se lavaron e incubaron con *S. aureus* resistente a la metilicina (SARM) o *S. aureus* sensible a la metilicina (SASM como control) durante 30 minutos. Las redes se lavaron con 2,5 % de albúmina + 0,005 % de Tween y enjuagaron con PBS antes de la lectura.

45

Véase la **figura 18** para conocer los resultados. Los datos representan 48 redes de *S. aureus* marcadas con rodamina. Los datos de estos estudios y los estudios de especificidad de unión de la red (véase el Ejemplo 22) demuestran que las redes moleculares se pueden usar para la detección directa de analitos específicos en muestras complejas. Las redes moleculares se pueden construir para que posean propiedades mensurables tales como fluorescencia, luminiscencia, absorbancia, magnetismo, frecuencia vibratoria, etc., que se pueden predeterminar. La unión de uno o más analitos a una red molecular cambia el valor de la propiedad medida y puede indicar un acontecimiento de unión positiva. En este ejemplo, las capas 1-3 de las redes moleculares contenían fluorescencia que se redujo mediante la unión directa de analito. En otros ejemplos, las redes pueden contener subcapas o capas individuales con la señal mensurable. La realización de pruebas de detección directa minimiza la manipulación de los reactivos y el error del usuario. Algunas plataformas son capaces de realizar estudios de unión directa y deben basarse en la amplificación de una señal para indicar la unión (p. ej., ELISA). La red molecular se puede diseñar para que contenga el número apropiado de moléculas generadoras de señal orientadas de manera significativa dentro de la red para facilitar la sensibilidad y producir una reducción mensurable de la señal cuando se une un analito.

15 EJEMPLO 15: LOS CAMBIOS EN LA INTENSIDAD FLUORESCENTE DE LAS REDES SE PUEDEN MONITORIZAR PARA INDICAR UN ACONTECIMIENTO DE UNIÓN ESPECÍFICA

Este ejemplo demuestra que las redes moleculares se pueden usar para detectar SARM directamente en un formato de ensayo que no es de tipo sándwich. En este ejemplo, las propiedades de la red están predeterminadas, la muestra se incuba con la red y se mide el cambio en las propiedades de la red. Las redes se construyeron con BS3, BMPH, EMCS y EGS como enlazadores y con anticuerpos fluorescentes contra *S. aureus* y sondas de unión a ADN contra *nuc* como componentes de captura.

Tabla 18: Uso de componentes del sistema de detección de *S. aureus* como componentes de captura en una red para la detección directa de *S. aureus* en una muestra

Agente de captura	Modificación	Proveedor
mAb contra <i>S. aureus</i> , IgM	Biotina	Millipore
mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13	Biotina	AbD Serotec
mAb contra <i>S. aureus</i> , clon 704	Biotina	AbCam
mAb contra <i>S. aureus</i>	Biotina	AbCam
ACACCACATTGGTTGACCTTTGRACATTAA	Biotina	IDT
ACACCAGATGGAAAAATGGTAAACGAAG	Biotina	IDT

Se midió la fluorescencia de las redes para 11 redes antes de la incubación con 20 UFC de *S. aureus* o *S. epidermidis* (como control) resistentes a la meticilina y después del ensayo (después de la incubación con analito, las redes se lavaron y leyeron).

Véase la **figura 19** para conocer los resultados. Los datos representan la fluorescencia de las redes de *S. aureus* marcadas con rodamina antes y después de la incubación con analito (redes de *S. aureus* 1-10 y control de *S. epidermidis*). Los datos de este ejemplo demuestran que las redes se pueden construir para unir selectivamente una única especie de una muestra compleja y que la red puede diferenciar entre 2 especies del mismo género.

EJEMPLO 16: LA UNIÓN POSITIVA DE ANALITOS A REDES PUEDE INDUCIR LA ALTERACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS REDES

Este ejemplo demuestra que las redes moleculares se pueden usar para detectar SARM directamente en un formato de ensayo que no es de tipo sándwich. En este ejemplo, las propiedades de la red están predeterminadas, la muestra se incuba con la red y se mide el cambio en las propiedades de la red. Las redes se construyeron con BS3, BMPH, EMCS y EGS como enlazadores y con anticuerpos contra *S. aureus* y péptidos de unión a ADN marcados fluorescentemente como componentes de captura. Este experimento se realizó en las mismas condiciones que el Ejemplo 15.

Véase la **figura 20** para conocer los resultados. La alteración específica de los analitos de las propiedades fluorescentes o el “enmascaramiento” de la red se puede determinar midiendo la intensidad de fluorescencia absoluta de la red molecular antes y después de la incubación con muestra. Los resultados muestran que el “enmascaramiento” puede ser un modo de determinar acontecimientos de unión de analitos, ya que la fluorescencia de la red es enmascarada por los analitos inmovilizados.

EJEMPLO 17: FORMATO DE REALIZACIÓN DE PRUEBAS EFECTIVAS USANDO REDES MOLECULARES PARA UNIR ANALITOS ESPECÍFICOS DE *S. AUREUS*

Este ejemplo demuestra que se puede detectar SARM usando una red molecular que tiene componentes de captura que enriquecen, aíslan, unen o inmovilizan un primer conjunto de analitos de interés (es decir, *S. aureus* y resistencia a la meticilina), y a continuación usando moléculas de detección contra un segundo conjunto de analitos que es un subconjunto limitado del primer conjunto de analitos (es decir, resistencia a la meticilina) en un formato de ensayo de tipo sándwich.

10 Las redes se construyeron con una subcapa de avidina y dos capas de anticuerpos contra PBP2a y específicos de *S. aureus* y 4 especies de péptidos de unión a ADN como componentes de captura, entrelazados con BS3, BMPH, EMCS y EGS.

Agentes de captura

- | | | |
|----|---|----------------------------|
| 15 | 1) Albúmina | (solución madre = 10 %) |
| | 2) Anticuerpos contra PBP2a (clones AC10, 332/423, 198) | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 20 | 3) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 4) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 5) Péptido de unión a ADN 7 (RRRRRRRRRRRR) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| 25 | 6) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 7) pAb contra <i>S. aureus</i> | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 30 | 8) mAb contra <i>S. aureus</i> , IgM | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 9) mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13 | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 10) mAb contra <i>S. aureus</i> , clon 704 | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 35 | 11) pAb contra proteína A | (solución madre = 1 µg/mL) |

Enlazadores

- | | | |
|----|--------------------|--------------------------------|
| 40 | 1) BMPH | (solución madre = 285 nM) |
| | 2) EGS | (solución madre = 5,9-6,03 µM) |
| | 3) EMCS | (solución madre = 0,03 mM) |
| 45 | 4) BS ³ | (solución madre = 14,4 µM) |
| | 5) Formaldehído | (solución madre = 37 % p/v) |

50 **Tabla 19: reactivos de detección de SARM (ug/mL para los anticuerpos y pM para las sondas):**

Agente de captura	Modificación	Proveedor	Cant. de solución madre usada (ug para los Ab y pMol para las sondas)
mAb contra SARM, clon 332/423	Biotina	AbD Serotec	1
mAb contra SARM, clon 198	Biotina	AbCam	1
mAb contra SARM, clon AC10	Biotina	AbCam	1
ACACCATTTTATATTGAGCATCTACT	Biotina	IDT	1
ACACCATTTTACCACGTTCTGATTTT	Biotina	IDT	1

ES 2 808 408 T3

Agente de captura	Modificación	Proveedor	Cant. de solución madre usada (ug para los Ab y pMol para las sondas)
ACACCATTCCACATTGTTT	Biotina	IDT	1
ACACCAGTCATTTCTACTTCACCATTA	Biotina	IDT	1
ACACCATGTTATGTTTTTAAGAAGC	Biotina	IDT	1
ACACCAGATAAATCTTTAAGTACAAG	Biotina	IDT	1
Fragmento Fc de IgG humana*	ninguna	Millipore	4,3

*El fragmento Fc de IgG humana no es una parte activa del sistema de detección de SARM, sino que une y ocluye proteína A de *S. aureus* para minimizar la detección de falsos positivos de *S. aureus*. sensible a la meticilina.

5 Subcapa

- 1) Premezclar un lote de subcapa: relación 1:1 de albúmina y formaldehído.
- 2) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 o 2 µL de mezcla de subcapa sobre una superficie.
- 3) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Primera capa

- 4) Diluir solución madre de enlazador a 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4, usar solo ese día.
- 5) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar los materiales de la 1ª capa.
- 6) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la primera capa de captura sobre la parte superior de la subcapa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la primera capa de captura sobre la subcapa remanente).
- 7) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Segunda capa

- 8) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 2ª capa.
- 9) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la segunda capa de captura sobre la parte superior de la 1ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la segunda capa de captura sobre la 1ª capa remanente).
- 10) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Tercera capa

- 11) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 3ª capa.
- 12) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la tercera capa de captura sobre la parte superior de la 2ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la tercera capa de captura sobre la 2ª capa remanente).
- 13) Dejar curar durante 15 minutos a 2 horas a temperatura ambiente para desactivar los enlazadores.
- 14) Dejar que se absorba a la superficie almacenando durante la noche a 4 °C.
- 15) Bloquear las redes con 200 µL de 0,5 % de BSA en PBS pH 7,4 durante 12 horas a 4 °C o durante 2 horas a 37 °C.

Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron redes tricapa por triplicado según los procedimientos anteriores.
2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.
3. A las muestras, se añadieron moléculas de detección a 10 µL/pocillo (las moléculas de detección también se pueden añadir directamente a las redes antes de la adición de muestra, esto también funciona bien).
4. Las muestras y las moléculas de detección se incubaron con cada red durante 30 minutos.
5. Los pocillos se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.
6. Se midió la absorbancia de cada pocillo mediante un lector de placas.

Las redes se bloquearon e incubaron en presencia de solución salina (control de ensayo) o muestras de solución salina que contenían poblaciones microbianas mixtas de exudados nasales de pacientes (positivos para SARM y negativos para SARM) y agentes de detección de SARM conjugados a FITC (una combinación de anticuerpos contra PBP2a y sondas de ADN de SCCmec) (véase la **tabla 17** para conocer la composición de la red) durante 30 minutos. Se lavaron las redes y se leyeron mediante fluorómetro a A520.

Véase la **figura 21** para conocer los resultados. Los datos representan la intensidad fluorescente producida a partir de redes de 7 o 14 µL incubadas con muestras de exudado positivas para SARM. Las barras de error representan el EEM.

Los datos demuestran el uso de una red molecular para inmovilizar y facilitar la detección de SARM en un plazo de 30 minutos en una muestra compleja sin la necesidad de preparación de la muestra.

EJEMPLO 18: LAS REDES MÁS PEQUEÑAS PRODUCEN SEÑALES MÁS ALTAS

Se construyeron redes, que sumaban 7 o 14 uL de volumen total, con una subcapa de avidina y dos capas de anticuerpos contra PBP2a y analitos específicos de *S. aureus* y 3 especies de péptidos de unión a ADN (véase la **Tabla 17** para conocer la composición de la red) como agentes de captura, entrelazados con BS3, BMPH, EMCH y EGS.

Las redes se bloquearon e incubaron en presencia de muestras que contenían poblaciones microbianas mixtas de exudados nasales de pacientes (positivos para SARM y negativos para SARM) y agentes de detección de SARM conjugados a FITC (véase la **tabla 17** para conocer la composición de la red) durante 30 minutos. Se lavaron las redes y se leyeron mediante fluorómetro a A520.

Véase la **figura 22** para conocer los resultados. Los datos representan la señal fluorescente por encima del ruido de fondo (ruido de fondo = 2 desviaciones estándar por encima de la intensidad fluorescente promedio para 25 exudados negativos para SARM) producida a partir de redes de 7 o 14 uL incubadas con muestras de exudado positivas para SARM. Las barras de error representan el EEM. Los datos demuestran que las redes más pequeñas producen una señal más fuerte y menos ruido que las redes más grandes. El objetivo de la mayoría de los diagnósticos moleculares es aumentar la señal y reducir el ruido. La red molecular permite conseguir una señal más alta y un ruido más bajo en comparación con los inmunoensayos 2D convencionales. La reducción del diámetro de las redes aumenta adicionalmente la señal y reduce el ruido. Además, el aumento de las capas de las redes moleculares también aumenta la señal.

EJEMPLO 19: LAS REDES MÁS PEQUEÑAS PRODUCEN MENOS RUIDO (UNIÓN INESPECÍFICA)

Se construyeron redes, que sumaban 7 o 14 uL de volumen total, con una subcapa de avidina y dos capas de anticuerpos contra PBP2a y analitos específicos de *S. aureus* y 3 especies de péptidos de unión a ADN (véase la **Tabla 17** para conocer la composición de la red) como agentes de captura, entrelazados con BS3, BMPH, EMCH y EGS.

Las redes se bloquearon e incubaron con muestras que contenían poblaciones microbianas mixtas de exudados nasales de pacientes (negativos para SARM) y agentes de detección de SARM conjugados a FITC (una combinación de anticuerpos contra PBP2 y sondas de ADN de SCCmec) durante 30 minutos. Se lavaron las redes y se leyeron

mediante fluorómetro a A520.

Véase la **figura 23** para conocer los resultados. Los datos representan la intensidad fluorescente producida a partir de redes de 7 o 14 uL incubadas con muestras de exudado negativas para SARM. Las barras de error representan el EEM. La importancia de estos datos demuestra que las redes más pequeñas producen menos ruido que las redes más grandes. El objetivo de la mayoría de los diagnósticos moleculares es aumentar la señal y reducir el ruido. La red molecular consigue un ruido inferior en presencia de muestras complejas que los inmunoensayos convencionales y similares. La disposición 3D de la red molecular contribuye a esta propiedad.

10 EJEMPLO 20: LA RED PERMITE UNA SEÑAL POSITIVA MÁS RÁPIDA EN COMPARACIÓN CON EL INMUNOENSAYO 2D ESTÁNDAR

Señal específica de *S. aureus* entre la red tricapa 3D y el formato 2D de inmunoensayo estándar, cada una a los 15 min. Véase la **figura 24** para conocer los resultados. Los datos representan la señal fluorescente media por encima del fondo.

Agentes de captura

- 1) Albúmina (CalBiochem) (solución madre = 10 %)
- 2) Péptido de unión a ADN 1 (VLF GKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 3) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 4) Péptido de unión a ADN 7 (RRRRRRRRRRRR) (solución madre = 1 mg/mL)
- 5) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 6) pAb contra *S. aureus* (solución madre = 1 µg/mL)
- 7) mAb contra *S. aureus*, IgM (solución madre = 1 µg/mL)
- 8) mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13 (solución madre = 1 µg/mL)
- 9) mAb contra *S. aureus*, clon 704 (solución madre = 1 µg/mL)
- 10) pAb contra proteína A (solución madre = 1 µg/mL)

Enlazadores

- 1) BMPH (solución madre = 285 nM)
- 2) EGS (solución madre = 5,9-6,03 µM)
- 3) EMCS (solución madre = 0,03 mM)
- 4) BS³ (solución madre = 14,4 µM)
- 5) Formaldehído (solución madre = 37 % p/v)

Subcapa

- 1) Premezclar un lote de subcapa: relación 1:1 de albúmina y formaldehído.
- 2) Añadir inmediatamente [pipetear] 2 µL de mezcla de subcapa sobre una superficie.
- 3) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Primera capa

- 4) Diluir solución madre de enlazador a 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4, usar solo ese día.

5) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar los materiales de la 1ª capa.

5 6) Añadir inmediatamente [pipetear] 2,5 µL de la primera capa de captura sobre la parte superior de la subcapa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la primera capa de captura sobre la subcapa remanente).

7) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

10 Segunda capa

8) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 2ª capa.

15 9) Añadir inmediatamente [pipetear] 2,5 µL de la segunda capa de captura sobre la parte superior de la 1ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la segunda capa de captura sobre la 1ª capa remanente).

20 10) Dejar curar durante 2 horas a temperatura ambiente para desactivar los enlazadores.

11) Para el formato 2D, se absorbieron 7 uL de componentes de captura idénticos en 100 uL de PBS pH 7,4.

12) La placa se incubó durante la noche a 4 °C.

25 Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron réplicas de las redes estratificadas y el formato 2D según los procedimientos anteriores.

30 2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.

3. Se recogieron las colonias de *S. Aureus* sembradas en placas, se diluyeron en serie en PBS y se contaron.

4. Las muestras de exudado nasal de biopelícula humana se enriquecieron con ~20 UFC de SASM o control.

35 5. Las muestras se incubaron a continuación con cada red y una dilución 1:46 del sistema de detección de *S. Aureus* marcado con FITC durante 30 minutos a TA en la oscuridad (remítase a la tabla 17 para conocer el sistema de detección).

40 6. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.

7. Se midió la fluorescencia a 520 nm en cada pocillo mediante un lector de placas.

Se sabe perfectamente en la técnica que los anticuerpos pueden unirse a los epítomos correspondientes muy rápidamente. La unión de anticuerpo-epítomo es dependiente de la frecuencia de interacción molecular y se puede producir en un plazo de 300 segundos en muestras no complejas y de hasta 120 minutos en muestras complejas. La red molecular está construida para que tenga una arquitectura 3D con numerosas características topológicas dentro de la estructura y sobre la superficie. En este ejemplo, la premezcla de captura y enlazador produce conjugados pequeños en solución, que a continuación se añaden al extremo creciente de la red molecular. Los procedimientos de construcción anteriores para la generación de redes requerían la mezcla de moléculas de captura y enlazador dentro de la capa. La finalidad de las características 3D es maximizar la interacción de los componentes de captura de la red con los epítomos correspondientes en una muestra compleja. Los inmunoensayos 2D tradicionales (p. ej., ELISA) tienen una incubación de 60 a 120 minutos del anticuerpo de captura con la muestra. En el formato de inmunoensayo 2D, los analitos se difunden a través de la solución e interactúan con los componentes de captura absorbidos sobre una superficie plana grande. En el formato de red 3D, los analitos se difunden a través de la solución (o se pueden empujar o traccionar) e interactúan con una red multicapa enriquecida topológicamente de diámetro pequeño y una altura superior a los inmunoensayos 2D convencionales. La arquitectura de la red 3D facilita las interacciones de captura a epítomo y, por tanto, reduce los tiempos de incubación. Usando óptica simple y componentes de detección marcados mediante fluorescencia, una red puede acelerar un inmunoensayo de tipo sándwich tradicional.

60 EJEMPLO 22: DISTINTIVOS DE UNIÓN ESPECÍFICA DE S. AUREUS Y S. EPIDERMIDIS A REDES MOLECULARES DISEÑADAS PARA INMOVILIZAR S. AUREUS Y S. AUREUS RESISTENTE A LA METICILINA

(SARM) EN UNA MUESTRA

Como se muestra en este ejemplo, las redes moleculares también se pueden usar para detectar SARM directamente en un formato de ensayo que no es de tipo sándwich premarcando células de una muestra, incubando la red con la muestra y buscando el marcador inmovilizado sobre una red. Se enlazaron entre sí redes moleculares multicapa compuestas por péptidos de unión a ADN, anticuerpos policlonales y monoclonales anti-S. aureus sin reactividad cruzada con BS3, BMPH, EMCH y EGS en placas de 96 pocillos, se curaron y se bloquearon con una dilución 1:20 de 10 % de BSA en PBS (Pierce).

10 Agentes de captura

- | | | |
|----|--|----------------------------|
| | 1) Albúmina (CalBiochem) | (solución madre = 10 %) |
| 15 | 2) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 3) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 4) Péptido de unión a ADN 7 (RRRRRRRRRRR) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| 20 | 5) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) | (solución madre = 1 mg/mL) |
| | 6) pAb contra S. aureus | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 7) mAb contra S. aureus, IgM | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 25 | 8) mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13 | (solución madre = 1 µg/mL) |
| | 9) mAb contra S. aureus, clon 704 | (solución madre = 1 µg/mL) |
| 30 | 10) pAb contra proteína A | (solución madre = 1 µg/mL) |

Enlazadores

- | | | |
|----|--------------------|--------------------------------|
| 35 | 1) BMPH | (solución madre = 285 nM) |
| | 2) EGS | (solución madre = 5,9-6,03 µM) |
| | 3) EMCS | (solución madre = 0,03 mM) |
| 40 | 4) BS ³ | (solución madre = 14,4 µM) |
| | 5) Formaldehído | (solución madre = 37 % p/v) |

Subcapa

- 45
- 1) Premezclar un lote de subcapa: relación 1:1 de albúmina y formaldehído.
 - 2) Añadir inmediatamente [pipetear] 1 o 2 µL de mezcla de subcapa sobre una superficie.
- 50
- 3) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Primera capa

- 55
- 4) Diluir solución madre de enlazador a 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4, usar solo ese día.
 - 5) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar los materiales de la 1ª capa.
- 60
- 6) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la primera capa de captura sobre la parte superior de la subcapa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la primera capa de captura sobre la subcapa remanente).

7) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Segunda capa

5 8) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 2ª capa.

10 9) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la segunda capa de captura sobre la parte superior de la 1ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la segunda capa de captura sobre la 1ª capa remanente).

10) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Tercera capa

15 11) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 3ª capa.

20 12) Añadir inmediatamente [pipetear] 1,25 o 2,5 µL de la tercera capa de captura sobre la parte superior de la 2ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la tercera capa de captura sobre la 2ª capa remanente).

13) Dejar curar durante 15 minutos a 2 horas a temperatura ambiente para desactivar los enlazadores.

25 14) Dejar que se absorba a la superficie almacenando durante la noche a 4 °C.

15) Bloquear las redes con 200 µL de 0,5 % de BSA en PBS pH 7,4 durante 12 horas a 4 °C o durante 2 horas a 37 °C.

30 Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron redes estratificadas por triplicado según los procedimientos anteriores.

35 2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.

3. Las colonias de *S. Aureus* y SARM sembradas en placas se recogieron, se diluyeron en serie en PBS, se contaron y se precargaron con FITC (Invitrogen) a 37 °C durante 30 minutos, según las instrucciones del fabricante.

40 4. Las muestras de exudado nasal de biopelícula humana se enriquecieron con ~20 UFC de SARM o SARM marcada con FITC.

5. Las muestras se incubaron a continuación con cada red durante 30 minutos.

45 6. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.

7. Se midió la fluorescencia a 520 nm en cada pocillo mediante un lector de placas.

50 Las muestras que contenían células de *S. aureus* y SARM cargadas con FITC (Invitrogen) a 10 o 20 UFC se incubaron con las redes durante 30 minutos, se lavaron y se leyeron a 520 nm. Las barras de error representan el EEM. Véase la Fig. 26. Este ejemplo demuestra que la unión directa de analito a una red se puede detectar precargando una muestra con una señal fluorescente.

55 EJEMPLO 23: COMPONENTES DEL SISTEMA DE DETECCIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN DE SARM EN LA PRUEBA DE SARM

60 Las redes moleculares construidas como se describió anteriormente en el Ejemplo 22 se incubaron con 500 UFC de SARM y una dilución en serie de componentes del sistema de detección (sondas de ADN o anticuerpos) durante 30 minutos antes del procedimiento de prueba y la lectura a 520 nm. La **figura 27A** muestra las diluciones en serie del componente de detección a base de sondas que está compuesto por sondas de ADN conjugadas a FITC contra la región SCCmec. La **figura 27B** muestra las diluciones en serie del componente de detección a base de anticuerpos que está compuesto por anticuerpo monoclonal anti-SARM, clon AC10, conjugado a FITC, anticuerpo monoclonal anti-

SARM, clon 332/423, y anticuerpo monoclonal anti-SARM, clon 198. El análisis de regresión lineal se realizó mediante Prism. Estos estudios se realizaron para determinar los niveles mínimos de sistema de detección que se deben inmovilizar sobre una red para que sean detectados por lectores de placas fluorescentes convencionales. Se realizó la regresión lineal para determinar la intersección con el eje x para las sondas de SARM y los anticuerpos contra SARM. Se determinó que la concentración mínima de la mezcla de sondas necesaria para producir una señal estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo era <1 pMol por prueba. Se determinó que la concentración mínima de la mezcla de anticuerpos era 40 uMol por prueba.

El sistema de detección de SARM también puede diferenciar 3 mAb totalmente distintos contra diferentes epítomos de Pbp2a. El sistema de detección de SARM también puede contener 4 sondas dirigidas contra *mecA* y las sondas restantes contra secuencias hacia los extremos 5' y 3' de SCCmec. Estamos diseñando actualmente sondas adicionales contra esta región, que incluyen secuencias de *mecR*. También estamos diseñando sondas con modificaciones resistentes a nucleasas para aumentar la estabilidad en muestras ricas en nucleasas.

15 sonda de *mecA* 1 5'-AGATTTTTGATCGGCGAAGGCAATAAAC-3'

sonda de *mecA* 2 5'-AAAGAAATCATGTCACAAAAAAGTATT-3'

20 sonda de Δ *mecR* 1 5'-ACAATTTTTGATTTCTATTTCTTTTAGAG-3'

sonda de *mecR* 1 5'-GGAACAGGAATCGTGAATCACAAAGAA-3'

EJEMPLO 24: ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE SARM: LA IMPORTANCIA DE LAS REDES ESPECÍFICAS DE S. AUREUS Y LA DETECCIÓN ESPECÍFICA DE SARM

25 Este ejemplo demuestra que se puede detectar SARM usando una red molecular que tiene componentes de captura que enriquecen, aíslan, unen o inmovilizan un primer conjunto de analitos de interés (es decir, *S. aureus*) y a continuación moléculas de detección contra diferentes analitos (indicadores de resistencia a la meticilina) en un formato de ensayo de tipo sándwich.

30 Se enlazaron entre sí redes moleculares multicapa compuestas por péptidos de unión a ADN, anticuerpos policlonales y monoclonales anti-*S. aureus* sin reactividad cruzada y anti-proteína A con BS3, BMPH, EMCH y EGS en placas de 96 pocillos, se curaron y se bloquearon con una dilución 1:20 de 10 % de BSA en PBS pH 7,4 (Pierce). El sistema de detección de SARM, compuesto por anticuerpo monoclonal anti-SARM, clon AC10, anticuerpo monoclonal anti-SARM, 35 clon 332/423 y anticuerpo monoclonal anti-SARM, clon 198 (cada uno a 1 ug/mL), se combinó con sondas de ADN anti-SCCmec (cada una a 1 μ M). Todas las moléculas de detección se biotinilaron e incubaron con avidina-FITC en una relación molar 3:1.

Agentes de captura

- 40 1) Albúmina (CalBiochem) (solución madre = 10 %)
- 2) Péptido de unión a ADN 1 (VLFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 45 3) Péptido de unión a ADN 2 (VMFGKLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 4) Péptido de unión a ADN 7 (RRRRRRRRRRR) (solución madre = 1 mg/mL)
- 50 5) Péptido de unión a ADN 6 (VFFGRLA) (solución madre = 1 mg/mL)
- 6) pAb contra *S. aureus* (solución madre = 1 μ g/mL)
- 7) mAb contra *S. aureus*, IgM (solución madre = 1 μ g/mL)
- 55 8) mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13 (solución madre = 1 μ g/mL)
- 9) mAb contra *S. aureus*, clon 704 (solución madre = 1 μ g/mL)
- 60 10) pAb contra proteína A (solución madre = 1 μ g/mL)

Enlazadores

- 1) BMPH (solución madre = 285 nM)
- 2) EGS (solución madre = 5,9-6,03 uM)
- 3) EMCS (solución madre = 0,03 mM)
- 4) BS³ (solución madre = 14,4 uM)
- 5) 5) Formaldehído (solución madre = 37 % p/v)

Tabla 20: Reactivos de detección de SARM (ug/mL para los anticuerpos y pM para las sondas):

Agente de captura	Modificación	Proveedor	Cant. de solución madre usada (ug para los Ab y pMol para las sondas)
mAb contra SARM, clon 332/423	Biotina	AbD Serotec	1
mAb contra SARM, clon 198	Biotina	AbCam	1
mAb contra SARM, clon AC10	Biotina	AbCam	1
ACACCATTTTATATTGAGCATCTACT	Biotina	IDT	1
ACACCATTTTACCACGTTCTGATTTT	Biotina	IDT	1
ACACCATTCCACATTGTTT	Biotina	IDT	1
ACACCAGTCATTTCTACTTCACCATTA	Biotina	IDT	1
ACACCATGTTATGTTTTTAAGAAGC	Biotina	IDT	1
ACACCAGATAAATCTTTAAGTACAAG	Biotina	IDT	1
Fragmento Fc de IgG humana*	ninguna	Millipore	4,3

- 10 El fragmento Fc de IgG humana no es una parte activa del sistema de detección de SARM, sino que une y ocluye proteína A de *S. aureus* para minimizar la detección de falsos positivos de *S. aureus* sensible a la meticilina.

Subcapa

- 15 1) Premezclar un lote de subcapa: relación 1:1 de albúmina y formaldehído.
 2) Añadir inmediatamente [pipetear] 2 µL de mezcla de subcapa sobre una superficie.
 3) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

20

Primera capa

- 4) Diluir solución madre de enlazador a 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4, usar solo ese día.
 25 5) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar los materiales de la 1ª capa.
 6) Añadir inmediatamente [pipetear] 2,5 µL de la primera capa de captura sobre la parte superior de la subcapa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la primera capa de captura sobre la subcapa remanente).
 30 7) Dejar curar durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente.

Segunda capa

- 35 8) Premezclar un lote de captura y enlazador en una relación 2:0,5 de soluciones madre de captura a enlazador para generar la 2ª capa.
 9) Añadir inmediatamente [pipetear] 2,5 µL de la segunda capa de captura sobre la parte superior de la 1ª capa (si se cura a temperatura superior, se produce evaporación; colocar la segunda capa de captura sobre la 1ª capa remanente).
 40 10) Dejar curar durante 2 horas a temperatura ambiente para desactivar los enlazadores.

11) Dejar que se absorba a la superficie almacenando durante la noche a 4 °C.

12) Bloquear las redes con 200 µL de 0,5 % de BSA en PBS pH 7,4 durante 12 horas a 4 °C o durante 2 horas a 37 °C.

5

Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron réplicas de redes estratificadas según los procedimientos anteriores.

10

2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.

3. Las colonias de *S. aureus* (SASM), SARM, *S. epidermidis* (SESM) y SERM sembradas en placas se recogieron, se diluyeron en serie en PBS y se contaron.

15

4. Las muestras de exudado nasal de biopelícula humana se enriquecieron con ~20 UFC de SASM, SARM, SERM o SESM.

5. Las muestras se incubaron a continuación con 10 uL de una dilución 1:46 del sistema de detección de RM marcado con FITC con cada red durante 30 minutos.

20

6. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.

7. Se midió la fluorescencia a 520 nm en cada pocillo mediante un lector de placas.

25

Véase la **figura 28**. Las muestras que contenían *S. epidermidis* sensible a la meticilina (SESM) y *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) y *S. epidermidis* resistente a la meticilina (SERM) y *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) a 20 UFC se incubaron con las redes y el sistema de detección marcado con FITC durante 30 minutos, se lavaron y se leyeron a 520 nm. Las barras de error representan el EEM.

30

La importancia de estos estudios es:

(I) Los niveles dobles de especificidad: la red une analitos específicos de *S. aureus* (e inmoviliza SASM y SARM) y el sistema de detección se une a analitos específicos de SARM (SCCmec y PBP2a).

35

(II) La red enriquece y focaliza la ubicación de analitos específicos de *S. aureus* inmovilizados para el sistema de detección para marcar dichos analitos. En este ejemplo, una prueba que usa una red molecular capaz de unirse y enriquecerse por la presencia de analitos (el patógeno *S. aureus*) combinada con un sistema de detección capaz de unir analitos poco abundantes que se asocian en un grado alto con *S. aureus* (que confieren resistencia a los antibióticos) puede ser útil.

40

(III) La red se puede usar en una prueba para detectar la presencia de un analito dependiente. En este ejemplo, la red une analito A, que está muy correlacionado con la presencia de analito B, contra el que se dirige el sistema de detección. Por lo tanto, en este ejemplo, una prueba positiva indica la presencia de SARM (la red une SA y la detección detecta RM; la RM solo puede unirse si se une SA a la red; significativamente, el sistema de detección de RM no se une cuando se incubaba *S. epidermidis* resistente a la meticilina con redes).

45

EJEMPLO 25: ROC DE LA PRUEBA DE SARM

50 Se realizaron pruebas de sensibilidad y especificidad en la prueba de SARM de 30 minutos como se describió en el Ejemplo 22 anterior con 10 y 20 UFC de SARM y *S. epidermidis*. El análisis de la ROC se realizó con Prism. Véase la **figura 29**. Las condiciones para estos análisis se consiguieron según el Ejemplo 24. Se usaron los resultados de pruebas de numerosos estudios con redes moleculares construidas para unir analitos de *S. aureus* y con el sistema de detección diseñado para unir SCCmec y Pbp2a.

55

Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron réplicas de redes estratificadas según los procedimientos anteriores.

60

2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.

3. Las colonias de *S. aureus* (SASM), SARM, *S. epidermidis* (SESM) y SERM sembradas en placas se recogieron,

se diluyeron en serie en PBS y se contaron.

4. Las muestras de exudado nasal de biopelícula humana se enriquecieron con ~10 o 20 UFC de SARM, SARM, SERM o SESM.

5

5. Las muestras se incubaron a continuación con 10 uL de una dilución 1:46 del sistema de detección de RM marcado con FITC con cada red durante 30 minutos.

10

6. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.

7. Se midió la fluorescencia a 520 nm en cada pocillo mediante un lector de placas.

15 Estos datos demuestran el potencial de una prueba basada en redes moleculares para producir resultados estadísticamente significativos en un plazo de 30 minutos, con muy pocas etapas del procedimiento (etapas 5-7) y nada más que un simple lector de placas para determinar la positividad de la prueba. Muchas estrategias actuales requieren máquinas grandes, más tiempo y protocolos de tratamiento de muestras complicados para conseguir resultados similares.

20 EJEMPLO 26: EFECTO DE LA CONFIGURACIÓN DE LAS REDES SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

Curvatura superficial

25 Se construyeron diferentes configuraciones de redes moleculares y se curaron en pocillos planos o redondos de placas de 96 pocillos. Se evaluaron las diferentes configuraciones de las redes para determinar el rendimiento de la prueba SARM con exudados positivos o exudados negativos para SARM. Las barras de error representan el EEM. Véase la Fig. 30. Sobre una superficie cóncava, la señal es óptima sin una subcapa. Sobre una superficie plana, la señal es óptima con una subcapa, tal como 0,5-2,5 uL/capa o >2 capas.

30 Sobre perlas

35 Se construyeron redes moleculares tricapa (sin subcapas) sobre cuentas magnéticas y se colocaron en placas de 96 pocillos. Se evaluaron las perlas para determinar el rendimiento de la prueba de SARM con exudados positivos o exudados negativos para SARM. Las placas se colocaron en un campo magnético durante la retirada del lavado. Las placas se leyeron a 520 nm. Las barras de error representan el EEM. Véase la Fig. 31. Las redes construidas sobre perlas (superficie convexa) tienen una autofluorescencia de fondo inferior en comparación con las perlas solas (datos no mostrados) y pueden ser efectivas en una prueba de SARM.

40 EJEMPLO 27: RED PARA DETECTAR SIGNOS DE INFECCIÓN VÍRICA EN SANGRE DE PACIENTES

Este ejemplo profético describe la fabricación de una red molecular tricapa para la detección de una infección vírica. La red une 1) interferón alfa e 2) Interferón beta en este ejemplo. Otras dianas de unión pueden incluir 1) interferón alfa; 2) interferón beta, 3) MAVS vírica y 4) viperina vírica.

45 Materiales

Agentes de captura

- 50 1) Anticuerpos policlonales contra interferón-alfa (solución madre = 1 mg/mL)
2) Anticuerpos policlonales contra interferón-beta (solución madre = 1 mg/mL)

Enlazadores

- 55 3) EGS (solución madre = 0,00275 g/mL en DMSO)
4) EMCS (solución madre = 0,00225 g/mL en DMSO)
5) BS³ (solución madre = 0,0025 g/mL en DMSO)
60 6) Formaldehído (solución madre = 37 % p/v)

Procedimientos

1. Mezclar los agentes de captura 1-2 o 1-4 (anticuerpos) en una relación 1:1:1:1.

5 2. Subcapa: añadir una alícuota de 5 uL que contiene 2 uL de formaldehído y 3 uL de mezcla de anticuerpos a la superficie. Dejar absorber durante la noche a 4 °C. Retirar el líquido restante, que incluye todos los anticuerpos no inmovilizados.

Primera capa

10 3. Pipetear 6 uL de la mezcla de anticuerpos y la mezcla de enlazadores sobre la subcapa. Dejar curar durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 15-30 minutos a 30 °C.

Capas Adicionales

15 4. Repetir la etapa 3 para generar la segunda capa.

5. Repetir la etapa 3 para generar la tercera capa.

Liofilizar o añadir PBS + 0,001 % de azida de sodio y almacenar a 4 °C hasta su uso.

20 **TABLA 21** Contenido de la red molecular multicapa

Capa	Agente(s) de captura	Enlazador(es)
Primera	Anticuerpos contra IFN- α e IFN- β	Formaldehído
Segunda	Los mismos	EGS, EMCS, BS ³
Tercera	Los mismos	Los mismos

25 Se probaron muestras de sangre de control y muestras clínicas de sangre de CMV y EBV en la prueba de indicador de infección vírica. Se añadieron 20 uL de sangre completa o 20 uL de muestras de sangre diluida (dilución 1:2) simultáneamente con el sistema de detección para redes de indicador de infección vírica en un formato de placas de 384 pocillos y se incubaron durante 15 minutos a TA antes del lavado. Los pocillos se leyeron a 520 nm. Los datos representan la intensidad fluorescente (IF) de los pocillos después del lavado. Las barras representan la IF media para pruebas de sangre positivas y negativas. Véase la **Fig. 41**.

30 Análisis inicial de la ROC de la prueba de indicador de infección vírica en 6 muestras clínicas de sangre. Se probaron muestras clínicas de sangre conocidas, 2 muestras positivas conocidas, (i) CMV y (ii) EBV, y 2 muestras sospechosas de infección vírica en paralelo con 2 muestras de sangre negativas conocidas en presencia del sistema de detección conjugado a FITC durante 15 minutos a TA antes de lavado. Se leyeron los pocillos a 520 nm y los datos se analizaron mediante Prism. Véase la **Fig. 42**.

35 Los paneles de infección vírica actuales son específicos del serotipo y están basados en anticuerpos o PCR. Los procedimientos actuales para evaluar la infección vírica requieren una extracción de sangre de 5-10 cc, la preparación de la muestra, requieren mucho tiempo y se encuentran fuera del margen clínicamente viable. Hay una necesidad clínica de una prueba de indicador de infección vírica que pueda proporcionar información viable en la cita clínica inicial. La prueba de indicador de infección no necesita el procesamiento de la muestra y, con unas gotas de sangre, la prueba de indicador de infección vírica puede indicar los síntomas moleculares de una infección vírica en un plazo de 15 minutos a temperatura ambiente. Los datos anteriores sugieren que la detección rápida de los biomarcadores de respuesta vírica (interferones de tipo I) también se puede analizar y puede ser información útil.

45 **EJEMPLO 28: RED MOLECURA PARA DETECTAR UNA INFECCIÓN BACTERIANA**

Los datos de las **Fig. 2 y 7** demuestran que se refieren a células/analitos bacterianos en sangre completa que pueden ser detectados usando redes moleculares que tienen la composición como se describe en el Ejemplo 2.

50 Los procedimientos de referencia actuales para analizar infecciones bacterianas en la sangre requieren una extracción de sangre de 5-10 cc, hemocultivos o siembra en placas, requieren mucho tiempo (48 h) y se encuentran fuera del margen clínicamente viable. Hay una necesidad clínica de una prueba de indicador de infección bacteriana que pueda proporcionar información viable en la cita clínica inicial. La prueba de indicador de infección no necesita el

procesamiento de la muestra y, con 100-300 uL de sangre, la prueba de indicador de infección bacteriana puede indicar los distintivos moleculares de una infección bacteriana en un plazo de 15-30 minutos a temperatura ambiente.

La formulación de redes moleculares siguiente se puede usar para detectar distintivos más específicos de bacterias que se sabe que causan infecciones del torrente sanguíneo. Las redes pueden se pueden diseñar para inmovilizar distintivos habituales para bacterias gramnegativas (lípidos A) y para bacterias grampositivas (peptidoglucano), además de inmovilizar distintivos más específicos de los patógenos más habituales implicados en infecciones del torrente sanguíneo en la mayoría de los países industrializados. El sistema de detección para esta prueba está formulado como una mezcla de anticuerpos biotinilados de la tabla 22.

10

TABLA 22 Componentes de captura de la red bacteriana

Componentes RED BACT	Cantidad usada (uL/50 mL)	Descripción de la construcción
pAb contra estrept. del grupo B	10,0	Pipetear 49,32 mL de PBS
pAb contra lípidos A	2,5	Añadir anticuerpos
pAb contra L. monocytogenes	2,5	Añadir azida de sodio
pAb contra E. coli	5,0	Mezclar, almacenar a 4 °C hasta su uso
pAb contra E. coli O + K	2,0	
mAb contra S. aureus	10,0	
pAb contra Pseudomonas	2,2	
pAb contra estrept. del grupo A	10,0	
mAb contra Klebsiella	10,0	
mAb contra peptidoglucano	10,0	
mAb contra lípidos A	2,5	
pAb contra S. aureus	5,0	
pAb contra Enterococcus	10,0	
DNABP 1	4,3	
DNABP 4	5,0	
DNABP 6	6,0	
DNABP 10	-	
DNABP 11		
DNABP 12	10,0	
PBS	49322,78	
Azida de sodio	0,1	

Proveedores:

- 15 AbCam
Millipore
AbD Serotec

Enlazador para la subcapa:

- 20 Formaldehído (37 % p/v)

Enlazador para las capas de la red:

- EMCS (0,00275 g/mL en DMSO)
EGS (0,00325 g/mL en DMSO)
25 BS³ (0,075 g/mL en DMSO)
BMPH (0,00225 g/mL en DMSO)

Procedimiento:

- 30 Subcapa:

ES 2 808 408 T3

Mezclar 10 % de albúmina (p/v) en una relación 1:1 con formaldehído.
 Depositar 2 uL por pocillo.
 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente.

5 1ª capa de captura:

Preparar la solución de enlazador diluyendo la mezcla de enlazadores (a partir de solución madre de DMSO) 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4.

Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.

Depositar 2,5 uL directamente sobre la parte superior de la subcapa.

10 Curar más de 15 min a temperatura ambiente.

2ª capa de captura:

Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.

Depositar 2,5 uL directamente sobre la subcapa.

15 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente.

3ª capa de captura:

Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.

Depositar 2,5 uL directamente sobre la subcapa.

20 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación, cambiar las redes a 4 °C durante la noche.

EJEMPLO 29: REDES PARA UNIR *S. aureus*:

Componentes de captura de la red de *S. aureus*:

25

TABLA 23

Componentes RED SA	Cantidad usada (uL/50 mL)	Descripción de la construcción
pAb contra <i>S. aureus</i>	10,0	Pipetear 49,865 mL de PBS
mAb contra <i>S. aureus</i> , IgM	20,0	Añadir anticuerpos
mAb contra enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13	40,0	Añadir azida de sodio
mAb contra <i>S. aureus</i> , clon 704	24,1	Mezclar
DNABP 1	2,9	
DNABP 4	3,3	
DNABP 6	4,0	
DNABP 10	10,0	
DNABP 11	9,5	
DNABP 12	11,0	
PBS	49865,2	
Azida de sodio	0,1	

Proveedores:

30 Thermo Pierce
 AbCam
 Millipore
 AbD Serotec

Enlazador para la subcapa:

35 Formaldehído (37 % p/v)

Enlazador para las capas de la red:

40 EMCS (0,00278 g/mL en DMSO)
 EGS (0,00302 g/mL en DMSO)
 BS³ (0,0693 g/mL en DMSO)
 BMPH (0,00208 g/mL en DMSO)

Procedimiento:

Subcapa:

- Mezclar 10 % de albúmina (p/v) en una relación 1:1 con formaldehído.
 5 Depositar 1 o 2 uL por pocillo.
 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente.

1ª capa de captura:

- Preparar la solución de enlazador diluyendo la mezcla de enlazadores (a partir de solución madre de DMSO) 1:40 en PBS exenta de amina pH 7,4.
 10 Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.
 Depositar 1,25 o 2,5 o 3 uL directamente sobre la parte superior de la subcapa.
 Curar más de 15 min a temperatura ambiente.

15 2ª capa de captura:

- Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.
 Depositar 1,25 o 2,5 uL directamente sobre la subcapa.
 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente.

20 3ª capa de captura:

- Mezclar 1:4 volumen a volumen de enlazador a captura.
 Depositar 1,25 o 2,0 o 2,5 uL directamente sobre la subcapa.
 Curar más de 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación, cambiar las redes a 4 °C durante la noche.

- 25 Tres redes de *S. aureus* construidas de manera diferente y su capacidad correspondiente para unir *S. aureus* en una muestra compleja en un plazo de 15 minutos en comparación con un formato de inmunoensayo bidimensional.

Se construyeron dos redes estratificadas con una subcapa con los componentes de captura de la tabla 18. La red 1 estaba compuesta por subcapa, primera (2 uL de captura + 1 uL de enlazador), segunda (2 uL captura + 0,5 uL de enlazador) y tercera (1 uL de captura + 1 uL de enlazador) capas. La red 2 estaba compuesta por subcapa y primera (4 uL de captura + 1,5 uL de enlazador) capa. La red 3 estaba compuesta por subcapa y primera (5 uL + 2,5 uL de enlazador) capa. Las redes compuestas por subcapa + 6 uL de captura + 2,5 uL, subcapa + 3 uL de captura + 1,5 uL de enlazador y subcapa + 2 uL de captura + 1 uL enlazador, + 2 uL de captura + 1 uL enlazador, + 1 uL de captura + 1 uL de enlazador no funcionaron mejor que las redes 1 a 3 (datos no mostrados). El formato de inmunoensayo contenía una mezcla de captura idéntica (5 uL) y se absorbió durante la noche. Los pocillos se incubaron con 20 UFC de *S. aureus* sistema de detección a TA durante 15 minutos antes del lavado. Los pocillos se leyeron en un lector de placas a 525 nm. Las barras representan la señal fluorescente media de los pocillos por triplicado. Las barras de error representan el EEM. Los valores de p se obtuvieron mediante la prueba t de Student. Véase la Fig. 32. Estos datos demuestran que las redes moleculares pueden aumentar el tiempo de detección de analitos de *S. aureus* en comparación con el formato de inmunoensayo convencional, ya que 15 minutos fueron insuficientes para que el formato de inmunoensayo produjera una señal.

Detección de *S. aureus* inmovilizada en redes

- 45 Se incubó *S. aureus* o *S. epidermidis* con redes moleculares a 200 UFC/pocillo y sistema de detección de *S. aureus* (10 uL de 0 a 21,4 ng/pocillo de prueba). Véase la Fig. 33. Tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* habitan los mismos ambientes y son muy similares genética y morfológicamente. Las pruebas actuales para diferenciar estas especies se basan en la prueba fenotípica de catalasa realizada sobre el organismo cultivado. Los resultados de la Fig. 33 demuestran una estrategia oportuna y exacta para identificar analitos de *S. aureus* en una muestra compleja.

50 Prueba de *S. aureus* utilizando una red molecular

Se incubaron muestras con especies de *S. aureus* o distintas de *Saureus* con redes moleculares de *S. aureus* y sistema de detección durante 30 minutos a TA. Las barras representan la intensidad fluorescente promedio de las muestras para cada grupo. Las barras de error pequeñas representan el EEM. Véase la Fig. 34.

La capacidad para unir distintivos de *S. aureus* en muestras complejas en un plazo de 15 a 30 minutos permite la realización de pruebas rápidas de muestras clínicas, medioambientales e industriales.

60 EJEMPLO 30: SINERGIA DE LA DETECCIÓN DE MÚLTIPLES DISTINTIVOS

Las condiciones para estos análisis se consiguieron según el Ejemplo 24. Se usaron los resultados de pruebas de

numerosos estudios con redes moleculares construidas para unir analitos de *S. aureus* y los componentes del sistema de detección. El estudio se realizó para analizar la contribución individual del sistema basado en sondas diseñado para unir SCCmec y el sistema basado en anticuerpos diseñado para unir Pbp2a. El estudio también se diseñó para comparar la señal individual basada en sondas con la señal basada en anticuerpos y con la contribución combinada de ambas en un formato de prueba basado en redes.

Procedimiento de ensayo

1. Se construyeron réplicas de redes estratificadas según los procedimientos anteriores.
 2. Se retiró el bloque de los pocillos que contenían las redes y se lavó con PBS.
 3. Se sembraron en placas colonias de SARM.
 4. Se colocaron muestras que contenían 1000 UFC de SARM en pocillos que contenían redes.
 5. Las muestras se incubaron a continuación con 10 uL de una dilución en serie del sistema de detección de RM marcado con FITC (sondas o anticuerpos, o ambos) con cada red durante 30 minutos.
 6. Las redes se lavaron con 0,3 mL de PBS, 0,005 % de Tween-20 y 2,5 % de albúmina de huevo (tampón de lavado) y se enjuagaron rápidamente con PBS.
 7. Se midió la fluorescencia a 520 nm en cada pocillo mediante un lector de placas.
- La hibridación de las sondas a los analitos inmovilizados en la red representa un pequeño porcentaje de la señal legible. La contribución de los anticuerpos es significativamente mayor. Los resultados de este estudio sugieren que existe sinergia cuando las sondas marcadas con FITC están en la misma ubicación de realización de las pruebas que los anticuerpos marcados con FITC. Véase la Fig. 40. La amplificación de la señal es muy significativa y es un aspecto importante de la capacidad para detectar analitos poco abundantes. El posicionamiento de los analitos por la red contribuye a este resultado (véase el Ejemplo 20).

EJEMPLO 31: DETECCIÓN DIRECTA DE SARM EN UN ENSAYO DE TIPO SÁNDWICH

Este ejemplo profético demuestra la detección directa de SARM en un formato de ensayo de tipo sándwich. Las redes moleculares con la composición descrita en las tablas siguientes con componentes de captura se usan para inmovilizar analitos de una muestra y los analitos inmovilizados se detectan con componentes dirigidos contra los mismos analitos. Véanse las Tablas 23 y 24.

La ventaja de este procedimiento sobre los inmunoensayos actuales es el uso de múltiples anticuerpos de captura y anticuerpos de detección simultáneamente. Los inmunoensayos convencionales usan un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección diferente que reconoce 2 epítomos totalmente distintos sobre un analito. El uso de múltiples anticuerpos totalmente distintos que reconocen epítomos diferentes aumenta la probabilidad de detección.

Tabla 23: Componentes de captura

45

Componente de captura	Modificación	Proveedor	Conc. (ug)
mAb contra SARM, clon 332/423	sin modificar	AbD Serotec	1
mAb contra SARM, clon 198	sin modificar	AbCam	1
mAb contra SARM, clon AC10	sin modificar	AbCam	1

Tabla 24: Componentes de detección

Componente de detección	Modificación	Proveedor	Conc. (ug)
mAb contra SARM, clon 332/423	Biotina	AbD Serotec	1
mAb contra SARM, clon 198	Biotina	AbCam	1
mAb contra SARM, clon AC10	Biotina	AbCam	1

50 Construcción de las redes

Las redes se construyen como se indica a continuación: 1 ug/mL de cada anticuerpo no modificado se mezcla con una solución madre de trabajo de enlazador que contiene BS³ (363 nM), BMPH (27,5 nM), EMCS (750 nM) y EGS (150 nM) en una relación 2:0,5 de captura a enlazador. Las redes tricapa con subcapas (2 uL de cada una) se construyen usando una mezcla 1:1 de 10 % (p/v) de albúmina y 37 % (p/v) de formaldehído y se curan durante 15 minutos. Se construyen tres redes estratificadas (2,5 uL por capa). Las redes se curan, se enfrían rápidamente y se bloquean con 0,5 % de BSA antes de su uso.

Detección

Los componentes de detección biotinilados se preincuban durante 30 minutos a 37 °C con avidina-FITC (Invitrogen) en una relación 1:3.

Protocolo de ensayo

Las muestras que contienen SARM o los controles se incuban con redes y 10 uL de una dilución 1:46 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Los pocillos se lavan y enjuagan y se leen con un lector de placas fluorescente convencional.

EJEMPLO 32: MEDICINA PERSONALIZADA: FÁRMACOS COMO AGENTES DE CAPTURA PARA EL CITOCROMO P450

Hay más de 50 genes que codifican diferentes enzimas del citocromo P450 (isoenzimas) en el genoma humano y estas enzimas representan más de 70 % del metabolismo de los fármacos. Se sabe que numerosos fármacos afectan a la actividad de las isoenzimas del P450. Por ejemplo, si el fármaco A inhibe el metabolismo mediado por P450 del fármaco B, puede haber una bioacumulación de fármaco B en un ser humano que se aproxima a niveles tóxicos. Como otro ejemplo, si el fármaco A une una isoenzima del P450 con avidez alta, se suprime el efecto biológico del fármaco en un individuo.

Asimismo, los efectos secundarios de los fármacos son dependientes de los polimorfismos del P450 de los individuos.

Este ejemplo profético ilustra el uso de redes moleculares que tienen un fármaco experimental o un fármaco conocido como agente de captura. Estas redes se pueden poner en contacto con una muestra de sangre del paciente. La detección de la unión entre la red molecular y las isoenzimas y los polimorfismos del citocromo P450 se puede usar como un indicador de una posible interacción farmacológica adversa en un periodo de tiempo clínicamente viable (~30 minutos). La prueba está diseñada para detectar la mayoría de las enzimas del citocromo P450 que están inmovilizadas en la red de fármaco.

Tabla 25: Componentes de captura

Componente de la red	Proveedor	Concentración	Función
Carbamazepina	Novartis	5 mM	Agente de captura
NH ₂ -AGKATRKG-COOH	Anaspec	1 ug	Función estructural, múltiples aminas
NH ₂ -AGKAPAKD-COOH	Anaspec	1 ug	Función estructural, curvatura β para la red
NH ₂ -GSKAGKANAKK-COOH	Anaspec	1 ug	Función estructural, múltiples aminas

Tabla 26: Enlazadores

Enlazador	Brazo espaciador en nm (Ångstrom)	Enlaces	Concentración usada (nM)
SANPAH	1,82 (18,2)	Amina a no selectivo	600
NHS-ASA	0,57 (5,7)	Amina a no selectivo	260
LC-SDA (NHS-LC-Diazirina)	1,25 (12,5)	Amina a no selectivo	335
Formaldehído	0	No selectivo	37 % (p/v)

Tabla 27: Componentes de detección

Anticuerpo	Proveedor	Modificación	Concentración usada (ug)
CYP1A2	OriGene	Biotina	1
CYP2E1	OriGene	Biotina	1
CYP7B1	OriGene	Biotina	1
TBXAS1	OriGene	Biotina	1
POR	OriGene	Biotina	1
CYP3A5	OriGene	Biotina	1
ACYP1	OriGene	Biotina	1
LDB3	OriGene	Biotina	1
MUTYH	OriGene	Biotina	1
PPID	OriGene	Biotina	1
PPIA	OriGene	Biotina	1
CYP17A1	OriGene	Biotina	1
CYP19A1	OriGene	Biotina	1
CYP46A1	OriGene	Biotina	1
CYP19A1	OriGene	Biotina	1
CYP2B6	Sigma	Biotina	1
CYP2C19	Sigma	Biotina	1
CYP2D6	Pierce	Biotina	1
CYP3A4	Pierce	Biotina	1

5 Protocolo de construcción de las redes:

1. La subcapa se construye con una relación molar 50:1 de formaldehído a péptidos y se cura a TA durante 120 minutos
- 10 2. La capa inicial de la red molecular se construye premezclando los componentes de captura en PBS (carbamazepina y péptidos) con una dilución 1:400 de la mezcla de enlazador en PBS y aplicando un volumen directamente sobre una subcapa.
3. La fotoactivación del enlazador dentro de la capa de captura inicial se realiza mediante exposición a luz UV y curado a TA durante 30 minutos.
- 15 4. La segunda capa de la red molecular se construye premezclando los componentes de captura en PBS (carbamazepina y péptidos) con una dilución 1:400 de la mezcla de enlazador y aplicando un volumen directamente sobre una subcapa.
5. La fotoactivación del enlazador dentro de la capa de captura inicial se realiza mediante exposición a luz UV y curado a TA durante 30 minutos.
- 20 6. La tercera capa de la red molecular se construye premezclando los componentes de captura en PBS (carbamazepina y péptidos) con una dilución 1:400 de la mezcla de enlazador y aplicando un volumen directamente sobre una subcapa.
7. La fotoactivación del enlazador dentro de la capa de captura inicial se realiza mediante exposición a luz UV y curado a TA durante 30 minutos.
8. La reacción se extingue a partir de una incubación final a TA durante 2 h.
- 25 9. Las redes se bloquean con 0,5 % de BSA en PBS y se almacenan hasta su uso.

Protocolo de construcción de la detección:

- 30 1. Se genera una mezcla de anticuerpos de detección para proporcionar 1 ug/mL y se biotinila en una relación molar 20:1 usando el reactivo NHS-biotina (Pierce) según las especificaciones del fabricante.
2. La biotina que no ha reaccionado se retira mediante cromatografía de exclusión por tamaños.
3. La avidina-FITC se incuba con los anticuerpos de detección en relación molar 3:1 durante 30 minutos a 37 °C.

Protocolo de ensayo

1. Las redes bloqueadas se lavan con PBS pH 7,4.
2. Las muestras de sangre completa se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección.
3. Las redes se lavan con 0,5 % de BSA y 0,05 % de Tween en PBS después de 30 minutos.
4. Las redes se enjuagan con PBS y se leen usando un lector de placas fluorescente.

EJEMPLO 33: DETECCIÓN DE SEPSIS/BVF

- 10 La etiología orgánica de la sepsis se puede determinar usando redes moleculares. La ventaja de esta estrategia de realización de pruebas sobre los procedimientos actuales para determinar una infección del torrente sanguíneo es el uso de múltiples anticuerpos de captura y anticuerpos de detección simultáneamente que pueden reconocer una multitud de epítomos compartidos habituales entre las principales bacterias gramnegativas y grampositivas que se sabe que causan la mayoría de infecciones del torrente sanguíneo. Los procedimientos convencionales requieren el crecimiento de un hemocultivo y el crecimiento microbiano que, para ciertos organismos, puede no producirse en las condiciones clínicas de un laboratorio. Además, el empleo de 2 sistemas de detección independientes, uno para bacterias gramnegativas y el otro para bacterias grampositivas, permite un procedimiento rápido para distinguir entre dos de las clases más grandes de bacterias. El uso de una prueba basada en redes moleculares que no se basa en bacterias viables y que puede producir una señal legible en un plazo de 30 minutos es útil en muchos ámbitos clínicos.

20

Prueba bacteriana

Tabla 28: Red bacteriana

Componentes de la red bacteriana	Cantidad usada (uL/50 mL)	Descripción de la construcción
pAb contra estrep. del grupo B	10,0	Pipetear 49,32 mL de PBS
pAb contra lípido A	2,5	Añadir anticuerpos
pAb contra L. monocytogenes	2,5	Añadir azida de sodio
pAb contra E. coli	5,0	Mezclar, almacenar a 4 °C hasta su uso
pAb contra E. coli O + K	2,0	
mAb contra S. aureus	10,0	
pAb contra Pseudomonas	2,2	
pAb contra estrep. del grupo A	10,0	
mAb contra Klebsiella	10,0	
mAb contra peptidoglucano	10,0	
mAb contra lípido A	2,5	
pAb contra S. aureus	5,0	
pAb contra Enterococcus	10,0	
DNABP 1	4,3	
DNABP 4	5,0	
DNABP 6	6,0	
DNABP 10	-	
DNABP 11		
DNABP 12	10,0	
PBS	49322,78	
Azida de sodio	0,1	

25

Construcción del sistema de detección

Tabla 29: Detección de grampositivas

Componente	Modificación	Proveedor	Volumen (uL)	Notas
pAb contra estrept. del grupo A	Biotina	AbCam	5,0	Biotinilar todo en una relación molar 30:1 y a continuación congelar alícuotas
pAb contra estrept. del grupo B	Biotina	AbCam	5,0	Retirar toda la biotina que no ha reaccionado
pAb contra L. monocytogenes	Biotina	AbCam	1,3	Añadir todos los Abs biotinilados a 71,54 uL de PBS y añadir
mAb contra S. aureus	Biotina	AbCam	3,8	estreptavidina-FITC en una relación 4:1 relación, incubar a 37 C durante 30 min
pAb contra Enterococcus	Biotina	AbCam	5,0	
mAb contra peptidoglucano	Biotina	Millipore	5,5	
mAb contra Enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13	Biotina	AbD Serotec	5,5	
PBS		Mediatech	79,40	
avidina-FITC	FITC	Invitrogen	6,18	

Tabla 30: Detección de gramnegativas

Componente	Modificación	Proveedor	Volumen (uL)	Notas
pAb contra E. coli	Biotina	AbCam	1,3	Biotinilar todo en una relación molar 30:1 y a continuación congelar alícuotas
pAb contra E. coli O + K	Biotina	AbCam	2,5	Retirar toda la biotina que no ha reaccionado
pAb contra Pseudomonas	Biotina	AbCam	1,1	Añadir todos los Abs biotinilados a 71,54 uL de PBS y añadir
pAb contra Klebsiella	Biotina	AbCam	1,3	Estreptavidina-FITC en una relación 4:1, incubar a 37 C durante 30 min
pAb contra Legionella	Biotina	AbCam	2,6	
pAb contra lípido A	Biotina	AbD Serotec	1,8	
pAb contra lípido A	Biotina	AbCam	1,8	
PBS		Mediatech	92,13	
avidina-FITC	FITC	Invitrogen	2,88	

5

Construcción de redes bacterianas

Las redes se construyen como se indica a continuación: se mezcla 1 ug/mL de cada anticuerpo sin modificar con una solución madre de trabajo de enlazador que contiene BS³(363 nM), BMPH (27,5 nM), EMCS (750 nM) y EGS (150 nM) en una relación 2:0,5 de captura a enlazador. Se construyen redes tricapa con subcapas (2 uL cada una) usando una mezcla 1:1 de 10 % (p/v) de albúmina y 37 % (p/v) de formaldehído y se curan durante 15 minutos. Se construyen tres redes estratificadas (2,5 uL por capa). Las redes se curan, se enfrían rápidamente y se bloquean con 0,5 % de BSA antes de su uso.

Construcción de la detección

Los componentes de detección biotinilados se preincuban durante 30 minutos a 37 °C con avidina-FITC (Invitrogen) en una relación 1:3.

Protocolo de ensayo para laboratorios clínicos

Las muestras de sangre positivas para crecimiento microbiano o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Los pocillos se lavan y enjuagan y se leen con un lector de placas fluorescente convencional.

Protocolo de ensayo para instalaciones distintas de los laboratorios

Las muestras de sangre de pacientes que se sospecha que tienen infecciones del torrente sanguíneo o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Las redes se lavan una vez, se enjuagan y se leen con un fluorómetro convencional.

Prueba fúngica

Tabla 31: Componentes de captura de la red fúngica

Componente	Modificación	Proveedor	Concentración (ug)	Notas
pAb contra C albicans	Ninguna	AbCam	1	Añadir anticuerpos y repetir hasta
pAb contra Aspergillus	Ninguna	AbCam	3	50 mL de PBS pH 7,4
pAb contra C albicans	Ninguna	Novus	2	Añadir 0,01 % de azida de sodio
pAb contra quitina	Ninguna	Pierce	3	Almacenar a 4 C hasta su uso
mAb contra aflatoxina	Ninguna	AbCam	1,1	
pAb contra ocratoxina A	Ninguna	AbCam	1,5	
pAb contra ergosterol	Ninguna	Pierce	2,5	
PBS		Mediatech	-	
ENLAZADORES				
BS ³	Ninguna	Pierce	300 nM	Resuspender los enlazadores en solución madre de DMSO
BS(PEG) ₉	Ninguna	Pierce	600 nM	Diluir la solución madre 1:40 en PBS exenta de aminos
EGS	Ninguna	Pierce	216 nM	Mezclar captura a enlazador en una relación 2,0:0,6
SUBCAPA				
Albúmina	Ninguna	Calbiochem	10 % p/v	Reconstituir en PBS
Formaldehído	Ninguna	Pierce	37 % p/v	Mezclar albúmina a enlazador en una relación 1:1

Tabla 32: Componentes de la detección fúngica

Componente	Modificación	Proveedor	Volumen	Notas
pAb contra C albicans	Biotina	AbCam	5,0	Biotinilar en una relación molar 30:1 y a continuación

				congelar alícuotas
pAb contra Aspergillus	Biotina	AbCam	1,1	Retirar la biotina no unida
pAb contra C albicans	Biotina	Novus	5,0	Añadir todos los Abs biotinilados a 71,54 uL de PBS y añadir
pAb contra quitina	Biotina	Pierce	6,0	estreptavidina-FITC en una relación 4:1 relación, incubar a 37 C durante 30 min
mAb contra aflatoxina	Biotina	AbCam	5,5	
pAb contra ocratoxina A	Biotina	AbCam	5,5	
pAb contra ergosterol	Biotina	Pierce	4,5	
PBS		Mediatech	77,89	

Construcción de redes fúngicas

Las redes se construyen como se indica a continuación: se mezcla 1 ug/mL de cada anticuerpo sin modificar con una solución madre de trabajo de enlazador que contiene BS³(300 nM), BS(PEG)₉ (600 nM) y EGS (216 nM) en una relación 2:0,75 de captura a enlazador. Se construyen redes tricapa con subcapas (2 uL cada una) usando una mezcla 1:1 de 10 % (p/v) de albúmina y 37 % (p/v) de formaldehído y se curan durante 15 minutos. Se construyen tres redes estratificadas (2,5 uL por capa). Las redes se curan, se enfrían rápidamente y se bloquean con 0,5 % de BSA antes de su uso.

10

Construcción de la detección

Los componentes de detección biotinilados se preincuban durante 30 minutos a 37 °C con avidina-FITC (Invitrogen) en una relación 1:3.

15

Protocolo de ensayo para laboratorios clínicos

Las muestras de sangre positivas para crecimiento microbiano o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Los pocillos se lavan y enjuagan y se leen con un lector de placas fluorescente convencional.

20

Protocolo de ensayo para instalaciones distintas de los laboratorios

Las muestras de sangre de pacientes que se sospecha que tienen infecciones del torrente sanguíneo o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Las redes se lavan una vez, se enjuagan y se leen con un fluorómetro convencional.

25

Prueba vírica

Los componentes de la prueba y los procedimientos para la construcción de la red y el ensayo son como se describen en el Ejemplo 24.

30

EJEMPLO 34: CRIBADO DE INFECCIONES

Las redes moleculares se pueden usar para el cribado de infecciones. La ventaja de esta estrategia de realización de pruebas sobre los procedimientos actuales es el uso de estrategias moleculares. Los procedimientos convencionales para las infecciones examinan al individuo en busca de fiebre o un aumento de glóbulos blancos (leucocitos) en el hemograma (también denominado CBC). La prueba de indicador de infección basada en redes permite la detección de moléculas producidas por los inmunocitos innatos en el encuentro inicial con un agente extraño. Esto precede a la respuesta del TNF que conduce a fiebre y también precede al aumento de leucocitos en la sangre como consecuencia de una infección. El uso de una prueba robusta basada en redes moleculares que se pueda usar rápidamente en numerosos ámbitos clínicos y produzca una señal legible en un plazo de 30 minutos es útil para los entornos posoperatorios, de medicina intensiva, de quemados, de trasplantes de médula ósea y de cuidados intensivos.

40

45

ES 2 808 408 T3

Tabla 33: Prueba de cribado de infecciones: componentes de las redes

Componente	Proveedor	Volumen (uL)	Notas
pAb contra LBP (N-17)	Santa Cruz	50	Pipetear 48,13 mL de PBS
pAb contra LBP (K-15)	Santa Cruz	50	Añadir anticuerpos
pAb contra azurocidina	AbCam	27	Añadir azida de sodio
mAb contra ficolina 2	AbCam	10	Mezclar
pAb contra catelicidina	AbCam	3	
pAb contra beta-defensina 2	AbCam	20	
pAb contra beta-defensina 1	AbCam	3	
mAb contra alfa-defensina 1+2+3	AbCam	5	
pAb contra beta-defensina 3	AbCam	10	
pAb contra beta-defensina 4	AbCam	20	
PBS	Mediatech	48013,06	
Azida de sodio	Pierce	0,1	
ENLAZADORES			
BS ³	Pierce	380 nM	Resuspender los enlazadores en solución madre de DMSO
EMCS	Pierce	500 nM	Diluir la solución madre 1:40 en PBS exenta de aminos
EGS	Pierce	245 nM	Mezclar captura a enlazador en una relación 2,0:0,6
SUBCAPA			
Albúmina	Calbiochem	10 % p/v	Reconstituir en PBS
Formaldehído	Pierce	37 % p/v	Mezclar albúmina a enlazador en una relación 1:1

Tabla 34: Prueba de cribado de infecciones: sistema de detección

Componente	Modificación	Proveedor	Volumen (uL)	Notas
pAb contra azurocidina	Biotina	AbCam	0,915	Biotinilar en una relación molar 30:1 y a continuación congelar alícuotas
pAb contra beta-defensina 1	Biotina	AbCam	1	Retirar la biotina no unida
pAb contra beta-defensina 4	Biotina	AbCam	1	Añadir todos los Abs biotinilados a 71,54 uL de PBS y añadir
pAb contra beta-defensina	Biotina	AbCam	1	estreptavidina-FITC en una relación 4:1 relación, incubar a 37 C durante 30 min
mAb contra LBP	Biotina	Antibodies Online	1	
mAb contra ficolina 2	ninguna	AbCam	1	
pAb contra beta-defensina 2	ninguna	AbCam	0,5	
mAb contra alfa-defensina 1+2+3	ninguna	AbCam	2	
PBS		Mediatech	91,5	
avidina-FITC	FITC	Invitrogen		

5 Construcción de redes de indicador de infección

Las redes se construyen como se indica a continuación: se mezcla 1 ug/mL de cada anticuerpo sin modificar con una solución madre de trabajo de enlazador que contiene BS³(380 nM), EMCS (500 nM) y EGS (245 nM) en una relación 2:0,75 de captura a enlazador. Se construyen redes tricapa con subcapas (2 uL cada una) usando una mezcla 1:1 de 5 10 % (p/v) de albúmina y 37 % (p/v) de formaldehído y se curan durante 15 minutos. Se construyen tres redes estratificadas (2,5 uL por capa). Las redes se curan, se enfrían rápidamente y se bloquean con 0,5 % de BSA antes de su uso.

Construcción de la detección

10 Los componentes de detección biotinilados se preincuban durante 30 minutos a 37 °C con avidina-FITC (Invitrogen) en una relación 1:3.

Protocolo de ensayo para ámbitos clínicos

15 Las muestras de sangre u orina de pacientes que se sospecha que tienen una infección o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Los pocillos se lavan y enjuagan y se leen con un lector de placas fluorescente convencional.

Protocolo de ensayo para ámbitos no clínicos

Las muestras de sangre u orina de individuos que se sospecha que tienen una infección o los controles se incuban con las redes y 10 uL de una dilución 1:50 del sistema de detección durante 30 minutos a TA. Las redes se lavan una vez, se enjuagan y se leen con un fluorómetro convencional.

EJEMPLO 35: REDES MOLECULARES PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS EN CONDICIONES REALES

Se construye una red molecular de *S. aureus* que puede inmovilizar analitos de *S. aureus* sensible a la metilicina y resistente a la metilicina sobre un hisopo de muestreo. Este hisopo puede ser para la toma de muestras de una persona, 30 alimentos, una superficie o un ambiente.

El hisopo de muestreo se usa como se indica a continuación:

- 1) Tomar una muestra de la fuente con el hisopo
- 35 2) Colocar el hisopo en el sistema de detección
- 3) Retirar el hisopo del sistema de detección
- 4) Colocar el hisopo en solución de lavado
- 5) Retirar el hisopo de la solución de lavado
- 6) Colocar el hisopo en solución de enjuague
- 40 7) Retirar el hisopo de la solución de enjuague
- 8) Colocar el hisopo en un lector

Redes moleculares adicionales y usos de las mismas

45 Las aplicaciones, las pruebas, los dispositivos y la composición de la materia para inmovilizar y/o detectar analitos en una muestra se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. con n.º de serie 61/281,991 (depositada el 24 de noviembre de 2009), 61/337,257 (depositada el 1 de febrero de 2010), 61/340,287 (depositada el 15 de marzo de 2010), 61/343,467 (depositada el 29 de abril de 2010), 61/410,837 (depositada el 5 de noviembre de 2010), 61/669,261 (depositada el 9 de julio de 2012) y 61/669,265 (depositada el 9 de julio de 2012).

50 El uso inventivo de redes moleculares en combinación con pruebas, dispositivos y procedimientos de esta descripción vence los problemas encontrados en la técnica anterior al proporcionar dispositivos y procedimientos para la realización de pruebas simultáneas de analitos de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos de la muestra, y combinaciones de los mismos, que usan análisis basados en la afinidad, fisicoquímicos, electroquímicos, magnéticos 55 y enzimáticos; y dispositivos y procedimientos para detectar o inmovilizar múltiples analitos específicos en una muestra, que se limitan a una a cinco clases de polipéptidos o ácidos nucleicos recombinantes que se van a absorber o fijar a un dispositivo y el reconocimiento correspondiente de anticuerpos que unen la una a cinco clases de sondas de polipéptidos o ácidos nucleicos recombinantes, respectivamente; que requieren el pipeteo preciso de la muestra; que requieren el flujo uniforme de los reactivos a través de un dispositivo; que requieren la acción capilar de los reactivos 60 para migrar a través de un dispositivo; y que requieren la unión uniforme de los reactivos a la superficie de prueba de un dispositivo.

El concepto de la presente invención y cualquier disposición, uso, procedimiento, prueba y dispositivo que emplea dicha invención, donde la construcción de una red heterogénea densa de múltiples tipos diferentes de componentes de captura que se pueden mezclar con nanopartículas metálicas y que puede contener topologías únicas y totalmente distintas y superficies de unión y propiedades físicas, eléctricas, vibratorias, térmicas, espaciales, magnéticas y químicas, se denomina red molecular; de manera que pueden estar presentes pequeños canales y pequeñas cavidades en toda la red molecular de una manera irregular; y de manera que una red molecular se enlaza covalente o no covalentemente mediante reticulantes químicos o se mezcla con polietilenglicol para aumentar la estabilidad de las moléculas de captura y aumentar la densidad de los posibles puntos de unión a los analitos por volumen de red molecular y/o para conferir una propiedad unificadora en lo que respecta a las propiedades físicas, vibratorias, espaciales, magnéticas y químicas de dicha red molecular; y de manera que dichos pequeños canales y cavidades dentro y a lo largo de dicha red molecular pueden contener múltiples propiedades químicas superficiales únicas y pueden conferir propiedades a la red molecular y al modo en el que el analito se mueve a través y alrededor de la red molecular mediante microfluidez, nanofluidez, acción capilar y otros medios de movimiento de solutos a través de una red densa de moléculas. La topología bi- y tridimensional de la red molecular no está definida, no es uniforme y es óptima para la unión e inmovilización específicas de múltiples analitos en muestras complejas.

Además, la descripción de esta solicitud también se refiere a las formas en las que las redes moleculares se pueden construir, procesar y disponer mediante moldes, seccionamiento, corte, grabado, extrusión u otro para generar una red molecular de dimensiones específicas con el fin de llenar un área, volumen, u otro para la realización de pruebas; o con el fin de llenar una columna, un tubo, una tubería, una manguera, un cartucho u otro; y de manera que dicha red molecular se puede construir para generar secciones vecinas de diferentes redes moleculares que contienen componentes de captura y/o reticulantes químicos de diferente especificidad química; y se puede unir o adaptar a una o más áreas de prueba en un dispositivo polimérico; o se puede fijar o adaptar en un dispositivo polimérico poroso; o se puede fijar en una columna polimérica, una tubería, un cartucho, un tubo, una manguera u otro.

Se describe un dispositivo que emplea múltiples redes moleculares diferentes o partes de redes moleculares configuradas dentro de una o más áreas de realización de pruebas para facilitar la captura, inmovilización y detección de múltiples analitos; de manera que las superficies de las redes moleculares comprenden una pluralidad de texturas, estructuras, propiedades químicas superficiales, topologías y propiedades de fluidez; y de manera que se puede configurar una pluralidad de redes moleculares en una única área de realización de pruebas; o de manera que se puede configurar una pluralidad de redes moleculares en una única columna, tubo, tubería, casete, cartucho u otro. Las superficies, topologías, disposiciones y propiedades físicas según la descripción, y los dispositivos que comprenden tales superficies, topologías, disposiciones y propiedades físicas, se usan para facilitar la unión, inmovilización y/o detección de múltiples analitos diferentes simultáneamente de una muestra medioambiental, alimentaria o biológica.

A diferencia de los dispositivos de ensayo de la técnica anterior, los dispositivos de ensayo inventivos descritos en esta solicitud no requieren el uso de materiales absorbentes, tales como papeles o membranas. Los dispositivos inventivos de la presente descripción se basan en el uso de cualquier superficie definida que contiene aminas, sulfhidrilos, carboxilos y/o hidroxilos que pueden servir como puntos de fijación para favorecer la construcción o el depósito de redes moleculares en, o sobre, un dispositivo; y de manera que las redes moleculares se pueden absorber, adaptar, unir o fijar a dicha superficie definida. Los dispositivos inventivos descritos en esta solicitud pueden requerir la inyección, impulsión, succión, arrastre, uso de hisopos, extracción, introducción, acoplamiento, corte, captura y/o exposición de una muestra a una o más redes moleculares; que se puede introducir en uno o más puertos de entrada de un dispositivo y no requiere etapas de pipeteo precisas. Los conceptos y dispositivos de la presente descripción son especialmente útiles para la realización de ensayos de afinidad tales como inmunoensayos, ensayos enzimáticos, ensayos de unión a proteínas y ensayos de unión a ácidos nucleicos de una pluralidad de muestras tales como: muestras medioambientales, muestras alimentarias, tejidos, células, microbios, fármacos, productos biológicos, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, esteroides, hormonas y otras moléculas que se encuentran en fluidos y productos, tales como, pero no limitados a: aguas residuales, agua de manantial, fuentes de agua para abastecimiento de poblaciones, masas de agua, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, suero, plasma, sangre, esputo, sebo, derrame pleural, exudado bucal, exudado orofaríngeo y orina simultáneamente.

Se describe un dispositivo analítico para determinar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra usando redes moleculares. El dispositivo puede comprender un conjunto de estructuras, cámaras y canales internos; de manera que una o más de dichas estructuras pueden tener una superficie que soporta y/o inmoviliza una o más redes moleculares que se pueden fijar covalente o no covalentemente; o adaptar; a una superficie, y de manera que la red molecular inmovilizada puede ser capaz de unir más de una clase diferente de analitos en una muestra. El dispositivo también puede comprender una pluralidad de redes moleculares en una o más disposiciones; en una o más áreas de realización de pruebas de un dispositivo, o de manera que las redes moleculares individuales se pueden separar en áreas de realización de pruebas individuales, donde todas las áreas de realización de pruebas se pueden exponer a dicha muestra de prueba o a una muestra de prueba separada, semipurificada o fraccionada para permitir

que uno o más analitos sean inmovilizados por múltiples moléculas de captura en una o más redes moleculares en una o más áreas de realización de pruebas de dicho dispositivo.

Se describe una o más redes moleculares y/o una disposición de partes de redes moleculares; de manera que la 5 disposición de las moléculas de captura y las propiedades químicas superficiales específicas correspondientes de las moléculas de captura y las preferencias de unión correspondientes para analitos específicos se pueden disponer en secciones dentro de la red molecular; de manera que la unión e inmovilización de analitos específicos a moléculas de 10 captura específicas puede generar un patrón de detección; y de manera que el patrón de detección se puede determinar mediante la inmovilización de moléculas de detección de analitos marcadas específicamente; y de manera que dichas moléculas de detección marcadas pueden proporcionar una o más señales; y de manera que el patrón y/o la disposición y/o el momento de emisión de la señal pueden proporcionar información en una prueba binaria o analítica.

Se describe una red molecular y/o una disposición de partes de la red molecular que pueden comprender un conjunto 15 de estructuras tales como una o más de una de las siguientes: una pared de la red molecular; una sección de la red molecular; un bloque de la red molecular; un mosaico de la red molecular; un patrón estriado de la red molecular u otra disposición que se pueda formar; de manera que las redes moleculares o partes de las mismas se pueden estratificar; apilar; enlazar en un mosaico; tejer; pegar; adherir; reticular y/o adsorber juntas; de manera que cada red molecular, parte o sección de una red molecular puede poseer características físicas y propiedades físicas únicas que confieren una unión mejorada de analitos específicos por unidad de volumen; y de manera que dichas disposiciones 20 pueden generar una capacidad de multiplexación, o superplexación, mejorada, de manera que la densidad y las especificidades de unión de las múltiples moléculas de captura diferentes pueden capturar e inmovilizar una gran población de analitos específicos de diferentes composiciones de una muestra; y de manera que dicha invención es una gran mejora de las capacidades de captura e inmovilización de las tecnologías actuales.

Se describen una o más redes moleculares, pruebas y dispositivos que pueden contener una o más redes moleculares, 25 con moléculas de captura y nanopartículas metálicas que están enlazadas entre sí con reticulantes químicos; de manera que dichas nanopartículas metálicas se enlazan covalentemente a uno o más grupos amina, sulfhidrilo, carboxilo y/o grupo hidroxilo para facilitar la reticulación entre sí y para capturar moléculas; y la construcción de una red molecular con propiedades térmicas, magnéticas, eléctricas, químicas, vibratorias, compresivas, espaciales y 30 colorimétricas únicas; de manera que la unión y el grado de unión de analitos específicos a las moléculas de captura pueden cambiar las propiedades de la red molecular; y de manera los cambios de las propiedades de la red molecular pueden ser una señal y se pueden detectar en una prueba binaria o analítica.

Se describe un dispositivo que contiene una o más redes moleculares, o paredes de redes moleculares, que contienen 35 moléculas de captura y nanopartículas metálicas modificadas intercaladas; de manera que la unión de analitos puede alterar las propiedades físicas, magnéticas, eléctricas, químicas, vibratorias, compresivas, colorimétricas, térmicas y espaciales de dichas redes moleculares o paredes de redes moleculares; de manera que dichas propiedades alteradas pueden ser una señal y se pueden detectar mediante sensores para producir información en una prueba binaria o analítica de dicho dispositivo.

Se describe un dispositivo y procedimientos en el interior de dicho dispositivo que pueden contener una o más redes 40 moleculares que pueden realizar PCR y/o RT-PCR en condiciones isotérmicas y/o en ciclos térmicos; de manera que dicha red molecular puede contener moléculas de captura tales como moléculas de unión a ácidos nucleicos y/o girasas, topoisomerasas y polimerasas; y de manera que el tampón que rodea la red molecular puede contener agua 45 y cebadores de ácidos nucleicos específicos, Mg^{2+} , nucleósidos y/o dimetilsulfóxido y/o glicerol; y de manera que los analitos de ácidos nucleicos se pueden procesar antes de, o simultáneamente a, la inmovilización a la red molecular con agentes de procesamiento tales como: nucleasas, girasas, topoisomerasas, calor y/o productos químicos; y de manera que los cebadores pueden hibridarse a nucleótidos específicos de los analitos de ácidos nucleicos; y de manera que las polimerasas de la red molecular pueden replicar dicho analito de ácido nucleico; y de manera que el 50 analito de ácido nucleico replicado se puede unir e inmovilizar a moléculas de captura específicas dentro de regiones, secciones y partes específicas de la red molecular; o se puede unir e inmovilizar mediante moléculas de captura dentro de regiones, secciones y partes específicas de una red molecular vecina; y de manera que el analito replicado inmovilizado se puede detectar mediante moléculas de detección; de manera que las moléculas de detección pueden ser sondas de ácidos nucleicos marcadas u otra molécula de detección marcada; y de manera que la unión de las 55 moléculas de detección puede ser una señal y se puede detectar en una prueba binaria o analítica.

Se describe un dispositivo que contiene uno o más cámaras de PCR y/o RT-PCR y cámaras que contienen una o más 60 redes moleculares que pueden capturar e inmovilizar productos de analitos de ácidos nucleicos replicados de una o más PCR y/o RT-PCR; de manera que la PCR y/o RT-PCR se pueden realizar en una cámara que precede a la cámara que contiene una o más redes moleculares; y de manera que los productos de analitos de ácidos nucleicos replicados inmovilizados se pueden detectar y pueden producir una señal en una prueba binaria o analítica.

Se describe un dispositivo que puede dividir la muestra en cámaras independientes; y de manera que dicho dispositivo contiene una o más cámaras de PCR y/o RT-PCR y una o más cámaras de unión de analitos que contienen una o más redes moleculares o disposiciones de redes moleculares y partes de las mismas; de manera que la muestra se puede dividir en la cámara de PCR y/o RT-PCR y en la cámara de unión de analitos simultáneamente; de manera que los analitos de ácidos nucleicos replicados producidos en la cámara de PCR y/o RT-PCR se pueden mover a la cámara de unión de analitos y pueden ser inmovilizados por las moléculas de captura de la red molecular junto con los analitos que no son de ácidos nucleicos, que pueden ser inmovilizados por moléculas de captura de la red molecular diferentes; y de manera que los analitos que no son de ácidos nucleicos y los analitos de ácidos nucleicos se pueden detectar simultáneamente mediante moléculas de detección de analitos marcadas; y de manera que las moléculas de detección marcadas inmovilizadas pueden producir una señal en una prueba binaria o analítica.

Se describe un dispositivo de unidad de filtración que contiene un único volumen, de manera que una red molecular; capas de la red molecular; disposiciones de secciones de redes moleculares; se pueden adaptar en un cartucho, una columna, una tubería, un tubo, un casete u otra unidad de contención polimérica; y de manera que la red molecular puede servir como una unidad de filtración para inmovilizar específicamente una pluralidad de analitos de una muestra líquida y permitir simultáneamente que la muestra líquida y los no analitos no unidos pasen a través de dicho volumen de filtración; y de manera que la muestra líquida y los no analitos no inmovilizados pueden ser devueltos a la fuente de muestra.

Se describe el uso de dispositivos y los dispositivos que usan una red molecular como una esponja molecular para inmovilizar y retirar analitos específicos de una muestra líquida; de manera que la inmersión de una o más esponjas moleculares o el dispositivo que contienen la esponja molecular en una muestra líquida puede retirar selectivamente todos, o un porcentaje significativo de, los analitos de interés de dicha muestra líquida; y de manera que los analitos que no son de interés no son retirados de dicha muestra líquida.

Las **figuras 43A-43B** muestran dos realizaciones de una red de superplexación. Las redes de superplexación son redes que capturan múltiples analitos relacionados con un estado de enfermedad específico. En algunas realizaciones, las redes de superplexación comprenden varias redes moleculares de la misma composición. En otras realizaciones, las redes de superplexación comprenden varias redes moleculares que tienen composiciones diferentes. Las redes de superplexación se pueden fabricar interconectando covalentemente redes moleculares individuales entre sí o se pueden fabricar mezclando redes moleculares preformadas individuales. En un ejemplo de una red de superplexación, dicha red de superplexación 4300 comprende un patrón ordenado de redes moleculares 4301, 4304 y 4307. Las **figuras 43A-43B** muestran vistas superiores de redes de superplexación 4300 en un volumen de prueba. En una red de superplexación 4300 determinada, una red 4300 puede comprender un conjunto con patrón (o mosaico) de redes 4301, 4304 y 4307 interconectadas entre sí mediante enlaces covalentes, o pueden estar colocadas de forma adyacente. Dicha red de superplexación 4300 puede estar sobre una superficie en fase sólida o puede estar en fase fluida. Dicha red de superplexación 4300 se puede colocar en un recipiente con un volumen para realización de pruebas conocido que comprende uno o más sensores y amplificadores 4312 cerca de una o más redes moleculares 4301, 4304, y/o 4307 de una red de superplexación 4300.

En su forma más simple, una red de superplexación puede comprender un conjunto de un único tipo de redes moleculares. En otras formas, una red de superplexación 4300 puede comprender un conjunto de múltiples redes moleculares dispuestas en un conjunto donde las redes moleculares, tales como las redes moleculares 4301, 4304 y 4307, que comprenden dicha red de superplexación 4300, están dispuestas en un conjunto para maximizar la captura de analitos por las redes moleculares individuales 4301, 4304 y 4307 de una red superplexación 4300 de manera secuencial, tal como la disposición 4310 mostrada en la **Fig. 43A**. Otro ejemplo de disposición de una red de superplexación se representa en la disposición 4311 mostrada en la **figura 43B**, de manera que la disposición de las redes moleculares individuales 4301, 4304 y 4307 en una red de superplexación 4300 maximiza la captura de analitos específicos de una muestra. La flecha 4313 representa el flujo de muestra a través de las disposiciones 4310 y 4311 de diversas redes moleculares 4301, 4304 y 4307 dentro de una red de superplexación 4300 para conseguir la captura óptima de analitos para una prueba determinada.

Las **figuras 43C-43E** muestran diversas realizaciones de redes moleculares 4301, 4304 y 4307, respectivamente. Dicha red de superplexación 4300 comprende más de una red molecular que comprende una o más capas, donde cada red molecular 4301, 4304 y 4307 comprende una mezcla de diferentes agentes de captura 4302, 4305 y 4308, respectivamente, que se dirigen contra analitos específicos que se sabe que son importantes para un estado de enfermedad, donde cada agente de captura proporciona afinidad de unión dirigida contra un antígeno específico en base a las propiedades fisicoquímicas de dicho agente de captura y donde dichos agentes de captura 4302, 4305 y 4308 están dispuestos e interconectados covalentemente mediante agentes enlazadores seleccionados 4304, 4306 y 4309, respectivamente, donde cada agente enlazador imparte características estructurales y espaciadoras a cada porción de la red molecular.

Las **figuras 44A-44B** muestran realizaciones de redes moleculares modificadas usando enlazadores de cloruro cianúrico. Las redes moleculares se pueden usar para capturar analitos de ácidos nucleicos mono- y bicatenarios de una muestra. Los ejemplos de composiciones de redes moleculares para la captura de analitos de ácidos nucleicos mono- y bicatenarios de una muestra se presentan en las **Fig. 44A-44B**. En un ejemplo mostrado en la **Fig. 44A**, se
 5 fabrica una porción de red molecular 4401 que comprende agentes de captura 4402 y agentes enlazadores 4403 sobre una superficie en fase sólida. Los agentes de captura 4402, por ejemplo, son péptidos de unión a ácidos nucleicos, que comprenden residuos de poli-lisina y/o poli-arginina y/o motivos de unión a ácidos nucleicos que tienen aminas primarias, y están unidos covalentemente entre sí mediante enlazadores 4403 que tienen longitudes predefinidas. Una etapa del procedimiento de fabricación implica la exposición controlada de la red molecular 4401 a cloruro cianúrico
 10 4404 durante un período de tiempo para generar aminas reactivas para el acoplamiento de los ácidos nucleicos mono- o bicatenarios 4405 de una muestra directamente a una porción de la red molecular 4401. Dicha porción de la red molecular se puede usar para unir ácidos nucleicos de una manera inespecífica para unir los ácidos nucleicos totales de una muestra, o se puede usar para unir secuencias de ácidos nucleicos específicas de una muestra usando secuencias de ácidos nucleicos de captura precargadas como componentes de captura enlazadas covalentemente en
 15 una o más porciones de una red molecular 4401.

En otro ejemplo, como se muestra en la **figura 44B**, se fabrica una porción de red molecular 4401 que comprende agentes de captura 4402 y agentes enlazadores 4403 sobre una superficie en fase sólida tratando primero dicha superficie con ácido cianúrico 4404B antes de la adición de una porción de agentes de captura 4402 y agentes
 20 enlazadores 4403. Los agentes de captura 4402 son péptidos de unión a ácidos nucleicos, que comprenden residuos de poli-lisina y/o poli-arginina y/o motivos de unión a ácidos nucleicos que tienen aminas primarias, y están unidos covalentemente entre sí mediante enlazadores 4403 que tienen longitudes predefinidas. Una etapa del procedimiento de fabricación puede implicar la exposición controlada de la red molecular 4401 a cloruro cianúrico 4404A durante un período de tiempo para generar aminas reactivas para el acoplamiento de los ácidos nucleicos mono- o bicatenarios
 25 4405 de una muestra directamente a una porción de la red molecular 4401. Dicha porción de la red molecular se puede usar para unir ácidos nucleicos de una manera inespecífica para unir los ácidos nucleicos totales de una muestra, o se puede usar para unir secuencias de ácidos nucleicos específicas de una muestra usando secuencias de ácidos nucleicos de captura precargadas como componentes de captura enlazadas covalentemente en una o más porciones de una red molecular 4401.

30 La **figura 45** muestra la fijación de analitos de ácidos nucleicos amplificados a redes moleculares 4501. Las redes moleculares 4501 también se pueden modificar químicamente mediante cloruro cianúrico 4502 en cierta porción o porciones de la red molecular 4501 para capturar analitos de ácidos nucleicos 4503 de una manera no específica, mientras que otras porciones de la red molecular pueden capturar analitos de ácidos nucleicos de una manera
 35 específica de la secuencia mediante agentes de captura específicos que tienen una secuencia complementaria 4504 a los analitos de ácidos nucleicos específicos de una muestra. Los analitos específicos capturados por dicha red molecular 4501 se pueden detectar usando sondas de detección específicas que tienen agentes indicadores contra una porción del ácido nucleico capturado 4505. Los ácidos nucleicos totales capturados por dicha red molecular 4501 se pueden detectar usando un indicador de detección inespecífico. En este ejemplo, las sondas de detección
 40 reconocen específicamente secuencias y están marcadas con Alexa 647, mientras que los ácidos nucleicos inespecíficos (totales) capturados por la red molecular 4501 están marcados con yoduro de propidio, naranja de acridina u otro.

La **figura 46** muestra una prueba isotérmica de afinidad de ácidos nucleicos que usa redes moleculares. Las redes de
 45 captura de ácidos nucleicos se pueden usar en la termociclación y amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por PCR para la amplificación y medición mejoradas de ácidos nucleicos y amplicones diana. La **figura 46** representa un dispositivo 4600 para capturar uno o más ácidos nucleicos específicos de una muestra, para amplificar dichos ácidos nucleicos específicos y para medir amplicones específicos usando una red molecular. Dicho dispositivo 4600 comprende canales que conectan la cámara de modificación de ácidos nucleicos 4601 para procesar, modificar,
 50 desnaturalizar y/o preparar analitos de ácidos nucleicos de una muestra; la cámara de contención de tampón 4602 para albergar el tampón requerido en la etapa de amplificación; la cámara de amplificación 4603 que contiene redes moleculares 4604 compuestas por agentes de captura de ácidos nucleicos específicos que también sirven como cebadores para la polimerización de los ácidos nucleicos; la cámara de detección y lavado 4605 que contiene sondas de detección y tampón de lavado; la cámara de detección de amplicones 4606 que comprende redes moleculares
 55 diseñadas y fabricadas para capturar secuencias de ácidos nucleicos específicas y la cámara de residuos 4607 para recoger toda la muestra que pasa y no ha sido unida.

La **Fig. 47** muestra redes moleculares con agentes de captura, metales coloidales, reticulantes y diversas características estructurales. La **figura 47** muestra una porción de una red molecular conductora 4700 que representa
 60 las características topológicas tridimensionales que incluyen la estructura no uniforme, las cavidades 4701 y los canales 4702 formados por los diferentes agentes de captura 4703, que tienen diferentes estructuras, que están interconectados mediante enlazadores covalentes que tienen longitudes conocidas. Además, dicha porción de red

molecular contiene nanopartículas metálicas conductoras 4705 enlazadas covalentemente a dichos agentes de captura 4703 para impartir propiedades conductoras a la red 4700. Tras la unión específica del analito al agente de captura 4703, las propiedades conductoras de dicha red molecular 4700 cambian. Dichas nanopartículas conductoras 4705 pueden ser puntos cuánticos, nanopartículas o micropartículas compuestas por cristales, metales, metaloides o aleaciones metálicas semiconductores.

La **figura 48** muestra redes moleculares como esponjas. Otro atributo de las redes moleculares es que la tridimensionalidad y la estructura multicapa no uniforme imparten una capacidad de unión superior en comparación con las tecnologías de captura tradicionales mitigando el impedimento estérico para maximizar la unión específica de analitos. En este ejemplo, una red molecular 4800 puede tener propiedades específicas similares a una esponja para capturar y unir analitos específicos 4801 de una muestra. Dicha red molecular 4800 se puede aplicar a una muestra líquida con el fin de retirar y/o detectar analitos específicos 4801 de una muestra líquida.

La **figura 49** muestra redes moleculares como unidades de filtración. La alta capacidad de captura de las redes moleculares se puede utilizar para filtrar analitos de una muestra. Las redes moleculares se pueden diseñar para capturar analitos en base a una combinación de tamaño, reconocimiento de patrones y afinidad específica. La **figura 49** presenta un ejemplo de un cartucho extraíble 4900 que comprende numerosas redes moleculares multicapa empaquetadas de manera que sirven como filtro molecular 4901. Dichas redes moleculares multicapa se pueden enlazar covalentemente a una perla, malla, papel u otra superficie receptiva compuesta por uno o más de los siguientes: poliestireno, sílice, polietileno, policarbonato, nailon, PTFE, cristales semiconductores, metales, metaloides, aleaciones metálicas, PVDF, nitrocelulosa.

El cartucho extraíble 4900 se puede conectar mediante un tubo 4902 desde una fuente de muestra para guiar el flujo de muestra a través del cartucho 4900 de manera direccional, cuyo flujo a su través se puede recircular a dicha fuente de muestra o se puede dirigir a otro depósito. La fuente de la muestra puede ser una muestra biológica que incluye, pero no se limita a, una muestra medioambiental que contiene microbios, un recipiente de fermentación, un cultivo celular, sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y tejido intersticial de un organismo.

Dichas redes moleculares multicapa se pueden diseñar y fabricar para capturar analitos tales como, pero no limitados a: células, restos celulares, productos celulares, metales, quelantes, fármacos, productos biológicos, mitógenos, citocinas, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, colesterolos, hormonas, bacterias, exosomas, virus, hongos, toxinas, protozoos y otros agentes y/o agentes que pueden ser retirados de una muestra biológica por una red molecular en base a una combinación de tamaño, reconocimiento de patrones y afinidad específica.

La **figura 50** muestra redes moleculares como paredes. En algunos casos, es deseable un recipiente que comprende una red molecular enlazada covalentemente a las paredes de dicho recipiente para la captura de analitos de una muestra. La **figura 50** presenta un ejemplo de un recipiente 5000 que tiene redes moleculares enlazadas covalentemente a sus paredes 5001 para la captura y detección de analitos 5002 inmovilizados a una red molecular. Las redes moleculares multicapa se pueden enlazar covalentemente a las paredes 5001 de un recipiente 5000 usando agentes enlazadores químicos covalentes tradicionales de manera que permitan la captura máxima de analitos a medida que una muestra fluye a través de dicho recipiente 5000. Los ejemplos de recipientes de la descripción actual incluyen cartuchos, tubos, tuberías, botellas, columnas, placas, portaobjetos, fibras ópticas, puntas, cubetas, nanohilos semiconductores y otros.

Dicha red molecular puede tener diversas propiedades físicas y/o químicas mensurables y la unión de uno o más analitos a la red molecular puede alterar las propiedades físicas y/o químicas de dicha red molecular, el cambio en dichas propiedades físicas y/o químicas se puede detectar mediante un sensor. Dicho sensor se calibrará para medir las propiedades iniciales de dicha red molecular antes de la administración de una muestra. Dicho sensor medirá a continuación dicha una o más propiedades de dicha red molecular después de la administración de la muestra. Un cambio mensurable en una o más propiedades de la red molecular indica la presencia de uno o más analitos unidos.

Las propiedades físicas y químicas de la red molecular que se pueden detectar incluyen las magnéticas, el índice de refracción, eléctricas, térmicas, compresivas, de dispersión, la acidez, la basicidad y otras.

La **figura 51** muestra la detección de analitos usando agentes reticulados y/o PEGilados con agentes de amplificación de la señal. La captura de analitos también se puede detectar usando nanoagregados de redes moleculares. Dichos nanoagregados de redes moleculares 5100 se fabrican en fase fluida antes de su uso, comprenden agentes de captura de analitos 5101 enlazados covalentemente mediante agentes enlazadores 5102, donde dichos agentes de captura 5101 están unidos covalentemente a un factor de amplificación de la señal 5103. Dicho factor de amplificación 5103 puede ser: enzima, metal, metaloide, aleación metálica, colorante visible, fluoróforo, químico, cofactor, sustrato y combinaciones de los mismos. Dichos factores de amplificación 5103 se pueden enlazar directamente a cada agente de captura 5101 antes de la fabricación de los nanoagregado de red molecular o se pueden enlazar directamente al

nanoagregado de red molecular ensamblado 5100.

En este ejemplo, la detección del analito 5104 se puede lograr mediante la coincubación de nanoagregados de redes moleculares 5100 con analito capturado de una muestra. Dichos nanoagregados de redes moleculares 5100 están compuestos por agentes de captura de analitos 5101 preenzimados con factores de amplificación de la señal 5103, cuyos agentes de captura de analitos 5101 están enlazados covalentemente mediante agentes de enlace 5102 que comprenden uno o más PEG para generar un espaciador de múltiples Angstrom. La longitud de cada nanoagregado 5100 viene dictada por el tamaño del analito que se va a detectar y por la distancia de separación óptima entre los factores de amplificación de la señal 5103 enlazados a cada agente de captura 5101. Se consigue un aumento en la distancia de separación mediante el uso de un enlazador de multi-PEG.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica deben entender que se pueden hacer diversos cambios y se pueden sustituir los equivalentes sin apartarse del alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación, un material, una composición de la materia, un procedimiento, una etapa o etapas del procedimiento particulares, para conseguir los beneficios proporcionados por la presente invención sin apartarse del alcance de la presente invención. Tales modificaciones están destinadas a encontrarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a esta solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura de red molecular multipolimérica estratificada que tiene múltiples capas con múltiples especies de agentes de captura unidas a múltiples especies de agentes de enlace que tienen diferentes longitudes y
5 producida mediante un procedimiento que comprende:
- combinar una primera pluralidad de agentes de captura heterogéneos de las múltiples especies de agentes de
10 captura con una primera pluralidad de agentes de enlace heterogéneos de las múltiples especies de enlazadores, donde la combinación es una primera premezcla para generar una primera capa de captura en solución;
- combinar una segunda pluralidad de agentes de captura heterogéneos de las múltiples especies de agentes de
15 captura con una segunda pluralidad de agentes de enlace heterogéneos de las múltiples especies de enlazadores, donde la combinación es una segunda premezcla para generar una segunda capa de captura en solución; y
- añadir la solución de segunda capa de captura a la primera capa de captura para crear una red molecular
20 construida para reconocer múltiples epítomos sobre uno o múltiples analitos.
2. La estructura de red molecular de la reivindicación 1, donde;
- 25 el uno o múltiples analitos incluyen *Staphylococcus aureus*;
- las múltiples especies de agentes de captura incluyen un componente seleccionado del grupo que consiste en
albúmina, un péptido de unión a ADN que consiste en VLFGKLA (SEQ ID NO: 12), un péptido de unión a ADN que
30 consiste en VMFGKLA (SEQ ID NO: 13), un péptido de unión a ADN que consiste en VFFGRLA (SEQ ID NO: 14),
un péptido de unión a ADN que consiste en RRRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 38), un péptido de unión a ADN que
25 consiste en VFFGRLA (SEQ ID NO: 38), pAb contra *S. aureus*, mAb contra *S. aureus*, IgM, mAb contra
Enterotoxina A/B/C1/C2/D/E, clon S13, mAb contra *S. aureus*, clon 704, y pAb contra proteína A.
3. La estructura de red molecular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las múltiples
30 especies de agentes de enlace incluyen un componente seleccionado del grupo que consiste en hidrazida de ácido
N-β-maleimidopropiónico (BMPH), suberato de bis[sulfosuccinimidilo] (BS3), éster de [N-e-
maleimidocapropil]succinimida (EMCS), bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS) y formaldehído.
4. La estructura de red molecular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se añade una
35 subcapa que comprende albúmina a un sustrato, y la primera capa de captura se añade a la subcapa, y la segunda
capa de captura se añade a la primera capa de captura.
5. La estructura de red molecular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los agentes de
40 captura están configurados para unirse a múltiples epítomos, que incluyen proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a)
y ADN de CpG bacteriano.
6. La estructura de red molecular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la red molecular
está construida para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM).
- 45 7. La estructura de red molecular de cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6, donde:
- la base se selecciona del grupo que consiste en nitrocelulosa, sílice, agarosa, poliestireno y poliuretano.

FIGURA 1

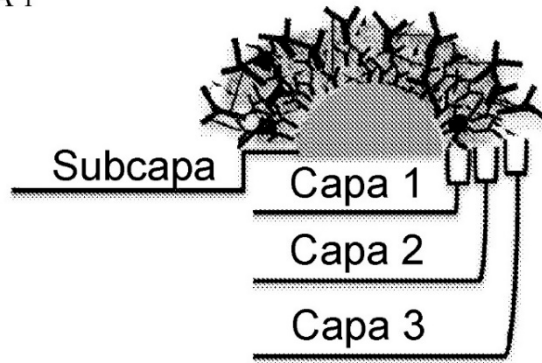
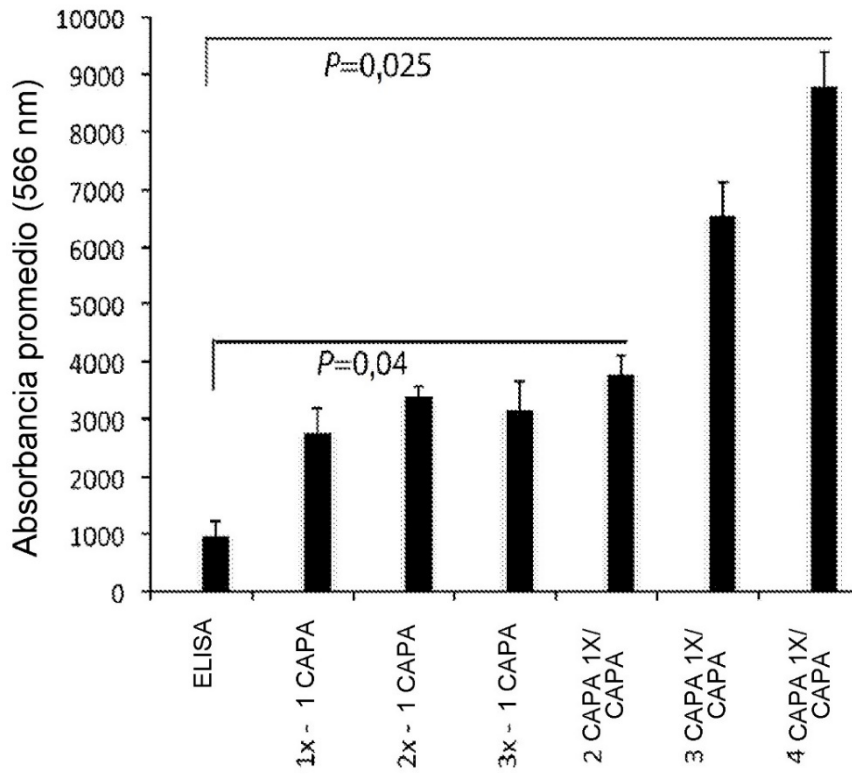


FIGURA 2



Número de capas	1	1	1	1	2	3	4
Agente de captura relativo usado por capa	1	1	2	3	1	1	1
Agente de captura relativo total usado	1	1	2	3	2	3	4

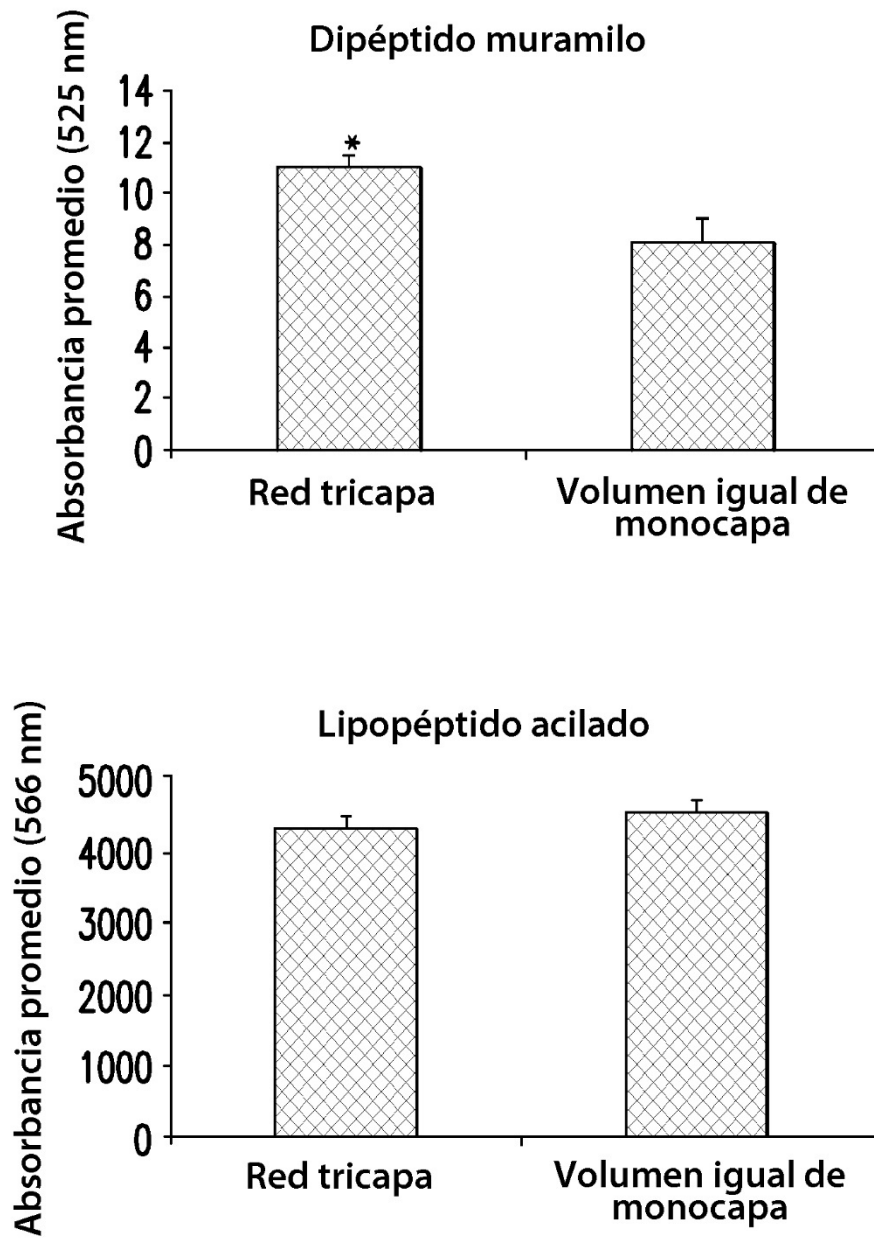


FIG.3

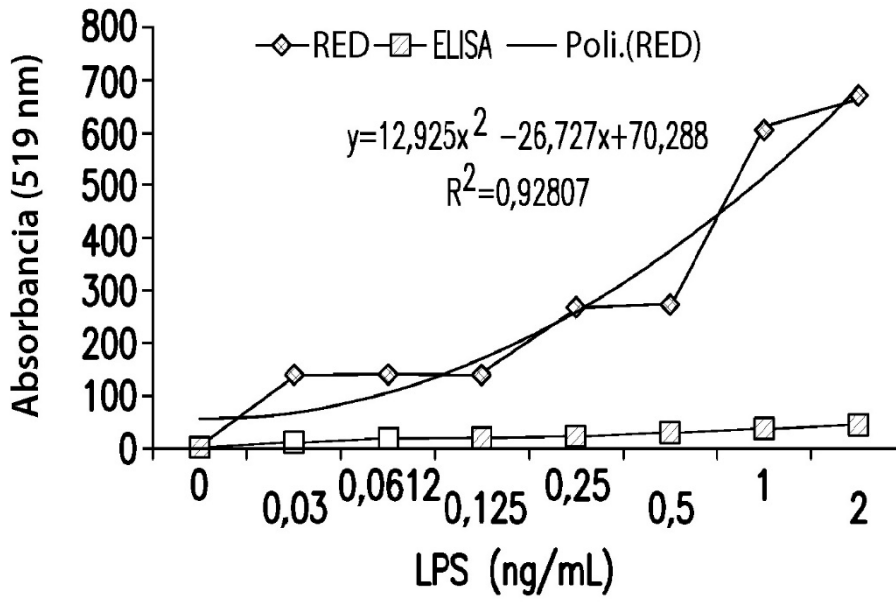


FIG.4A

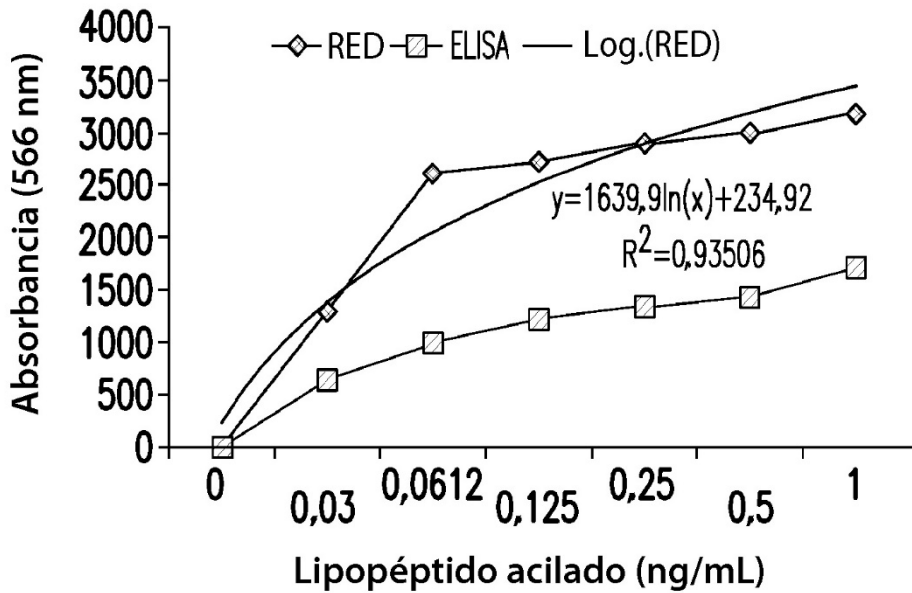


FIG.4B

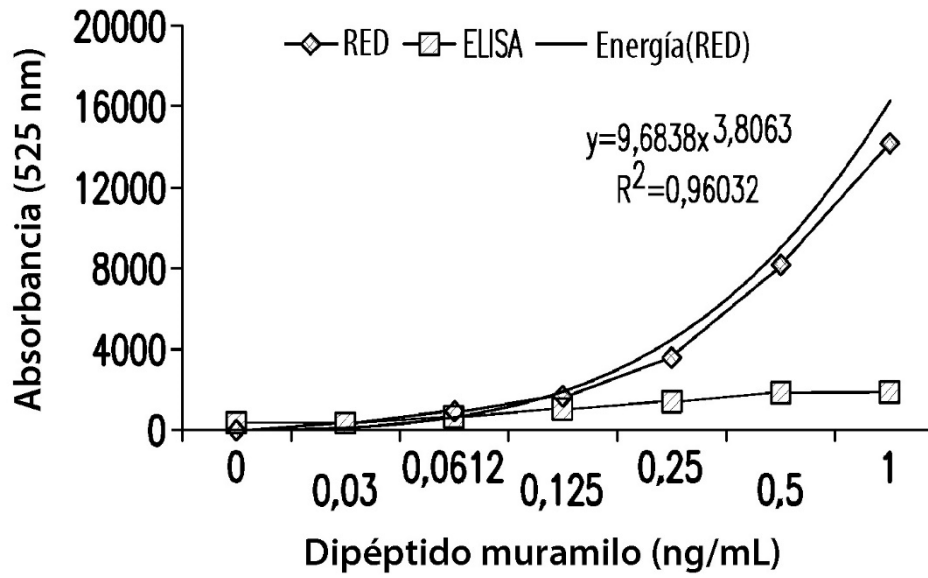


FIG.4C

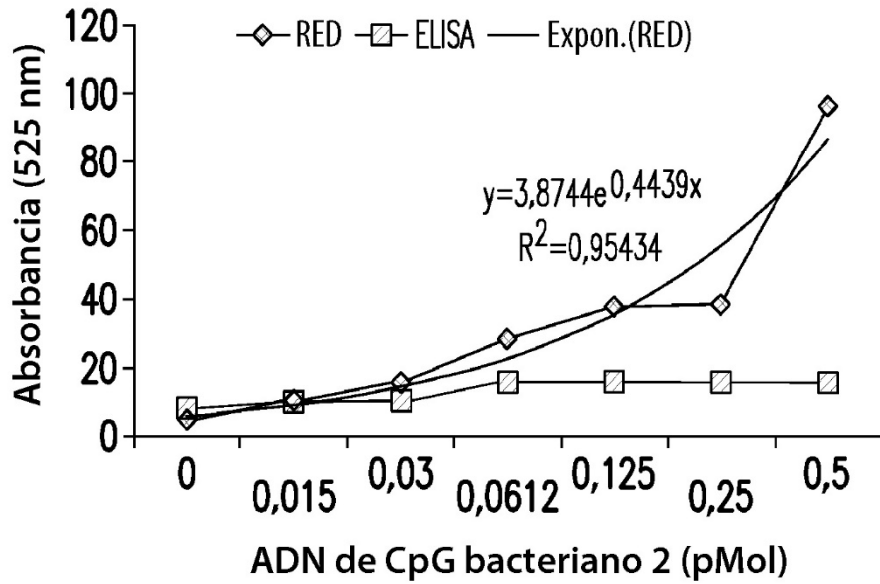


FIG.4D

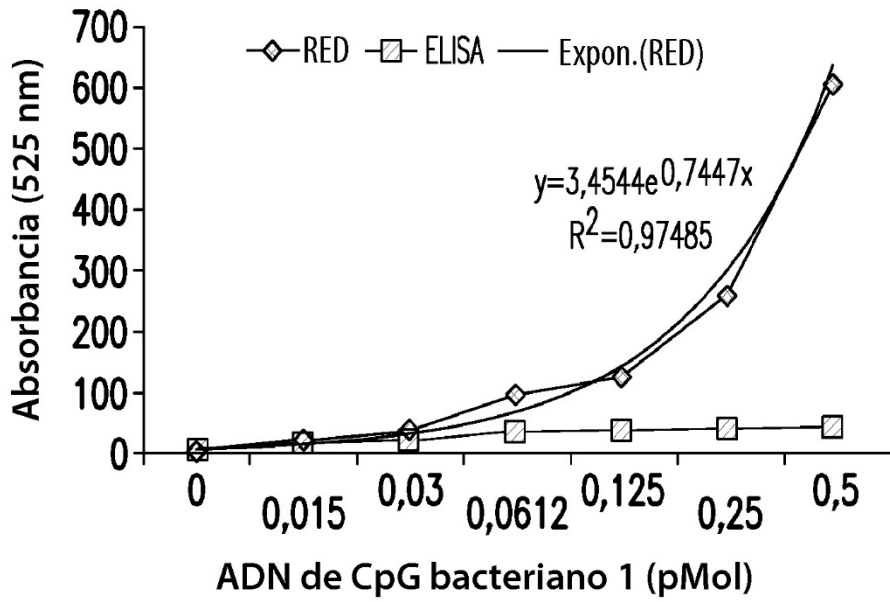


FIG.4E

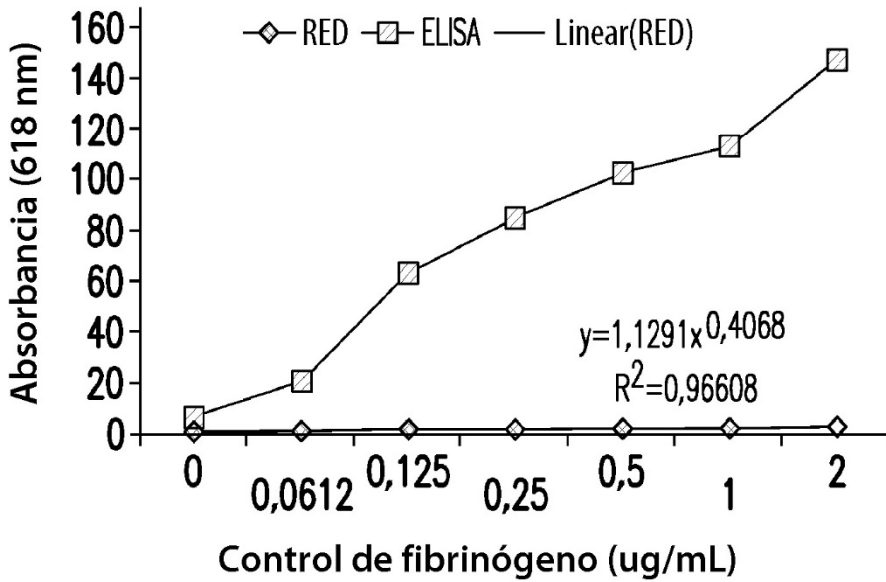


FIG.4F

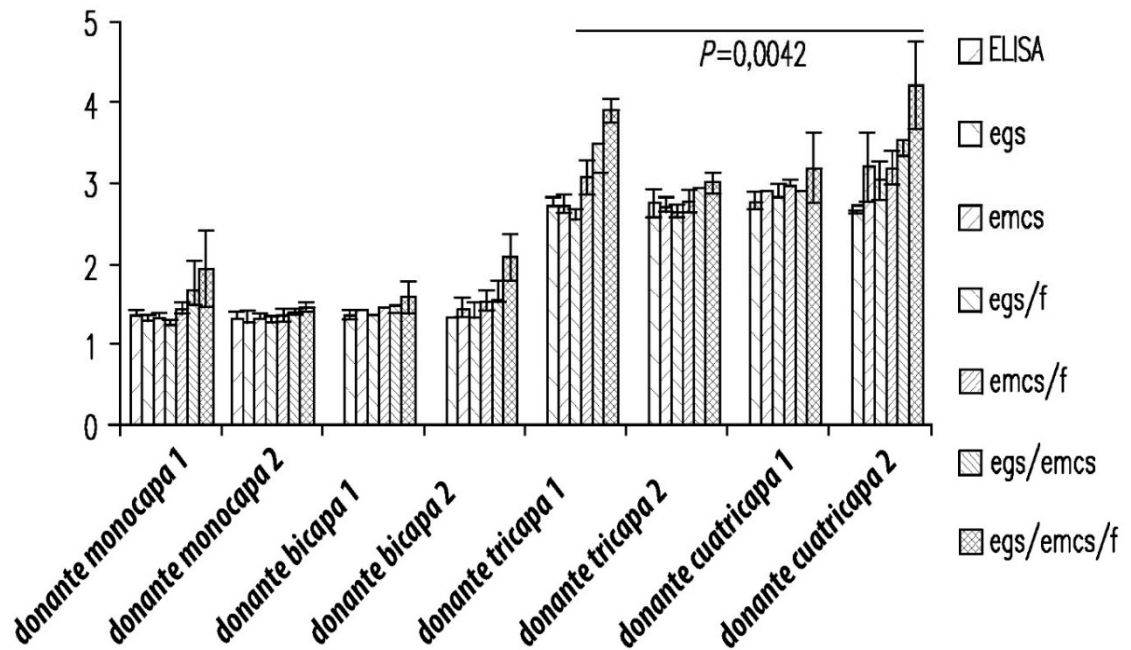
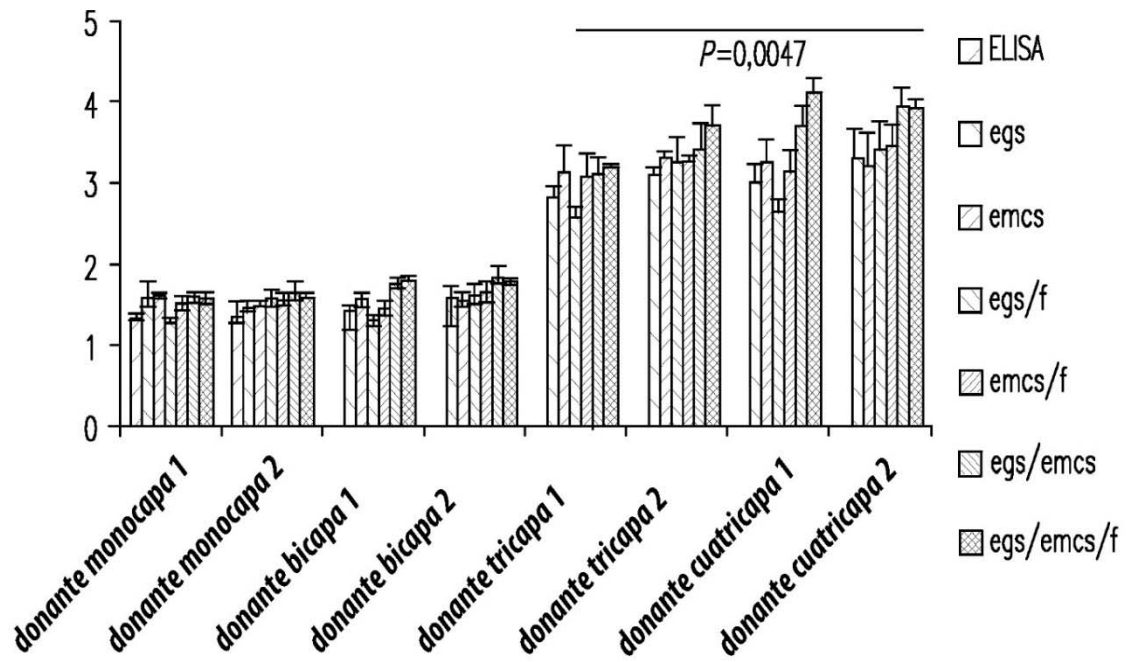


FIG.5

FIGURA 6

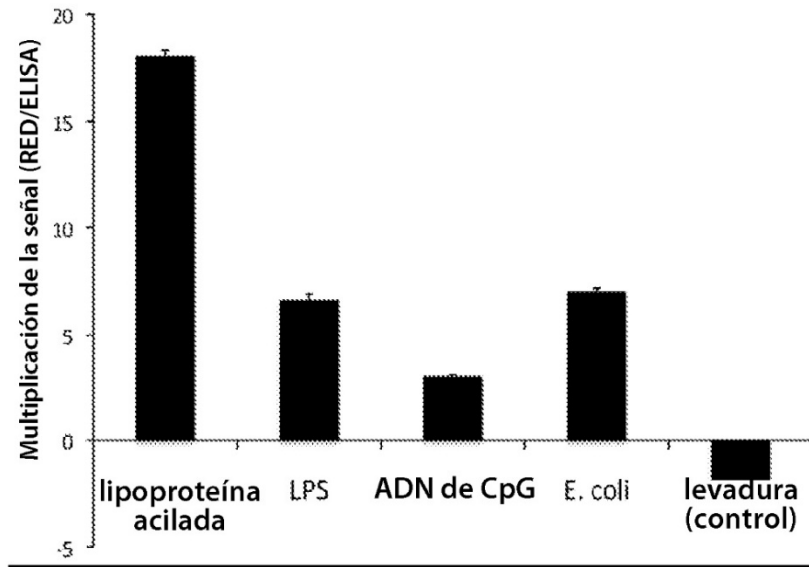
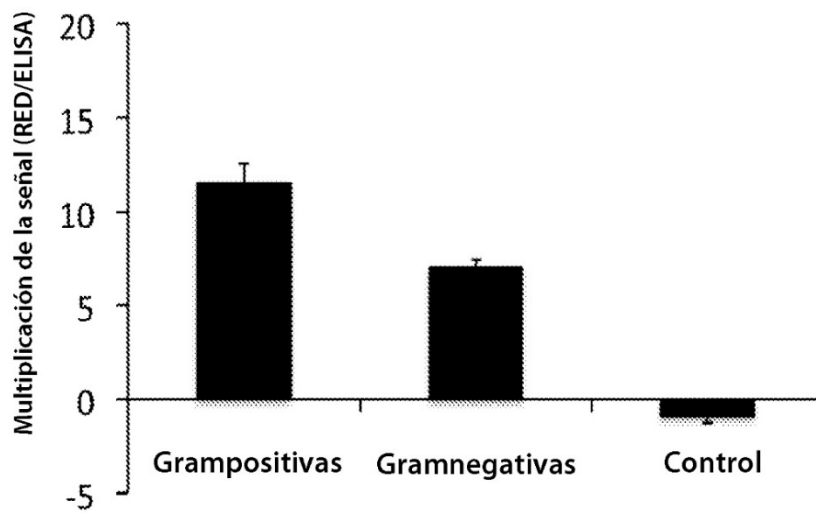
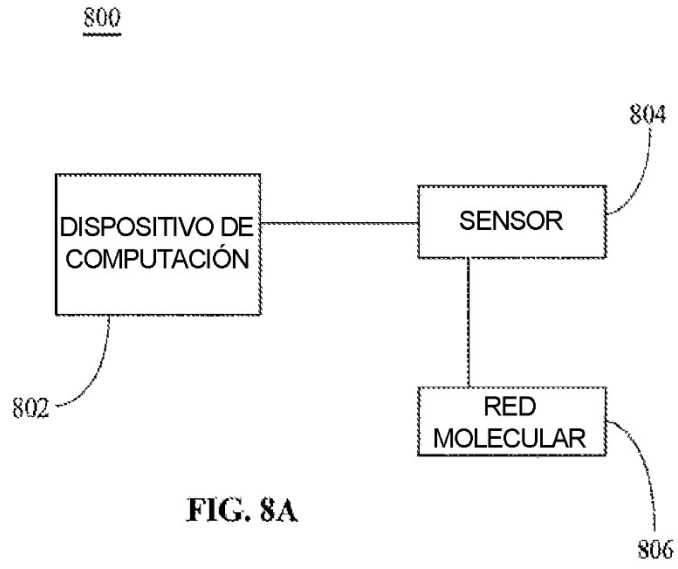


FIGURA 7





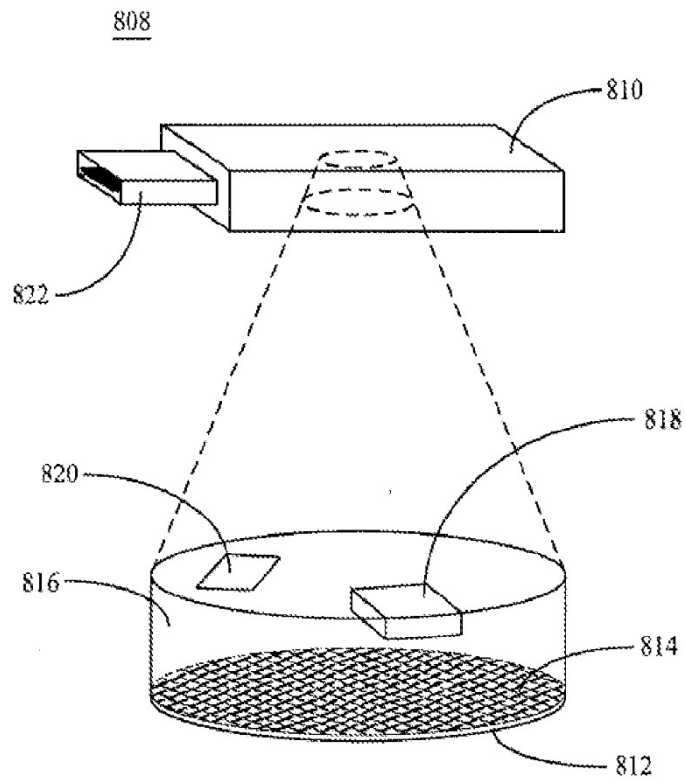


FIG. 8B

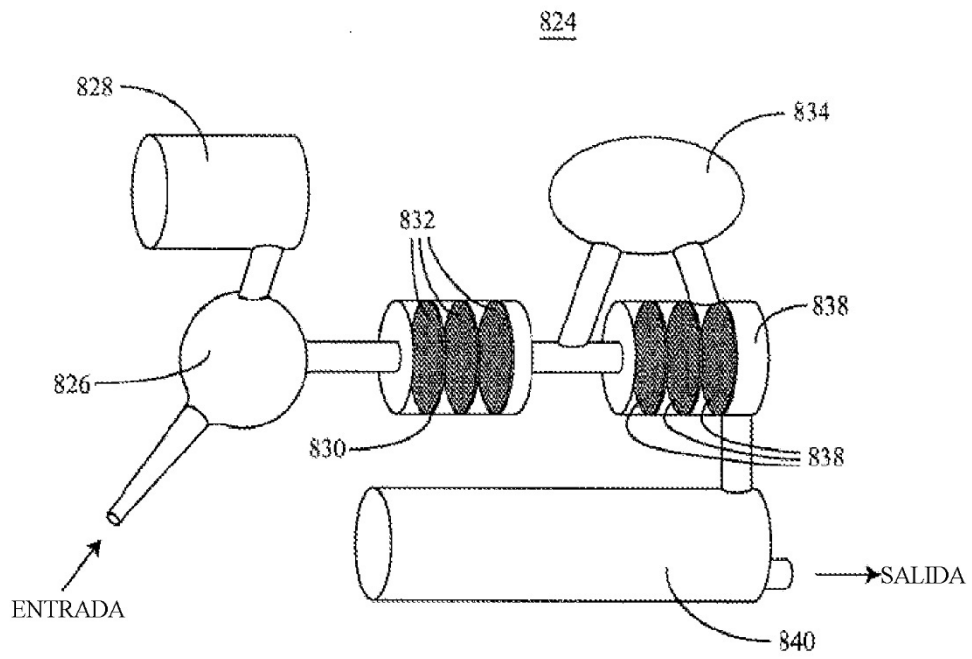


FIG. 8C

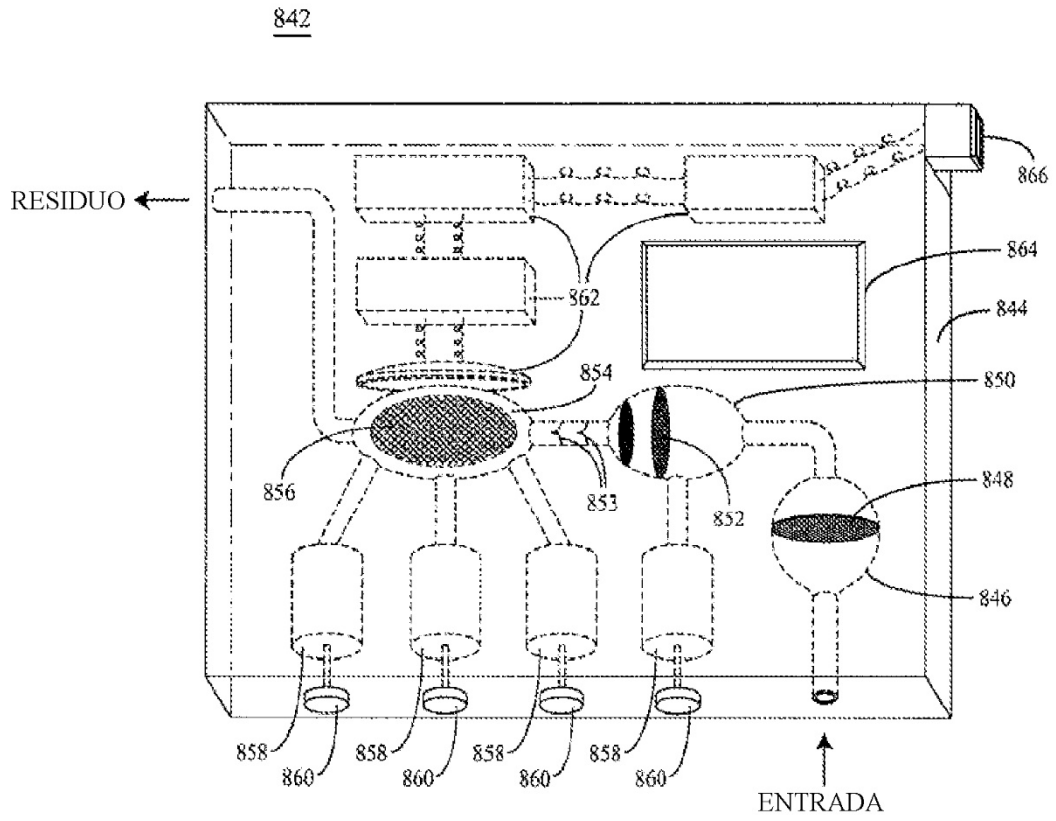


FIG. 8D

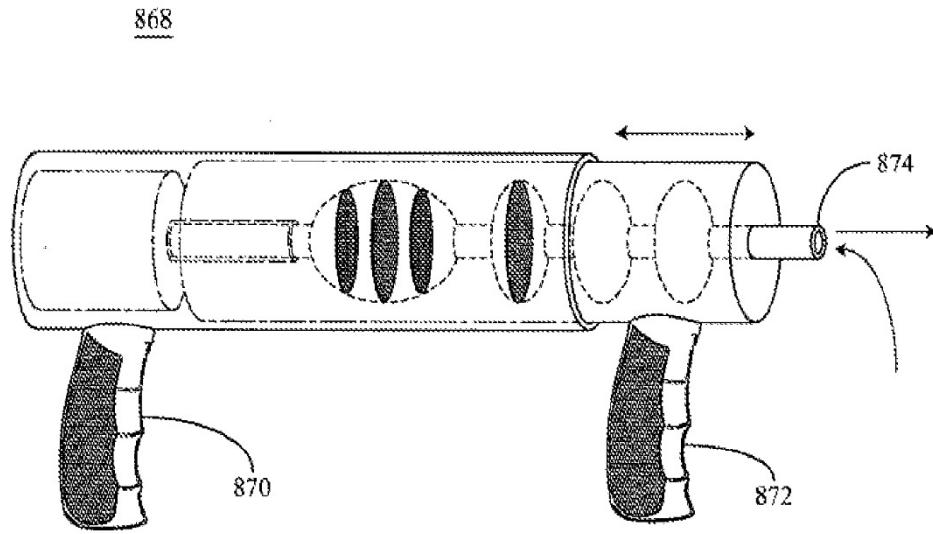


FIG. 8E

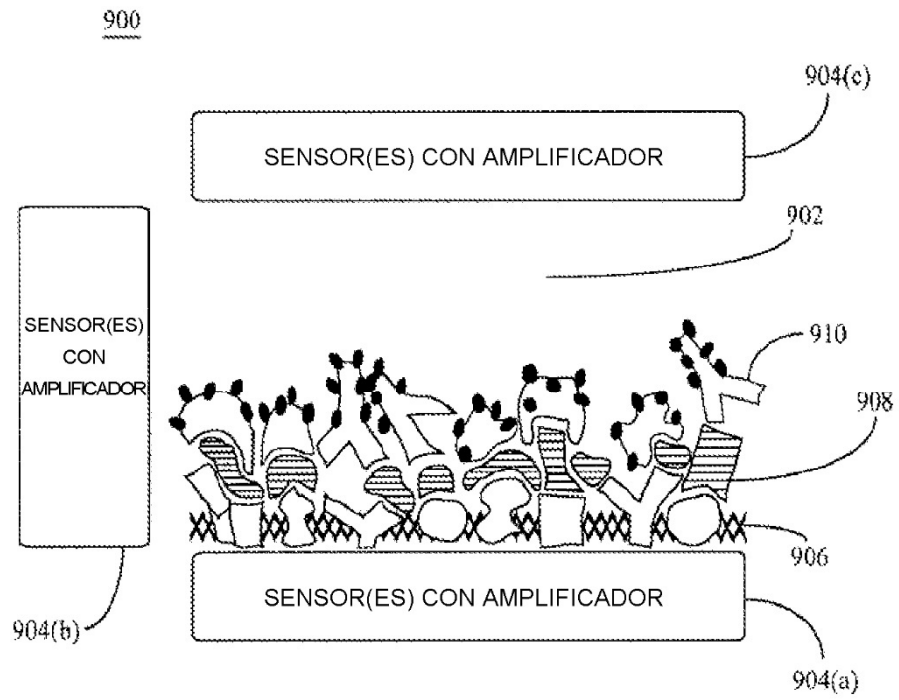


FIG. 9A

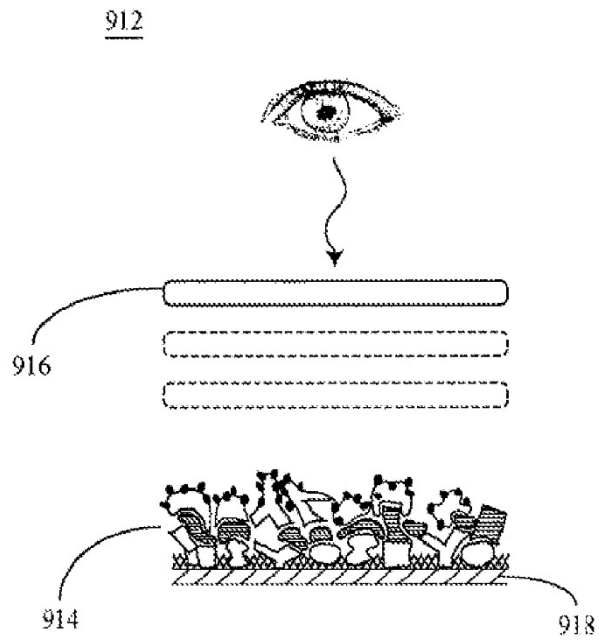


FIG. 9B

920

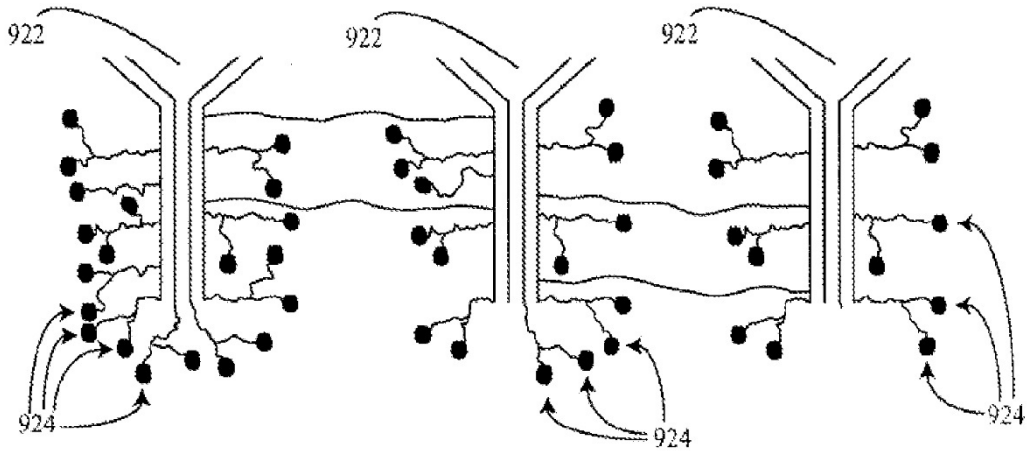


FIG. 9C

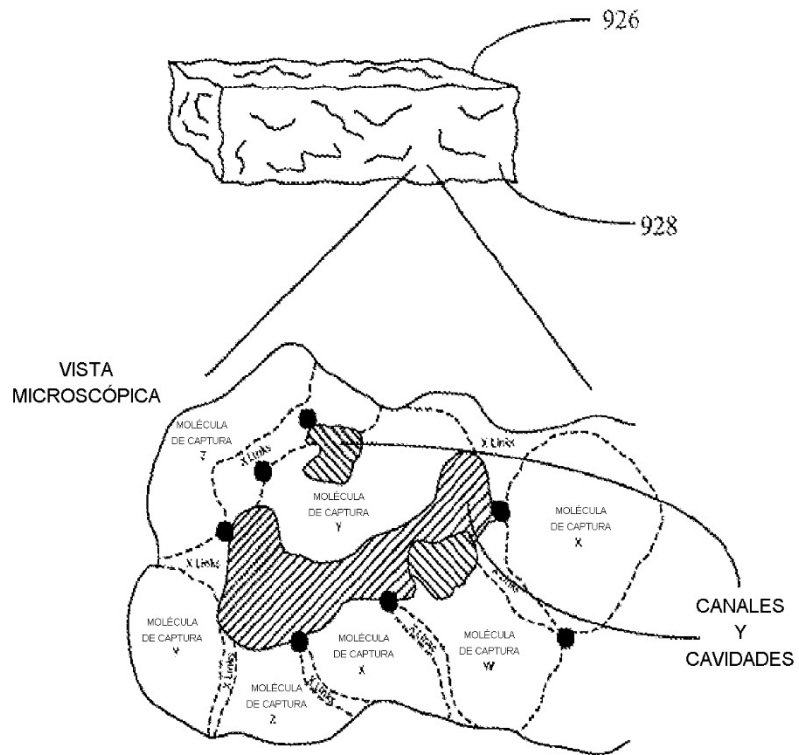


FIG. 9D

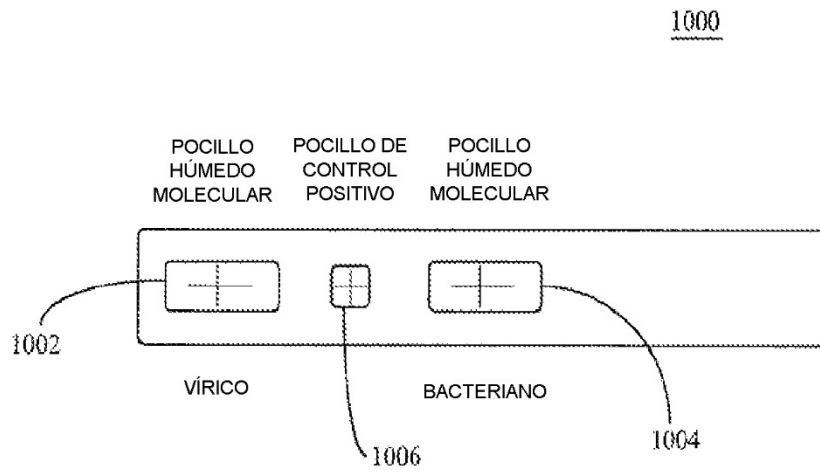


FIG. 10A

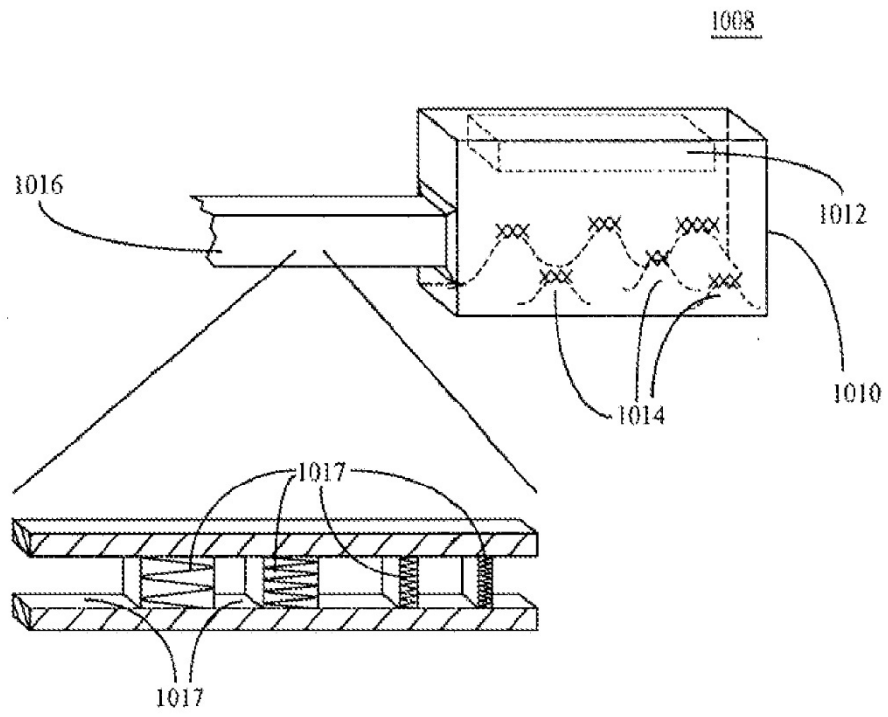


FIG. 10B

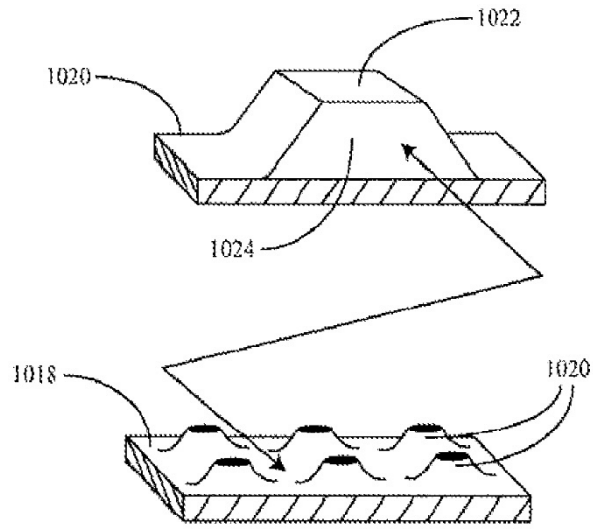


FIG. 10C

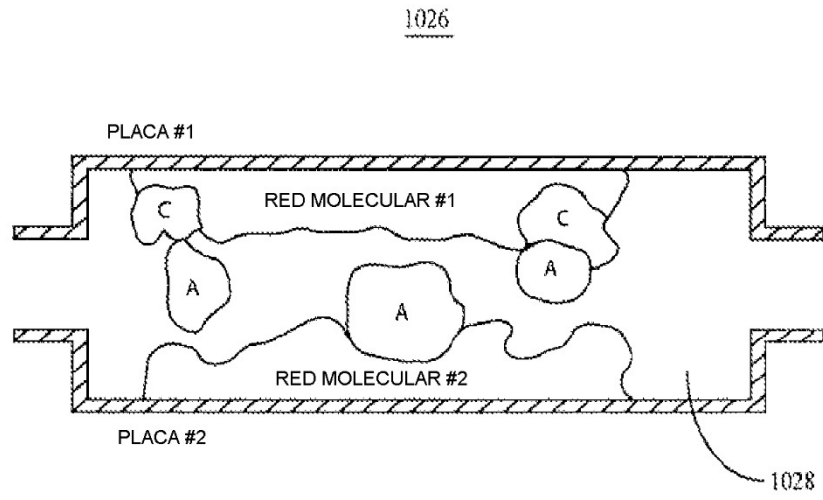


FIG. 10D

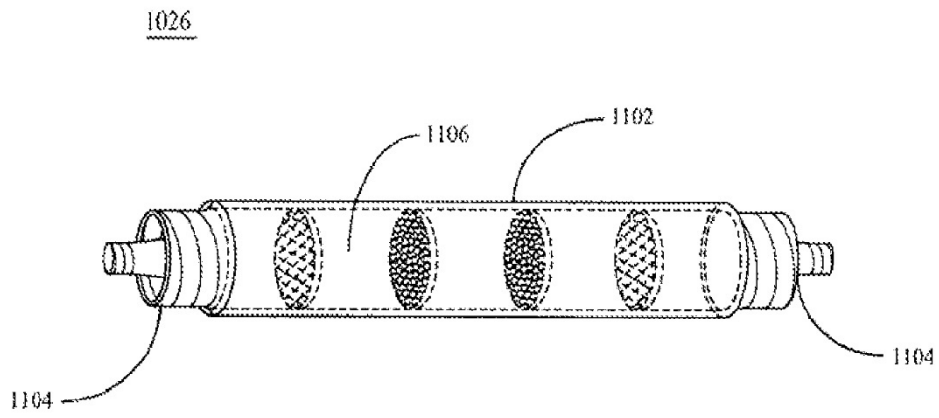


FIG. 11A

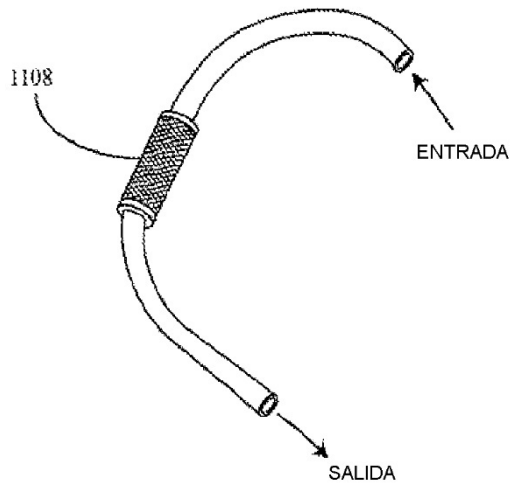


FIG. 11B

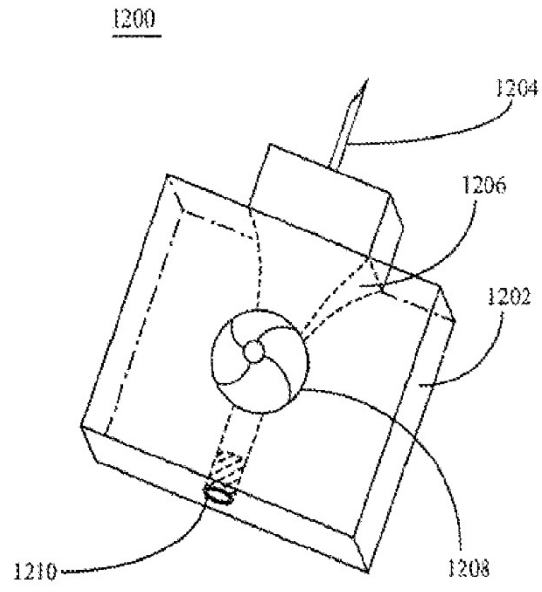


FIG. 12

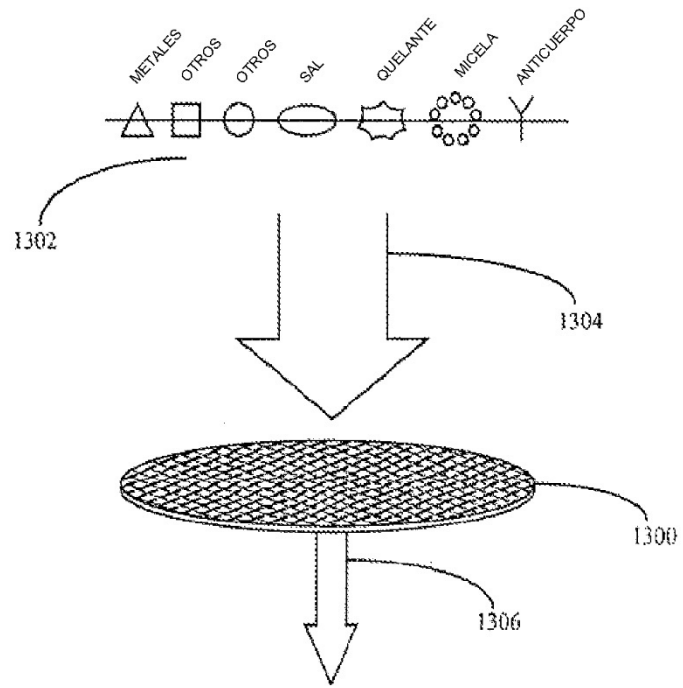


FIG. 13A

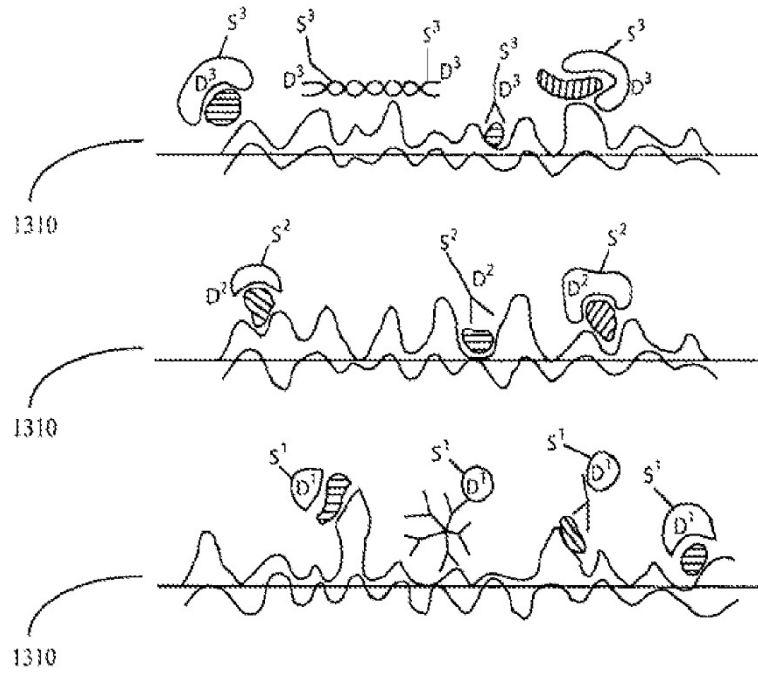
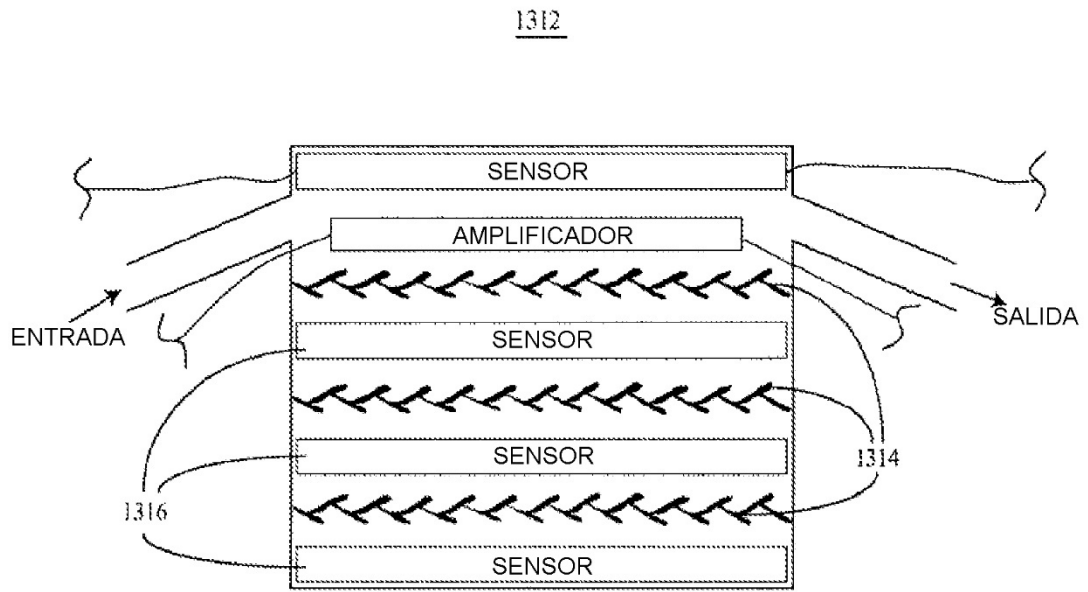


FIG. 13B



1400

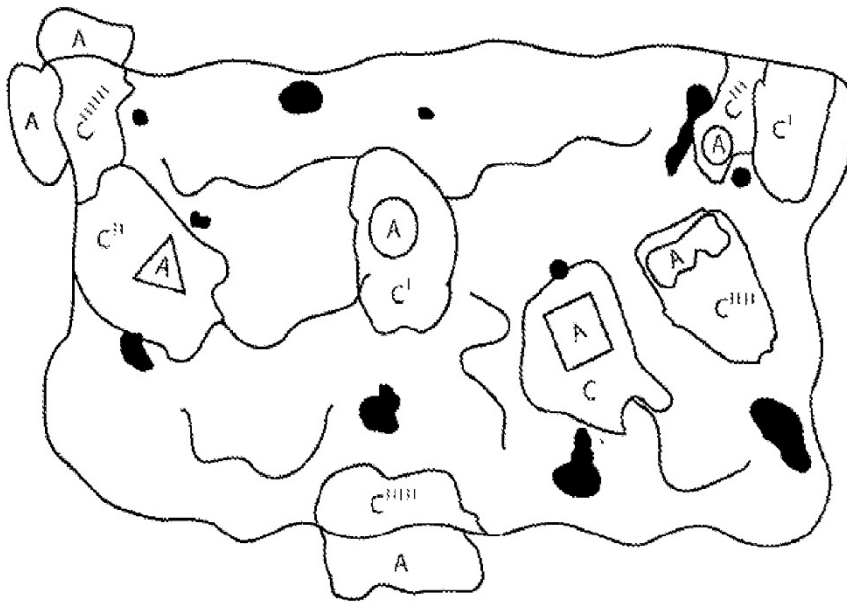


FIG. 14A

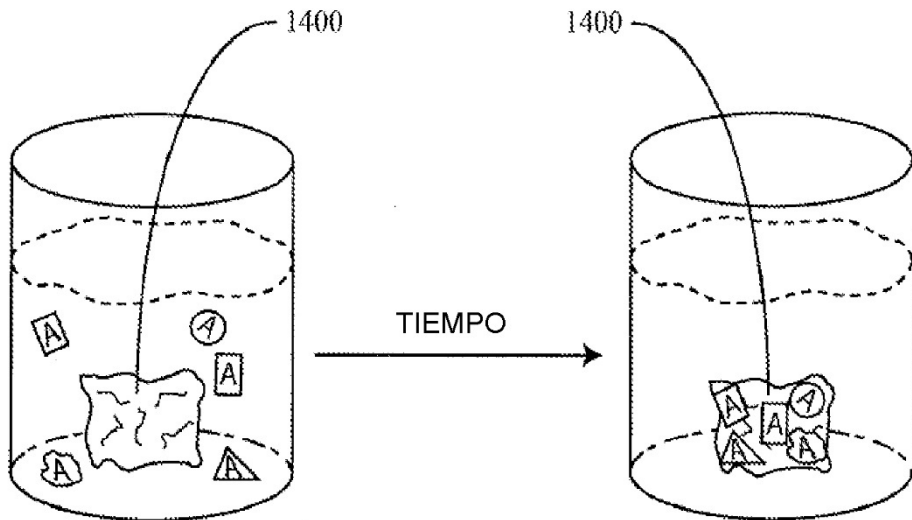


FIG. 14B

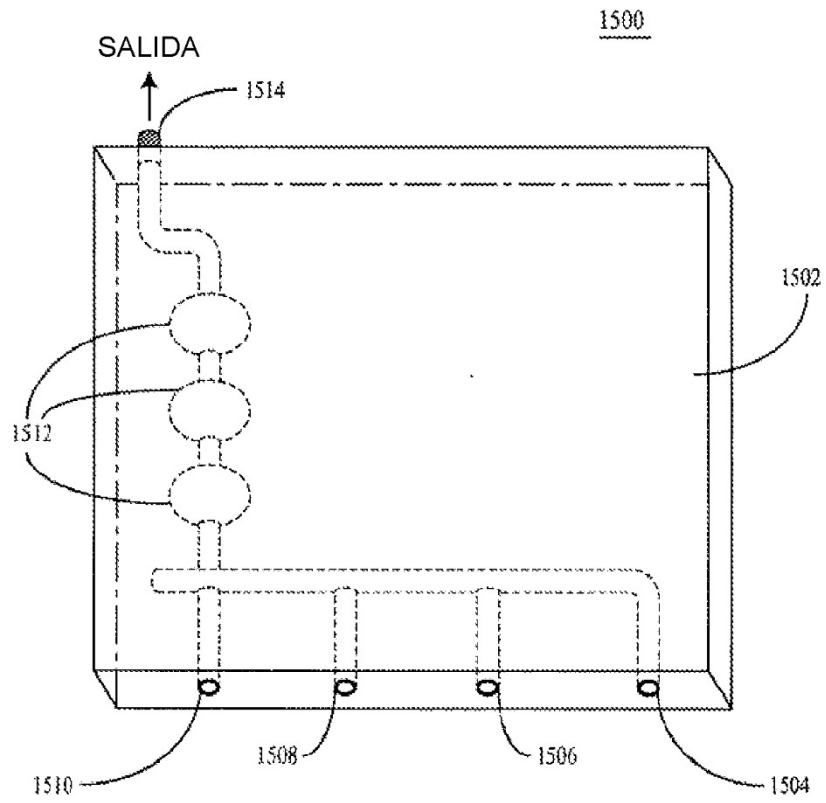


FIG. 15A

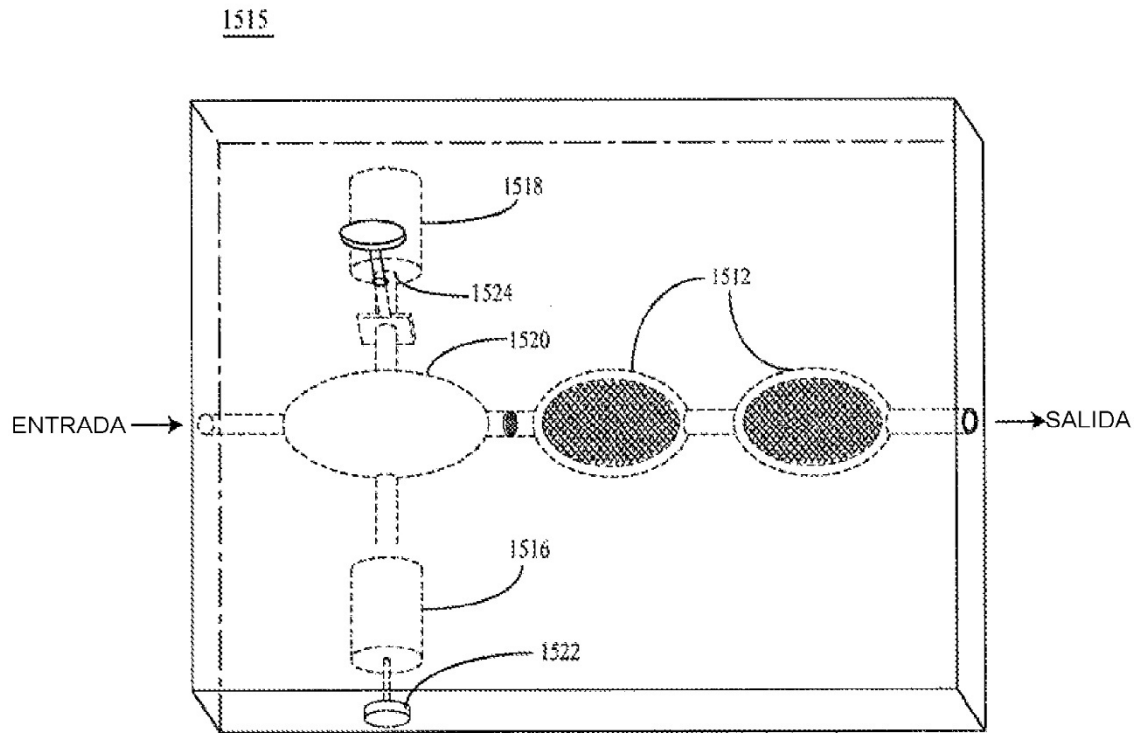
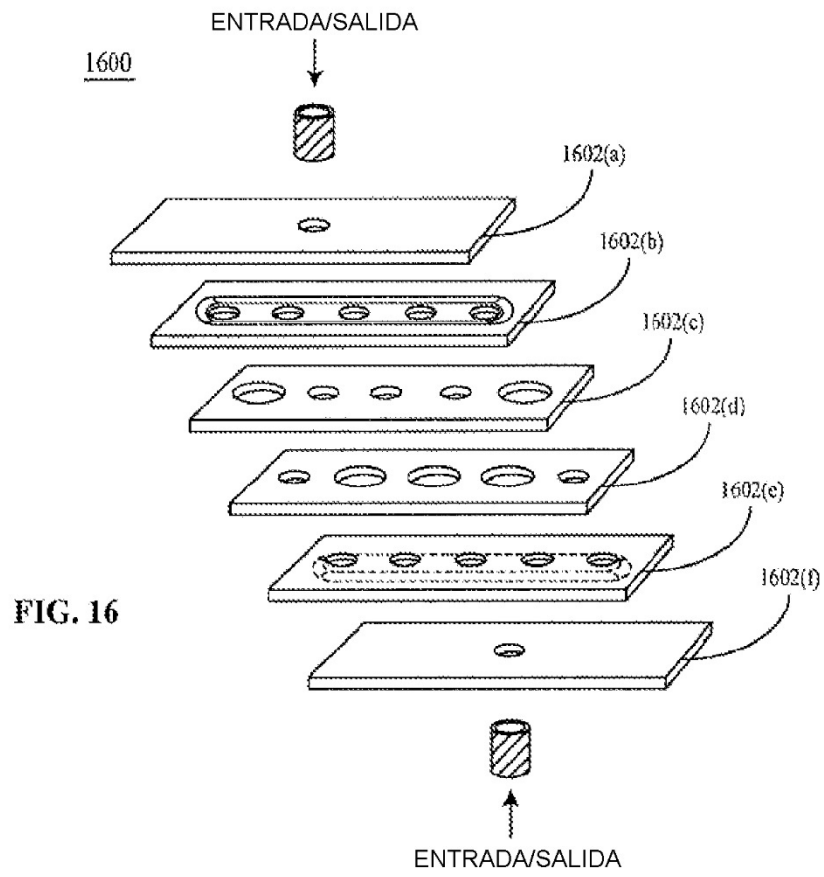


FIG. 15B



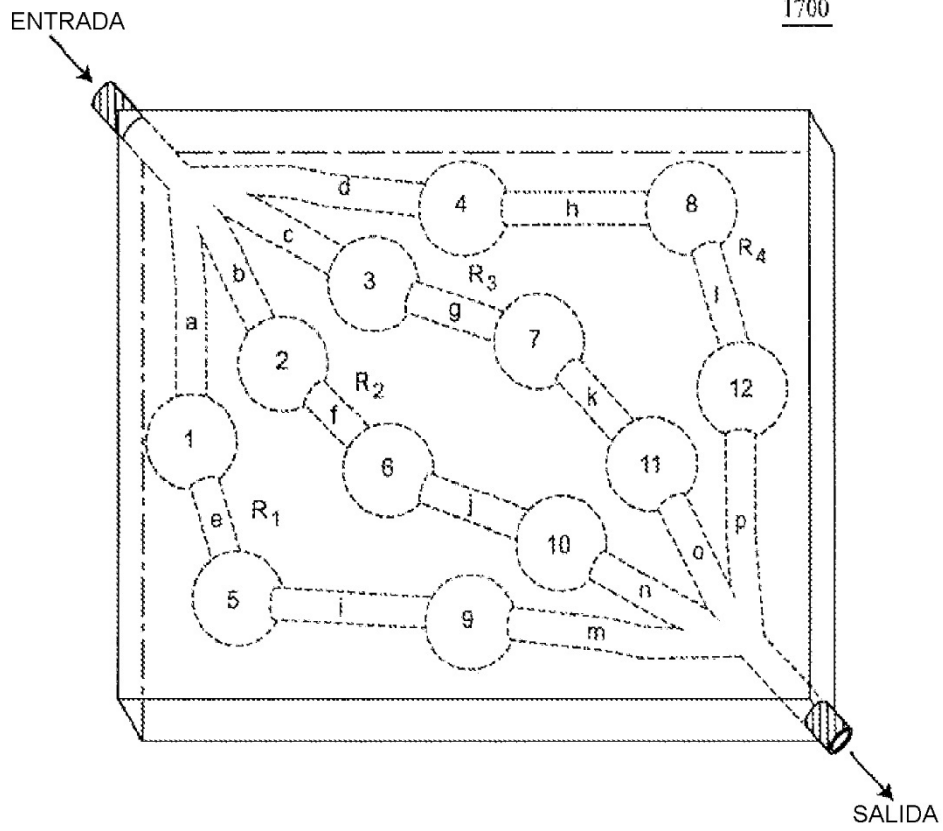
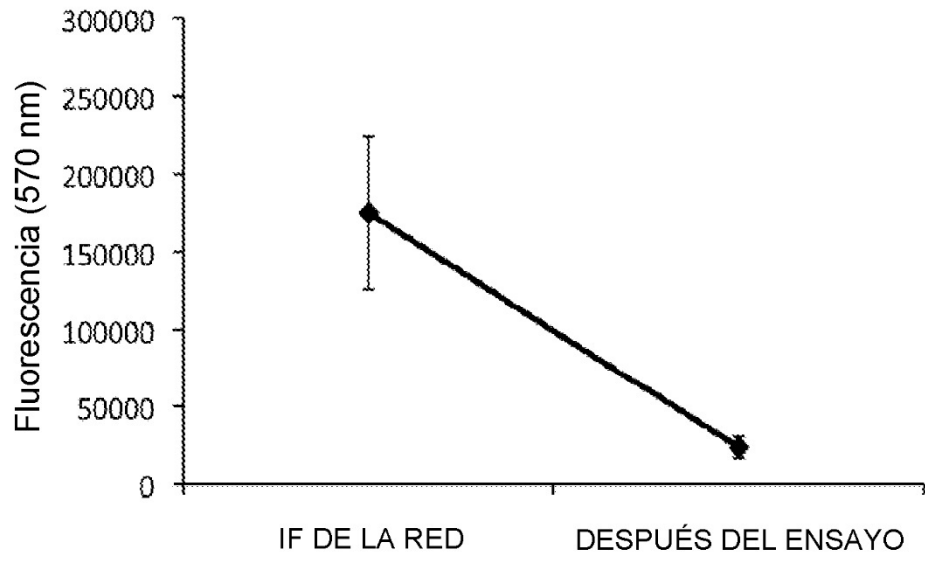
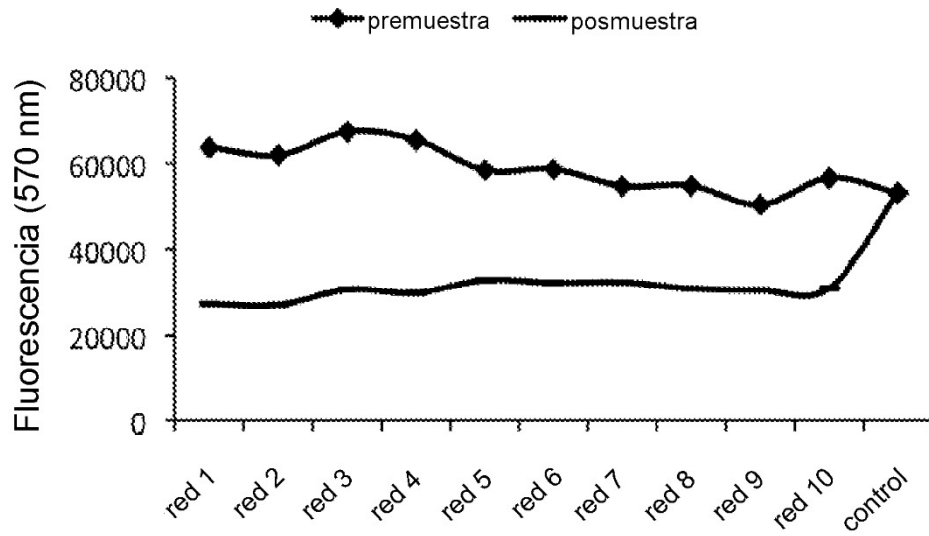


FIG. 17



Fluorescencia de la red antes y después del ensayo de unión de analitos

FIG. 18



Redes de Staphylococcus aureus marcadas con rodamina

FIG. 19

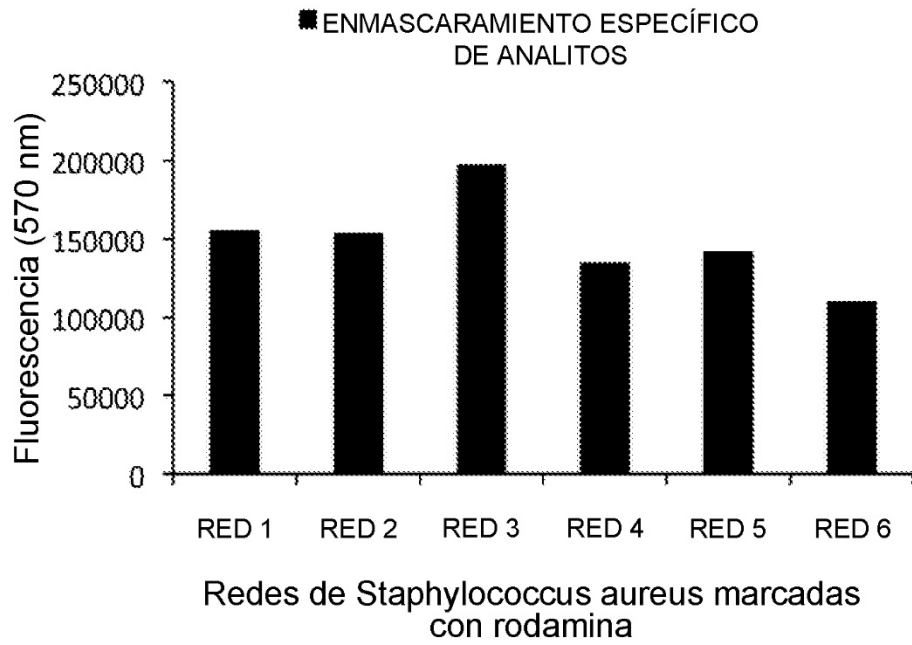


FIG. 20

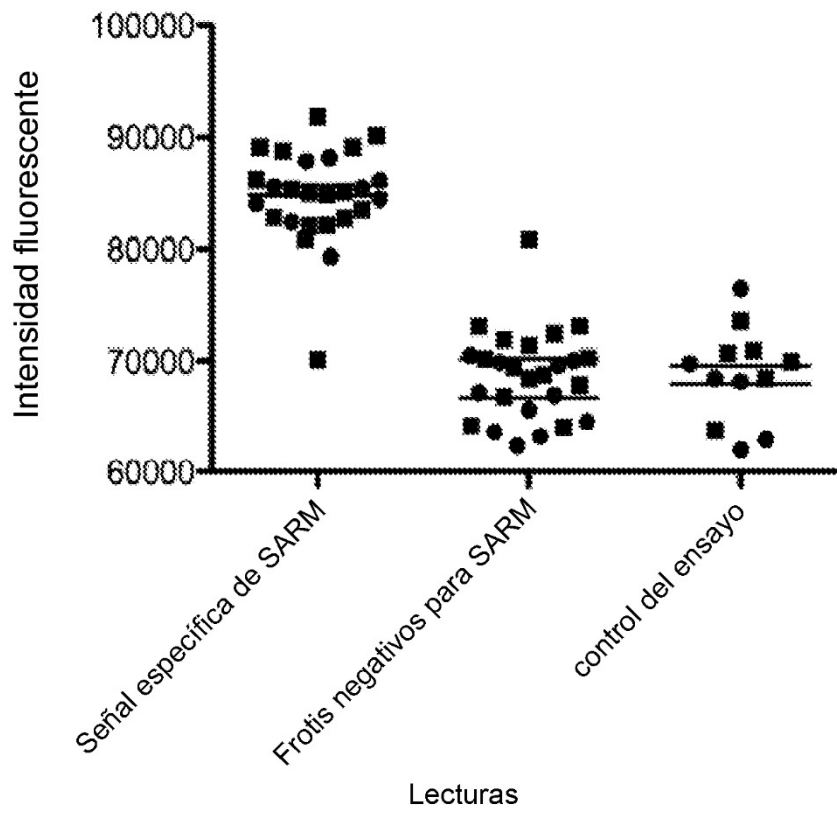


FIG. 21

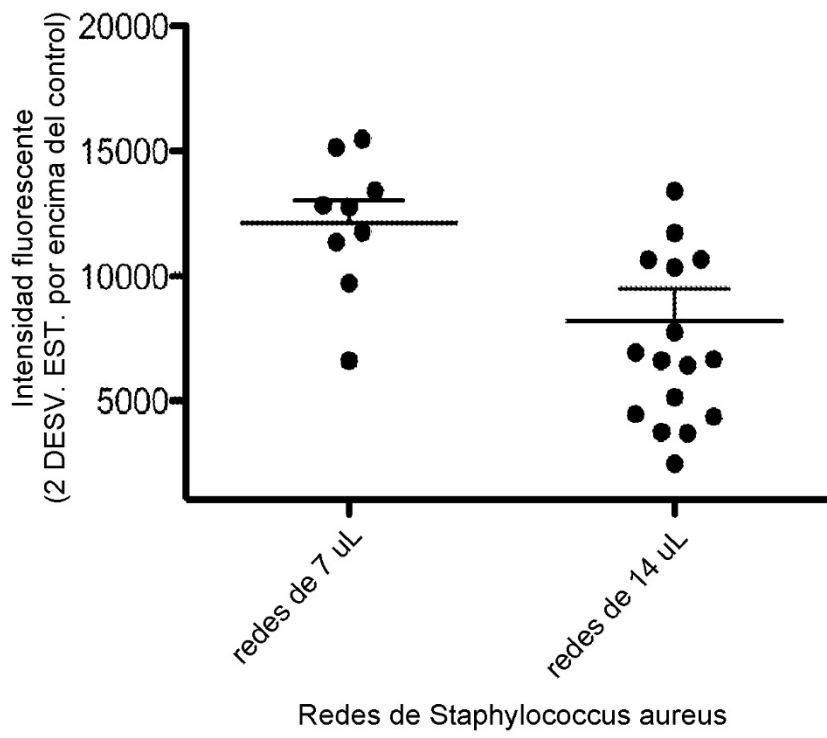


FIG. 22

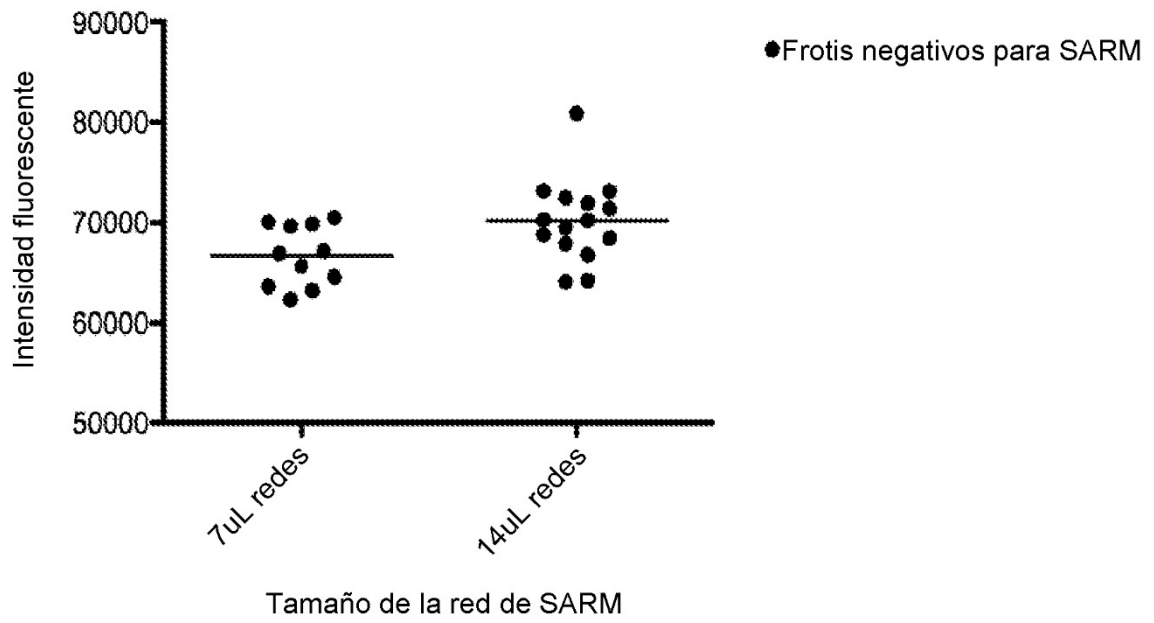


FIG. 23

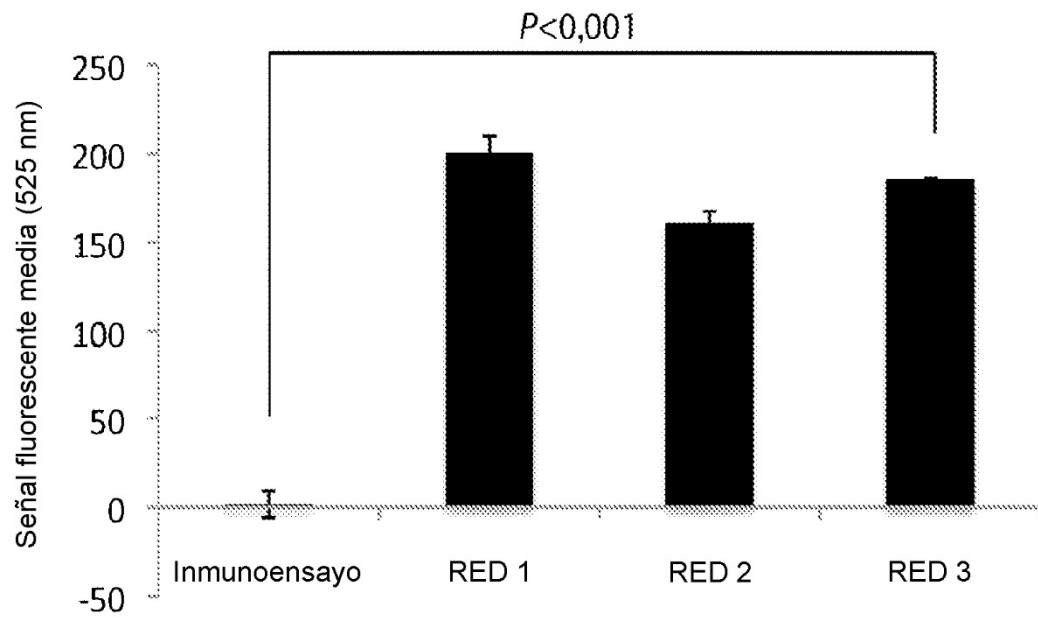


FIG. 24

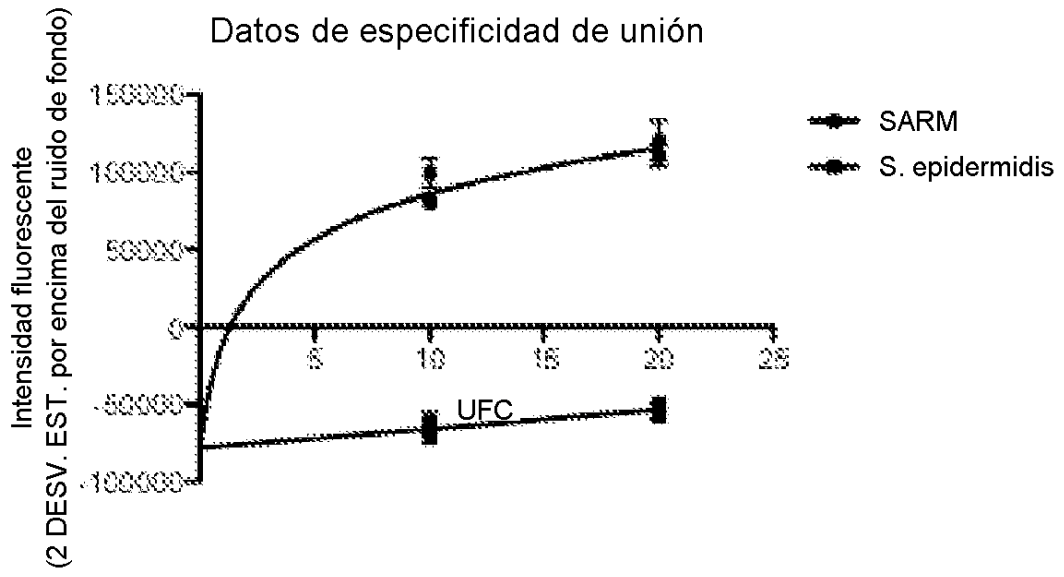


FIG. 26

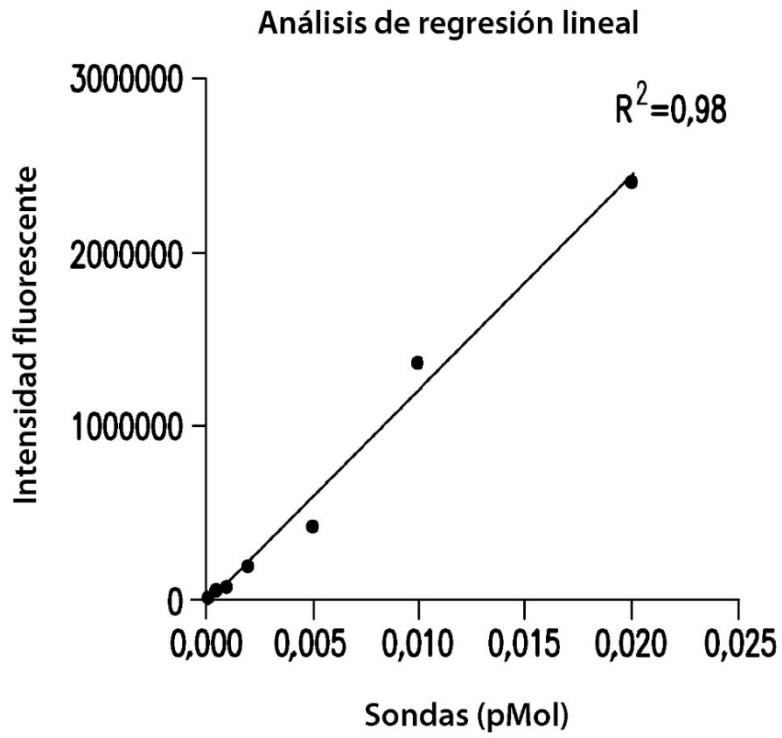


FIG.27A

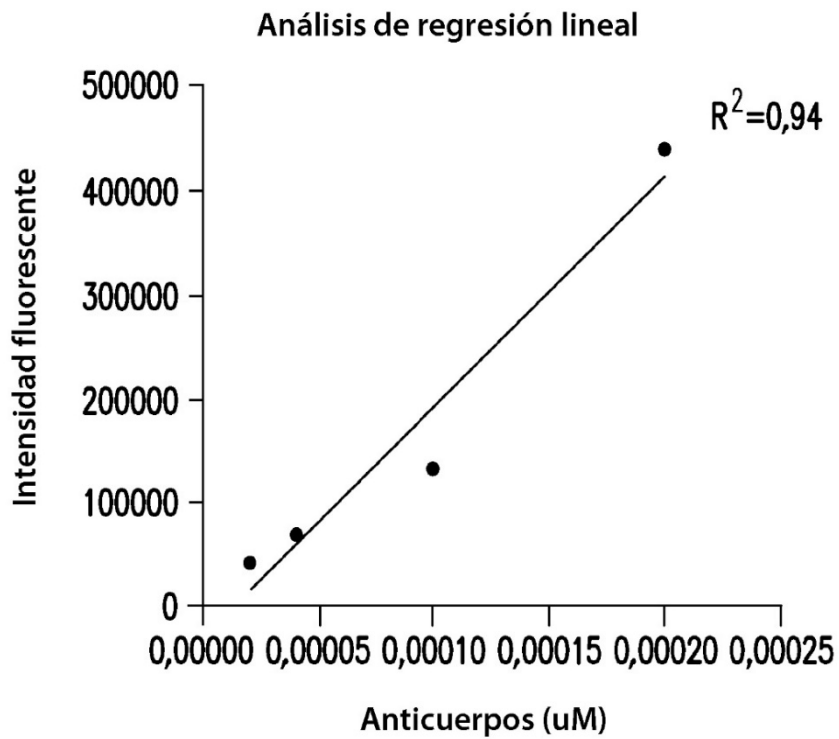


FIG.27B

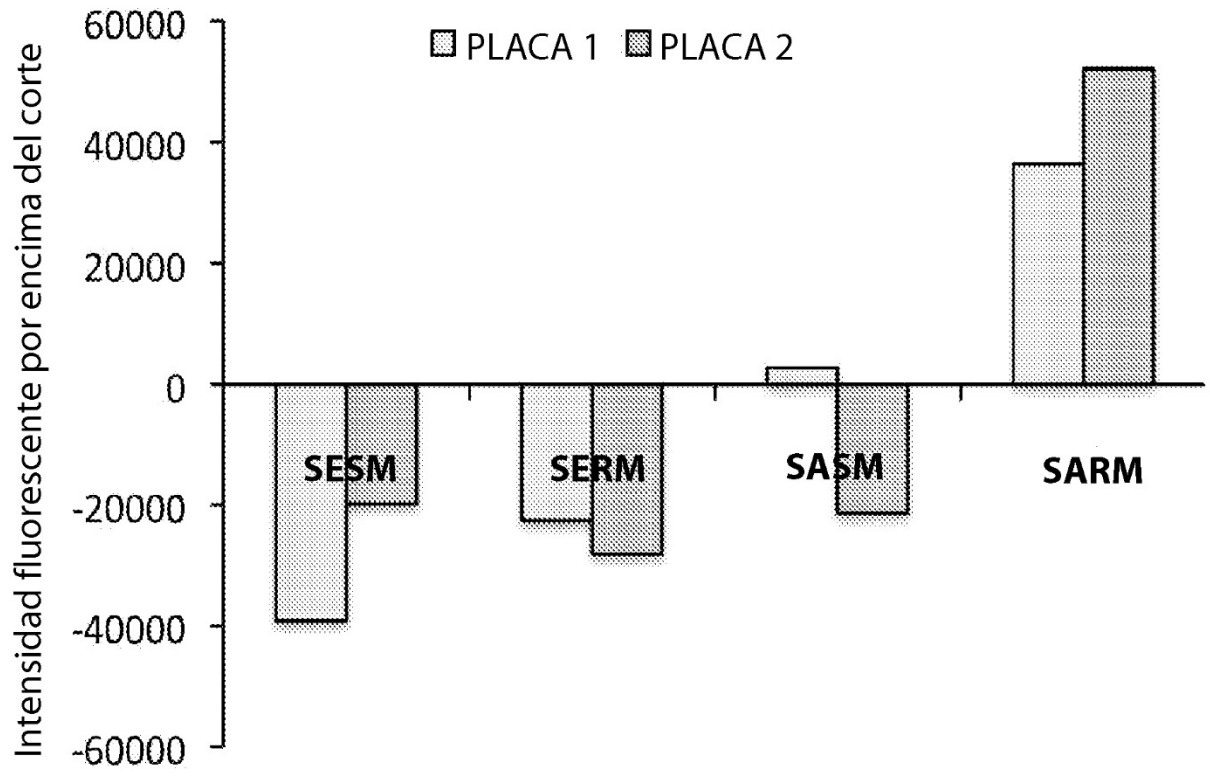


FIG. 28

Datos de la curva ROC: Curva ROC

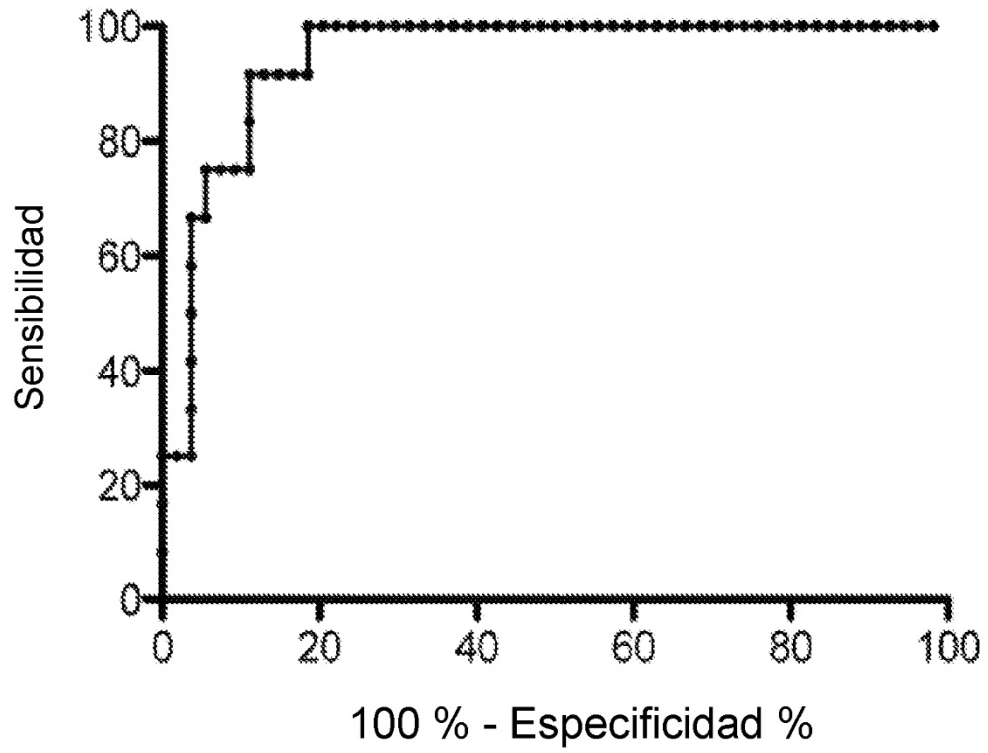
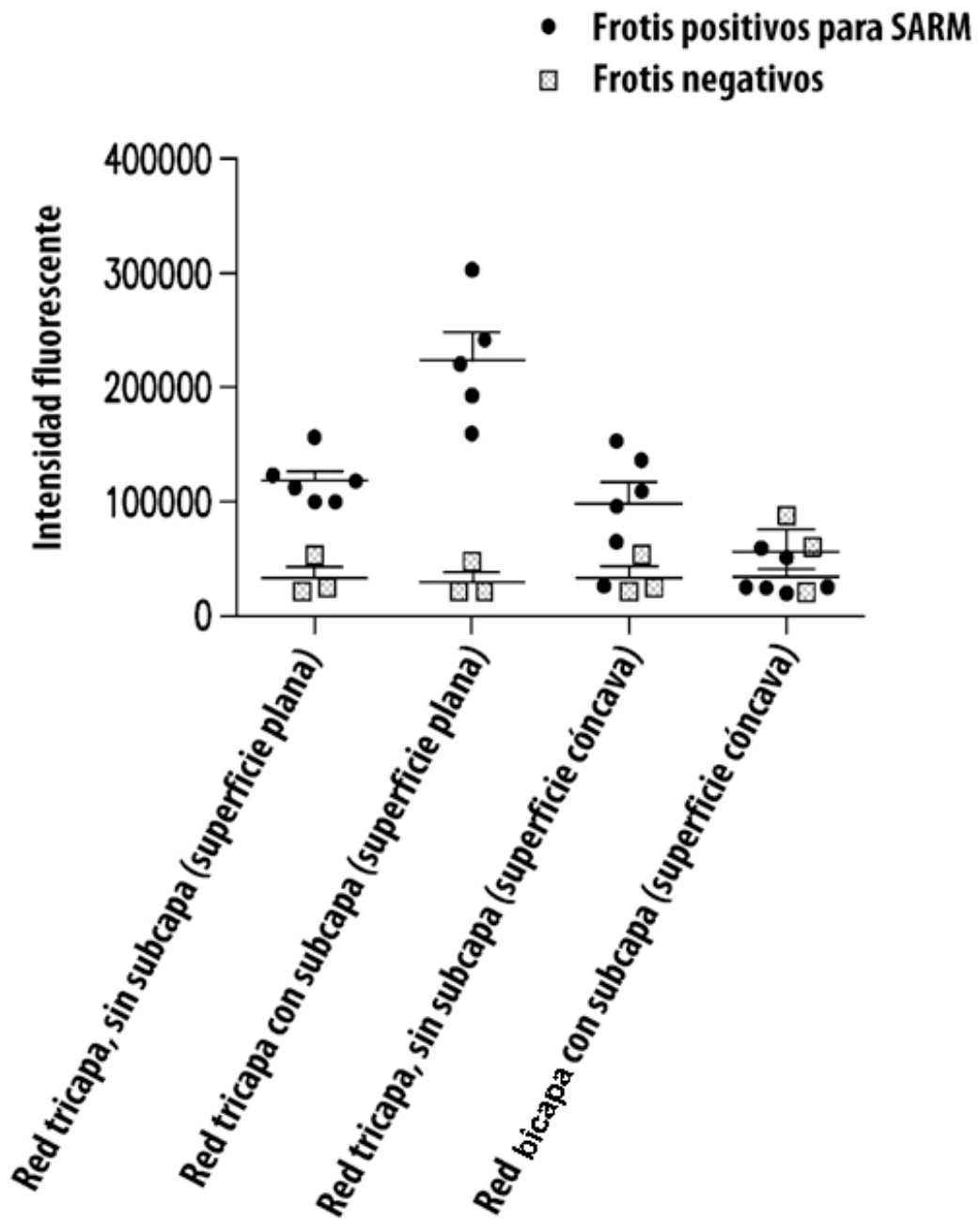
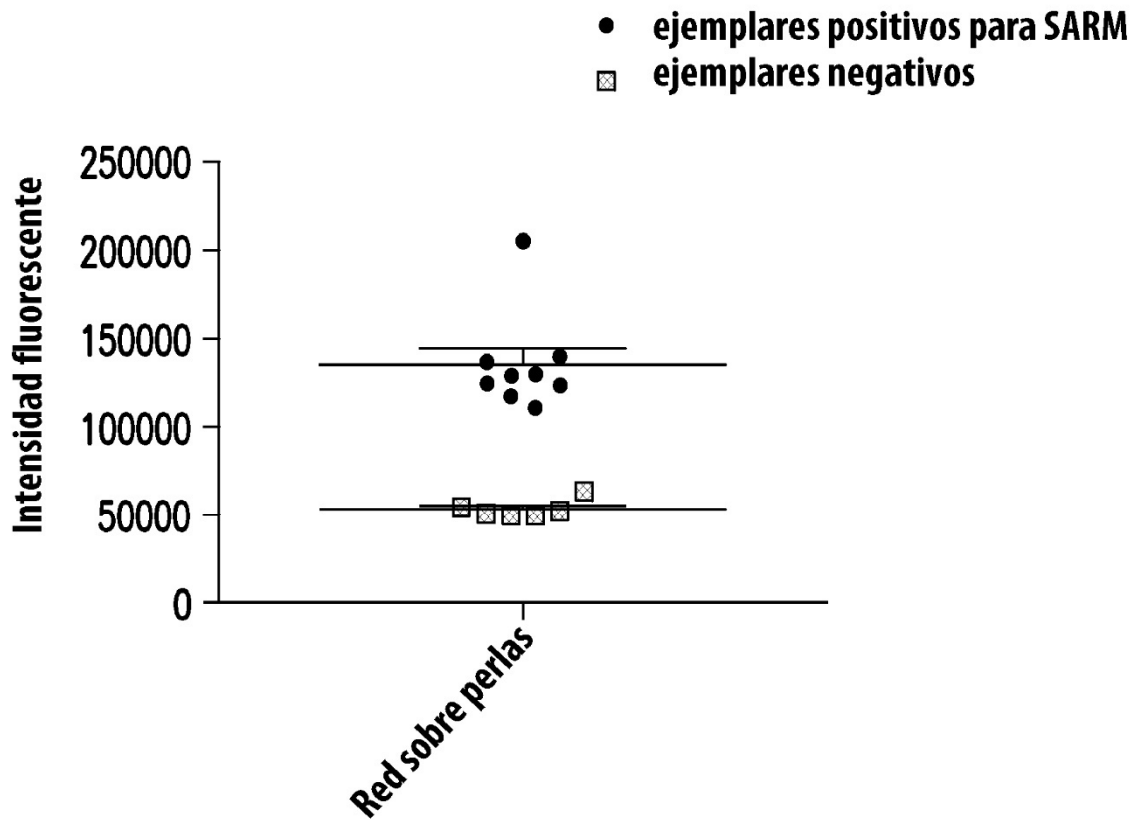


FIG. 29



Configuración de la red sobre diferentes superficies

FIG.30



Configuración de la red sobre una superficie convexa

FIG.31

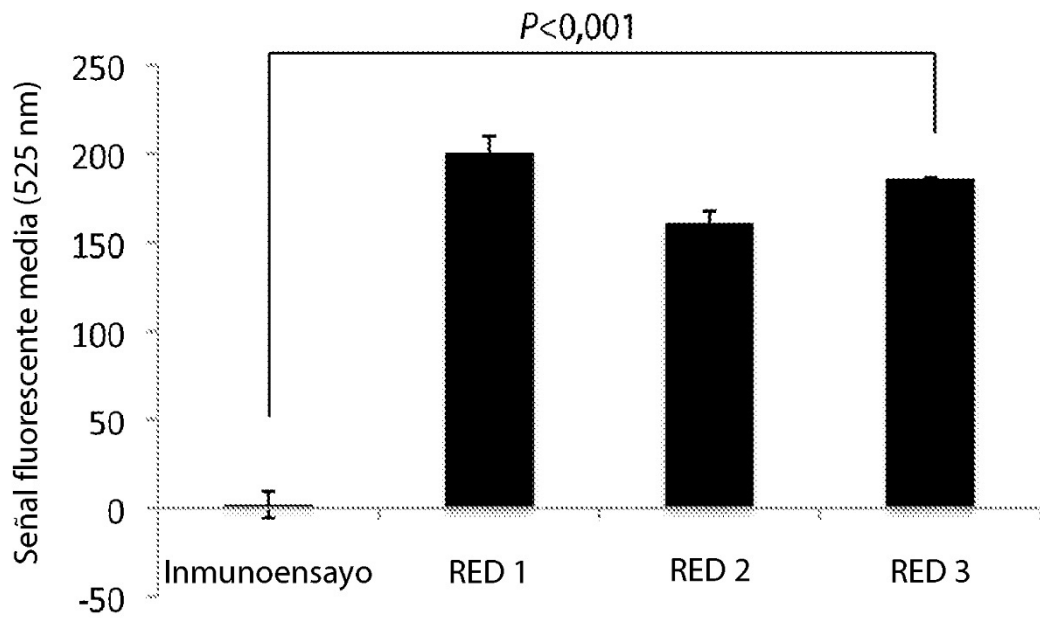
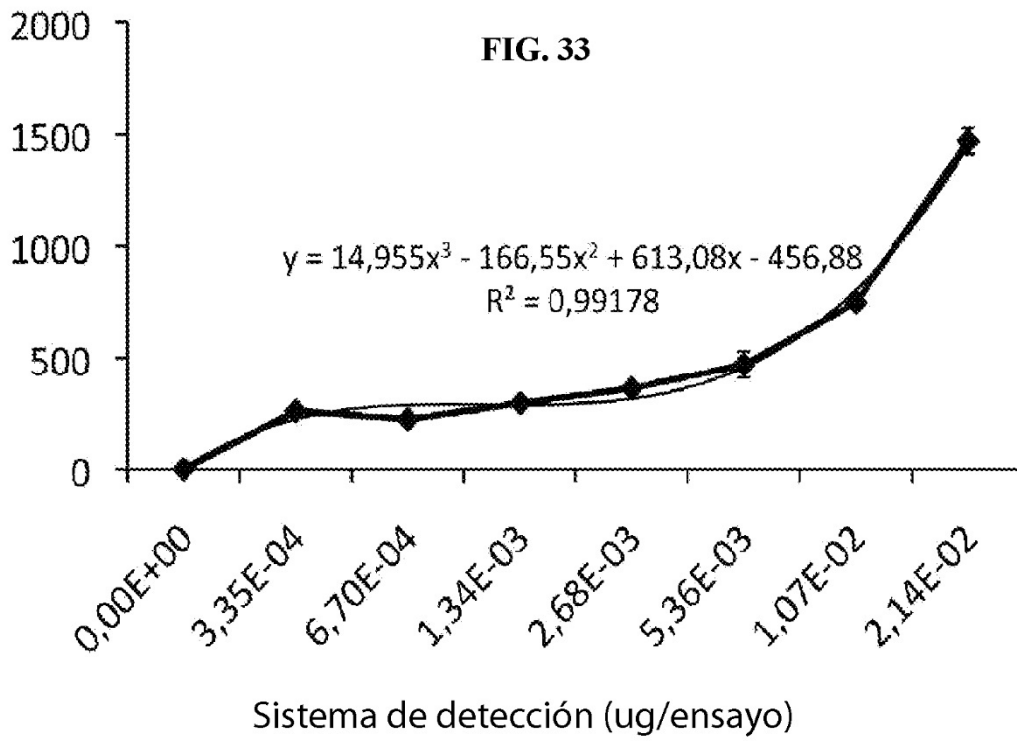


FIG. 32



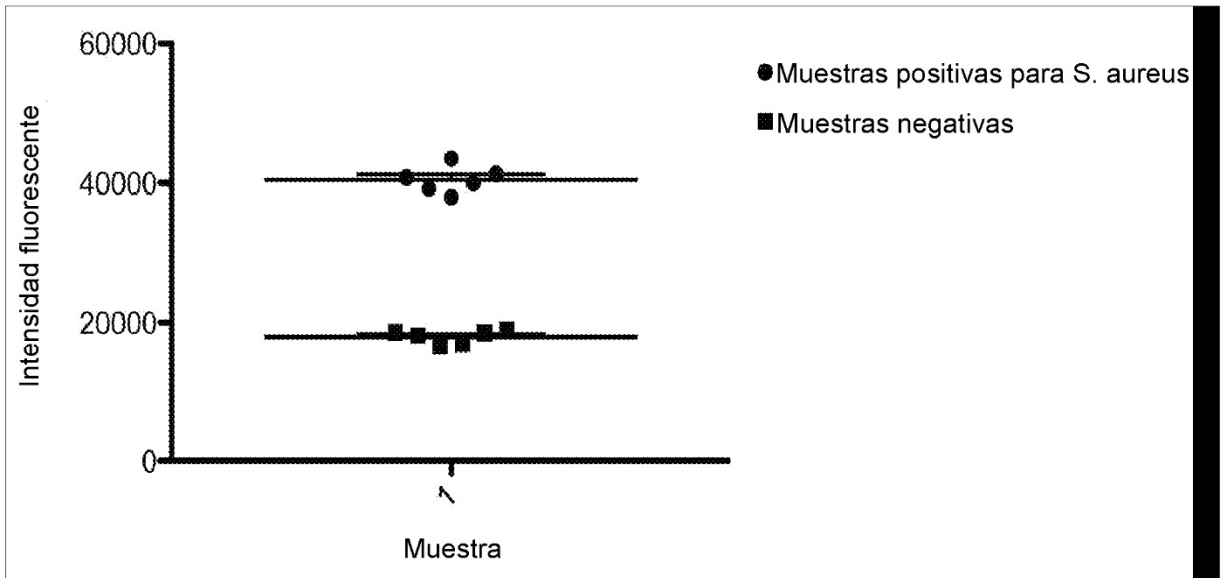


FIG. 34

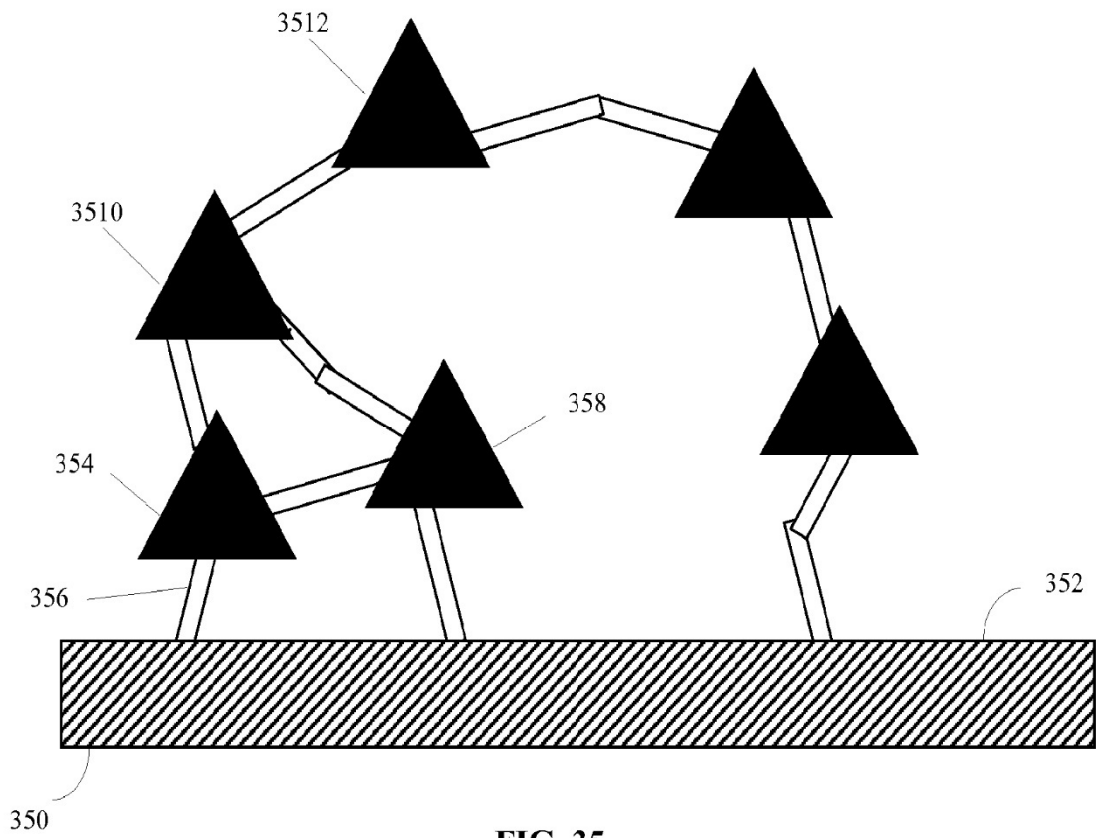


FIG. 35

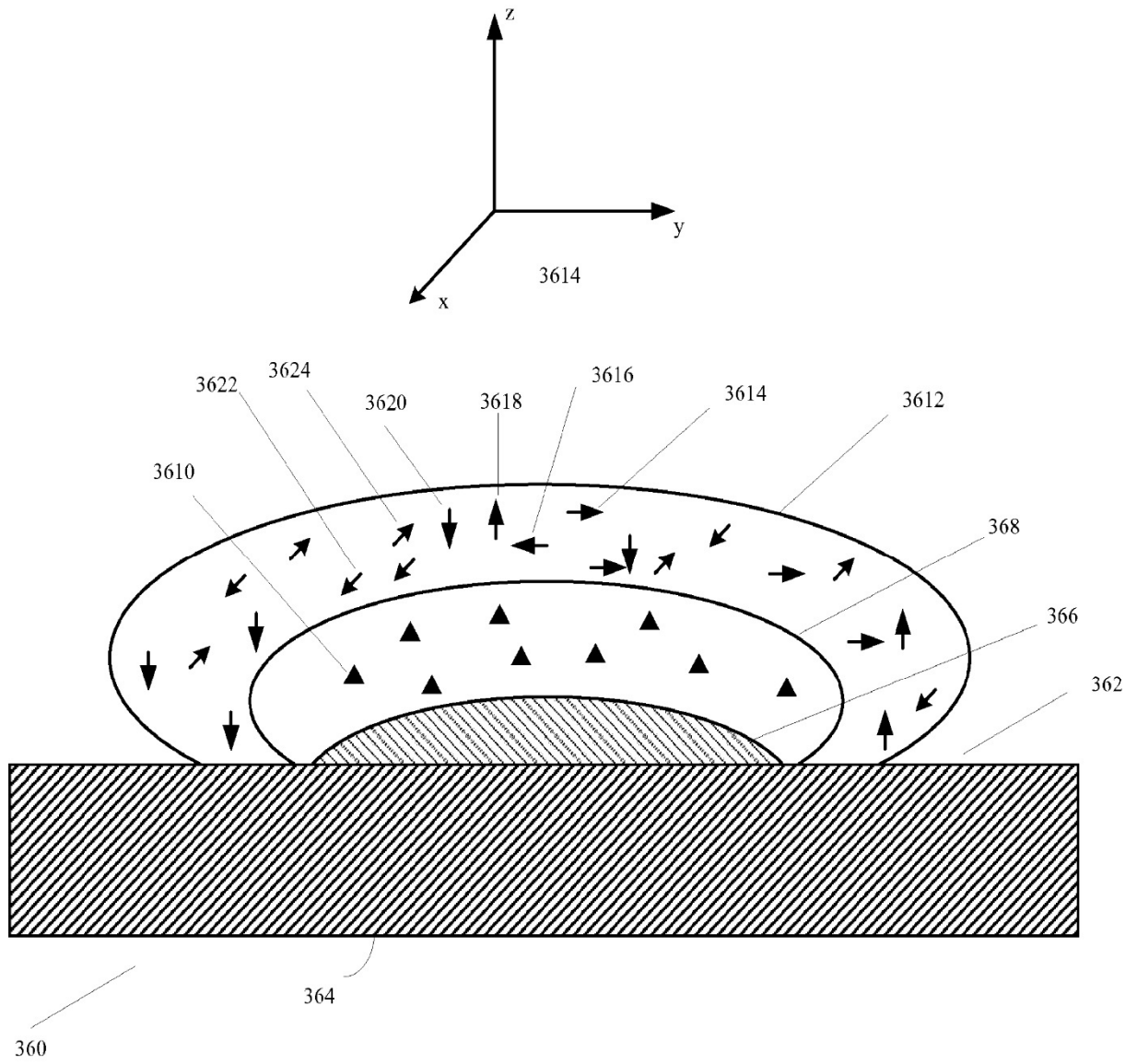


FIG. 36

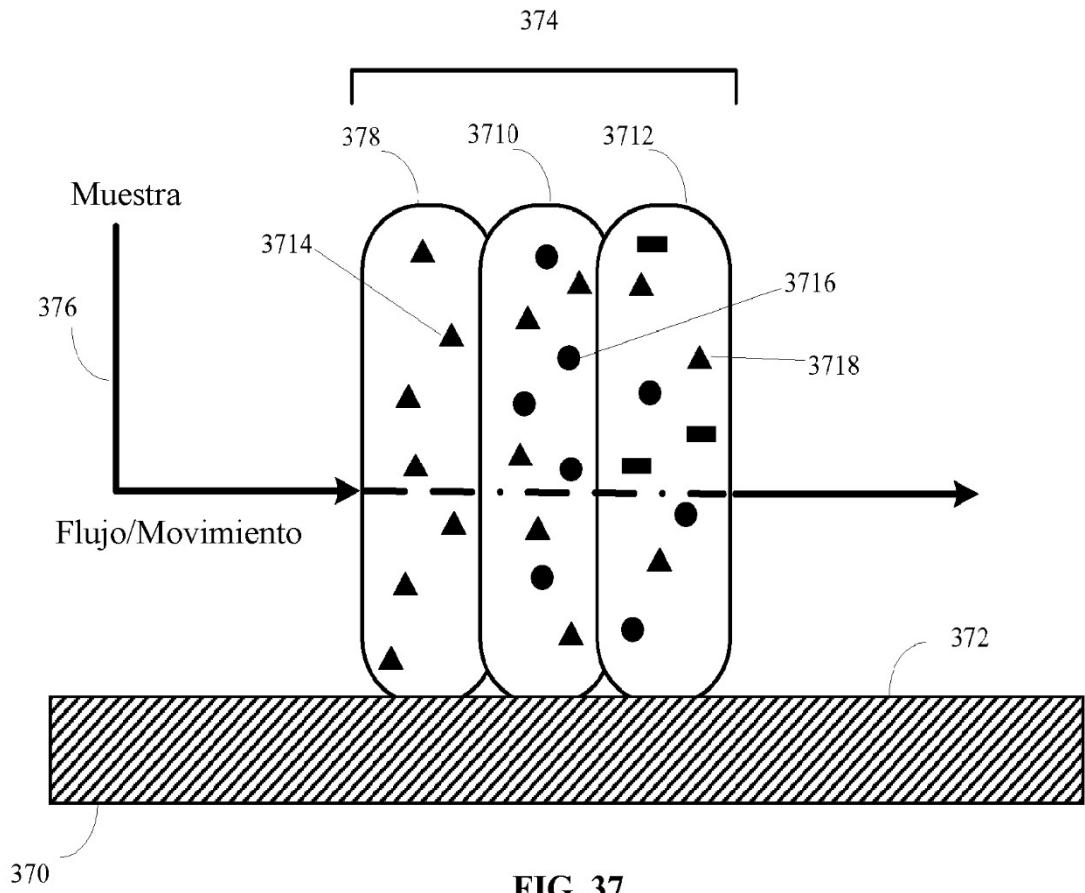


FIG. 37

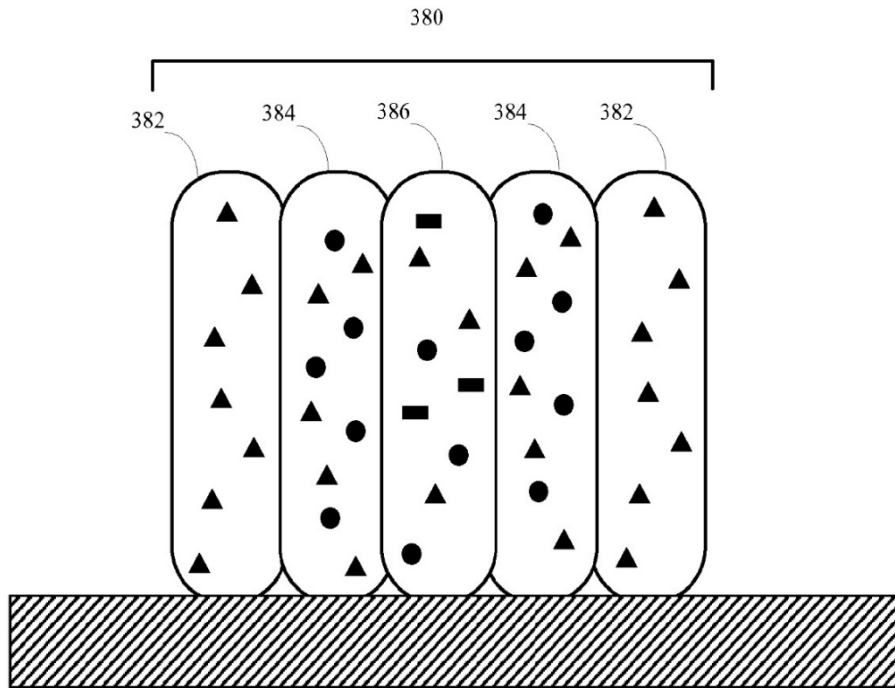


FIG. 38A

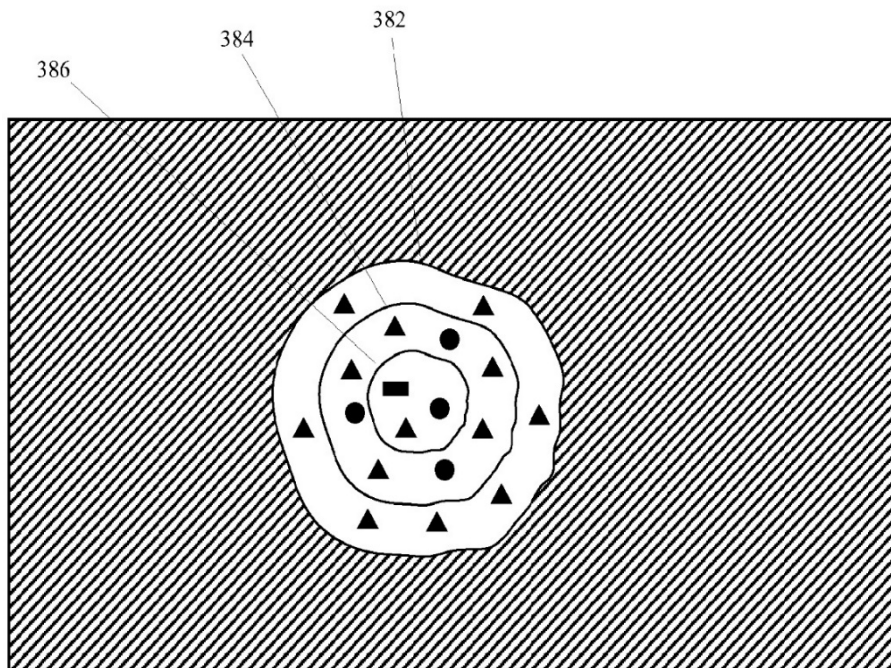


FIG. 38B

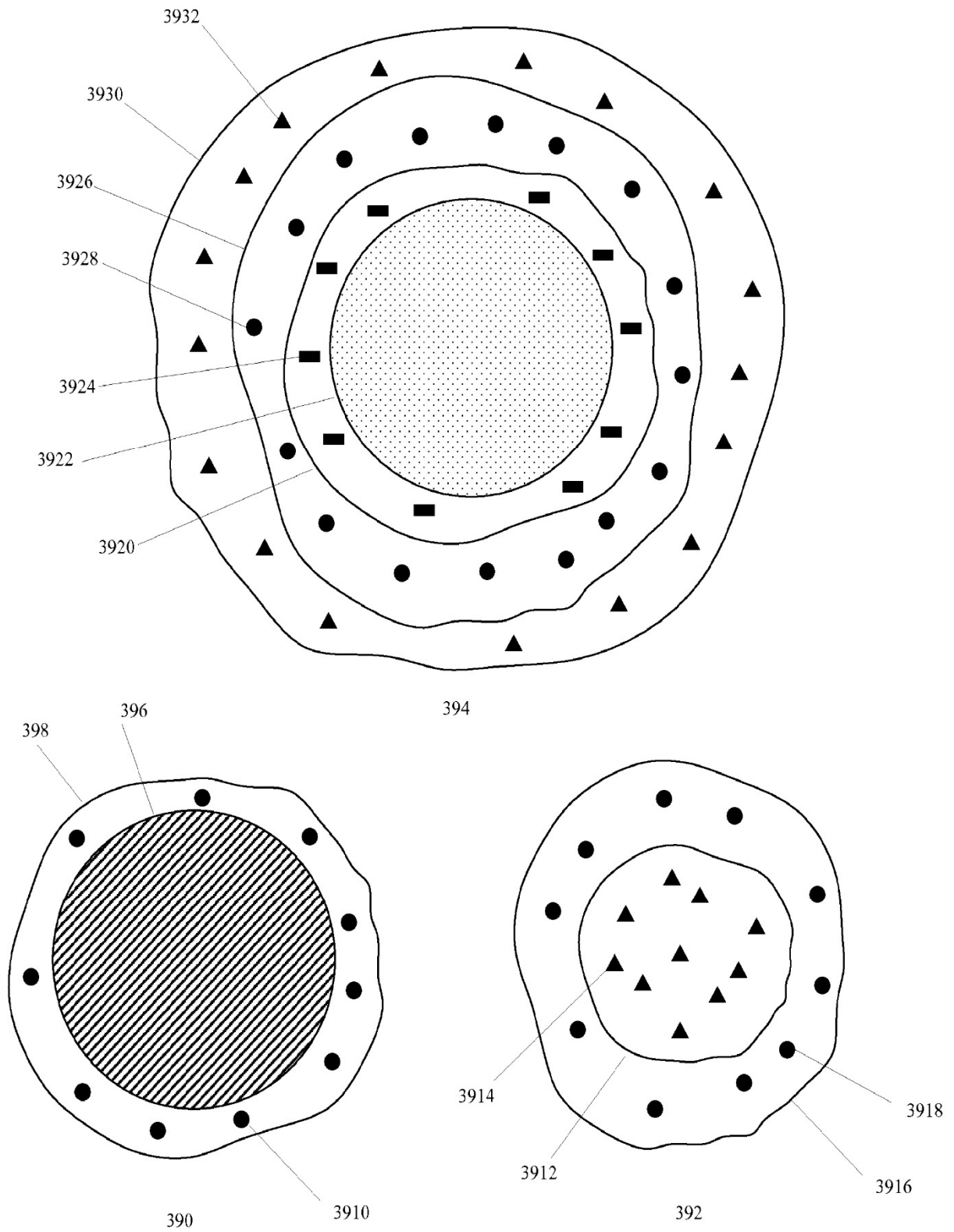


FIG. 39

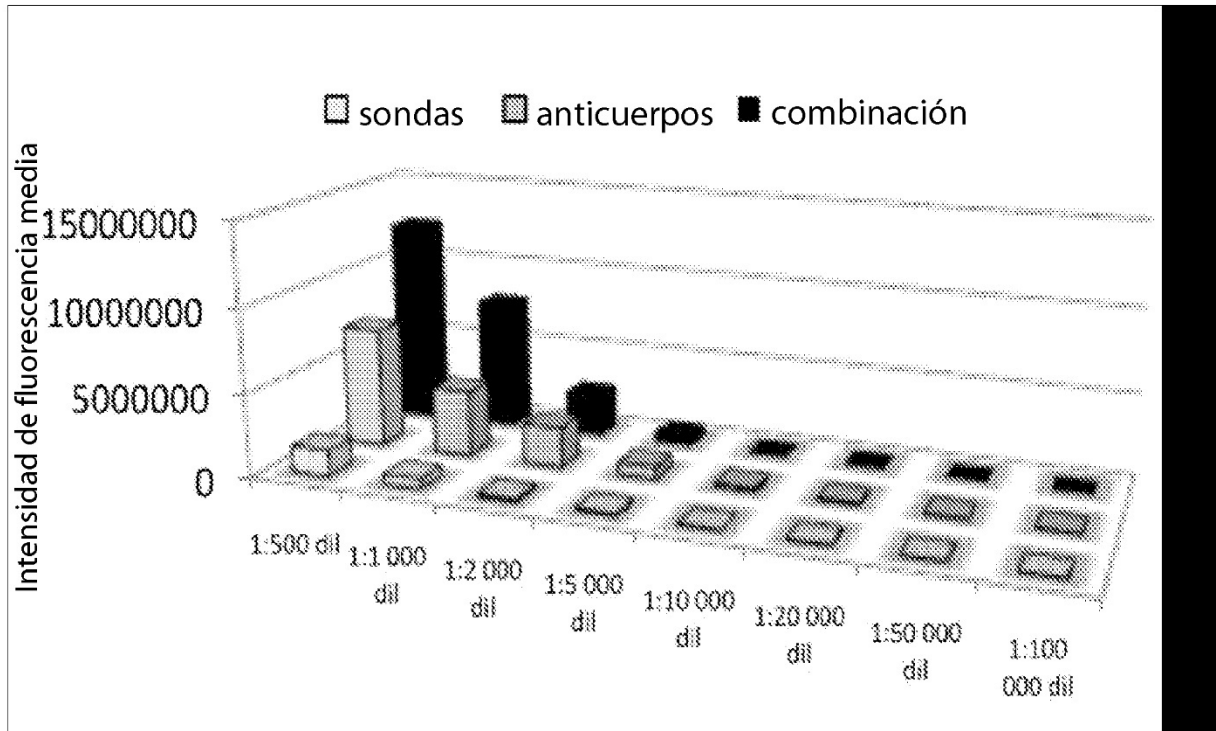


FIG. 40

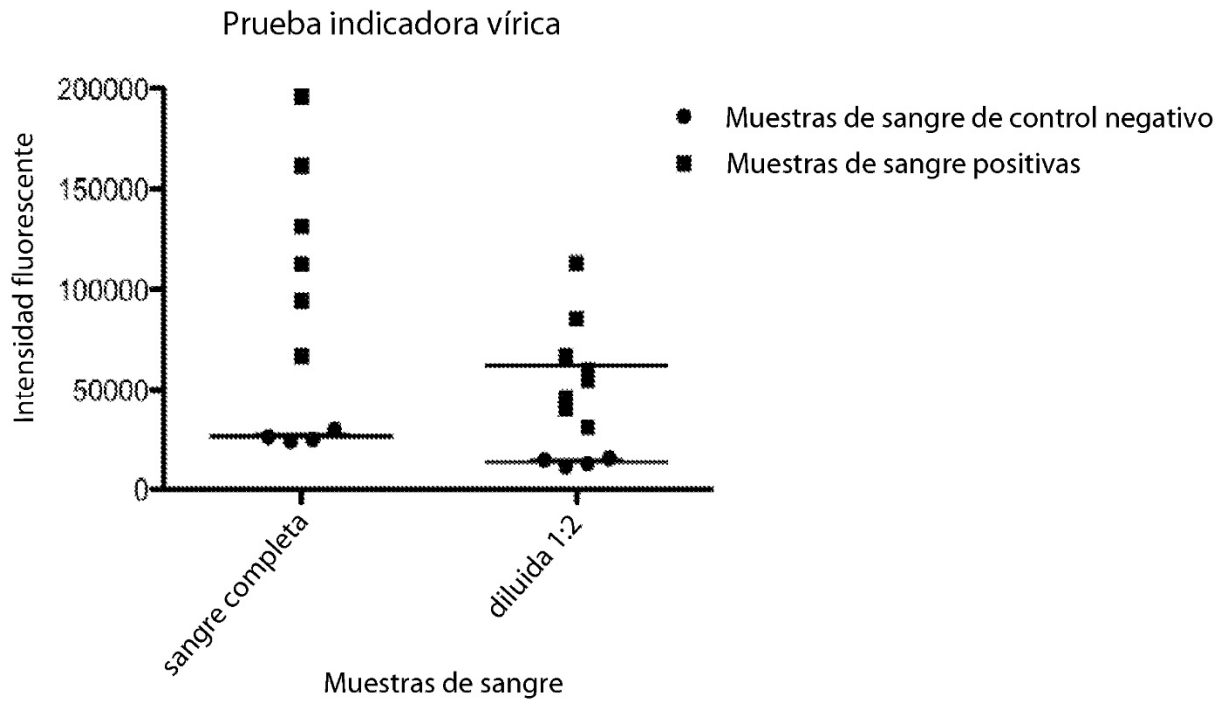


FIG. 41

Datos de la curva ROC: Curva ROC

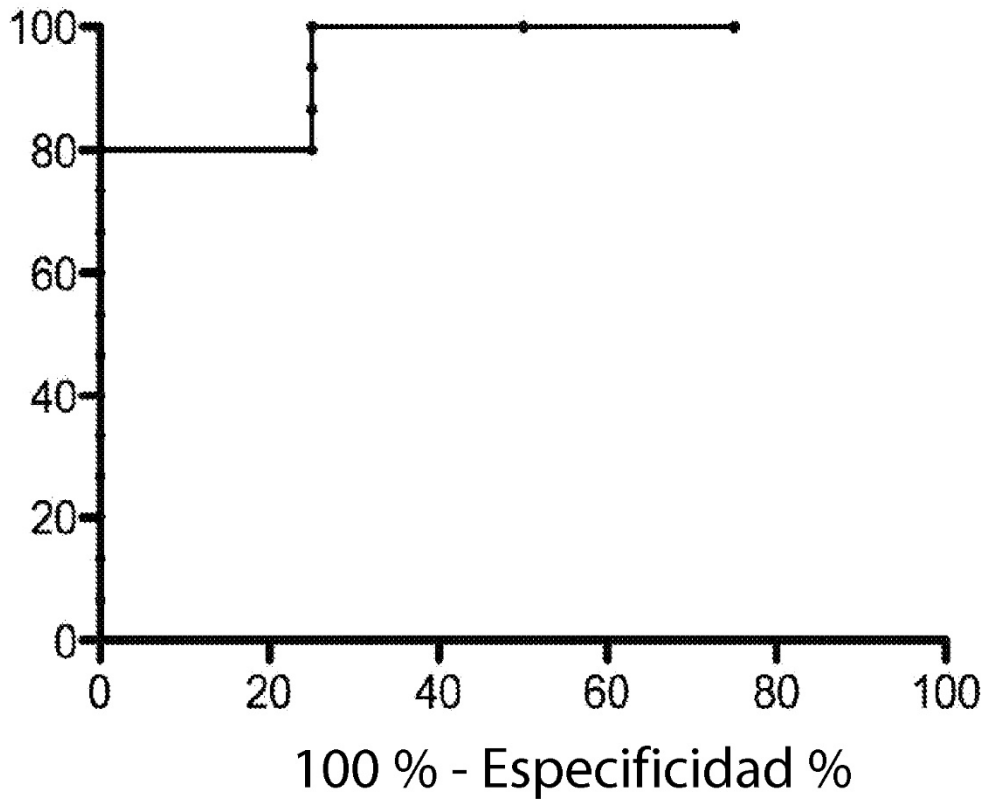


FIG. 42

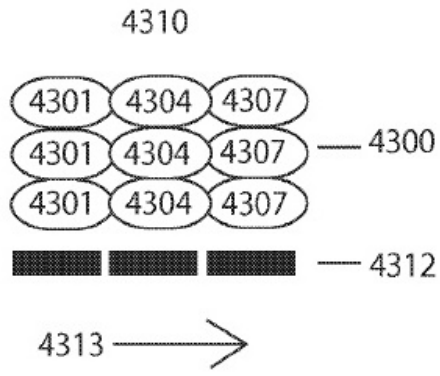


FIG. 43A

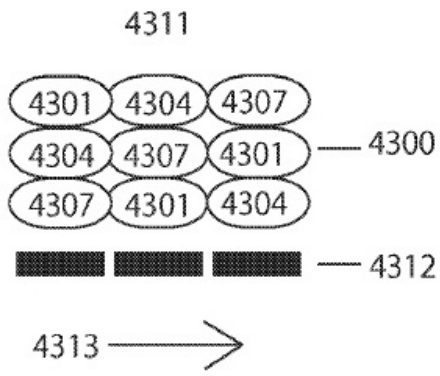


FIG. 43B

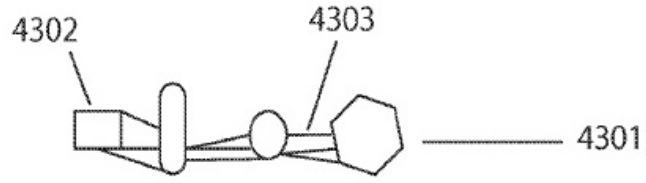


FIG. 43C

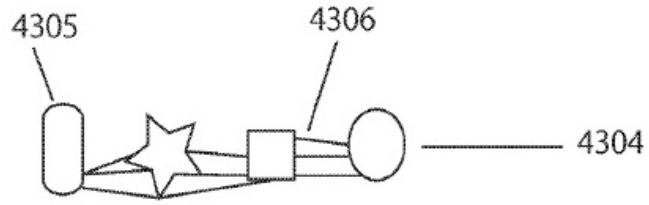


FIG. 43D

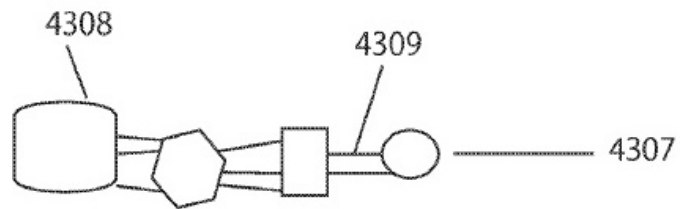


FIG. 43E

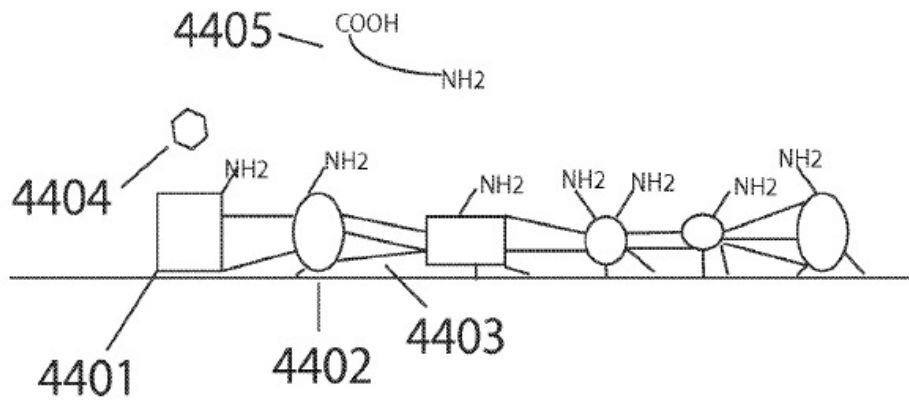


Fig. 44A

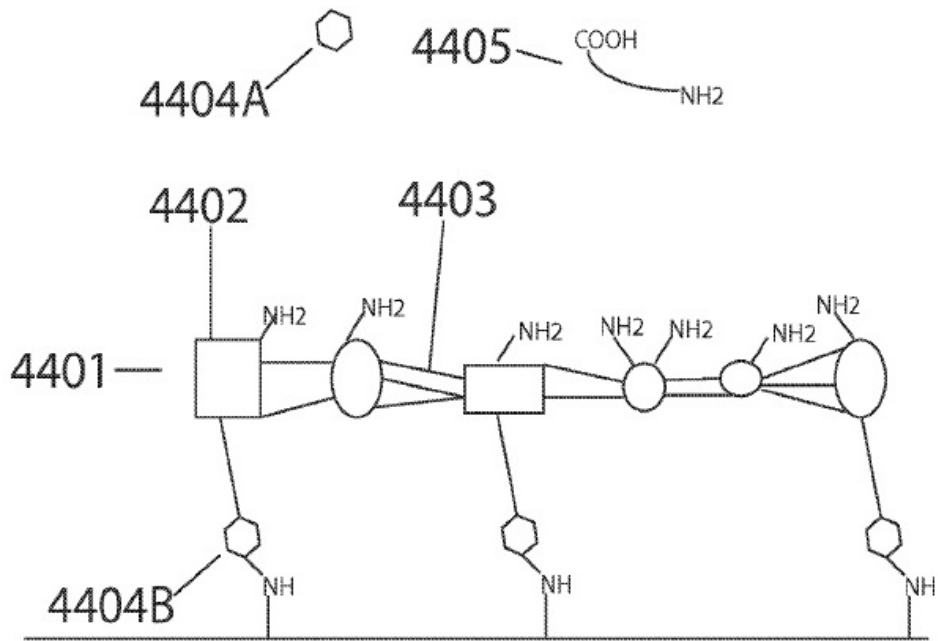


Fig. 44B

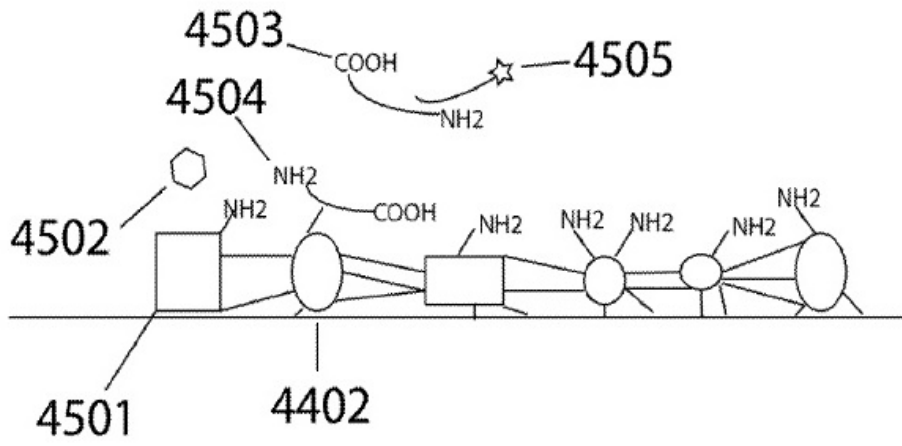


Fig. 45

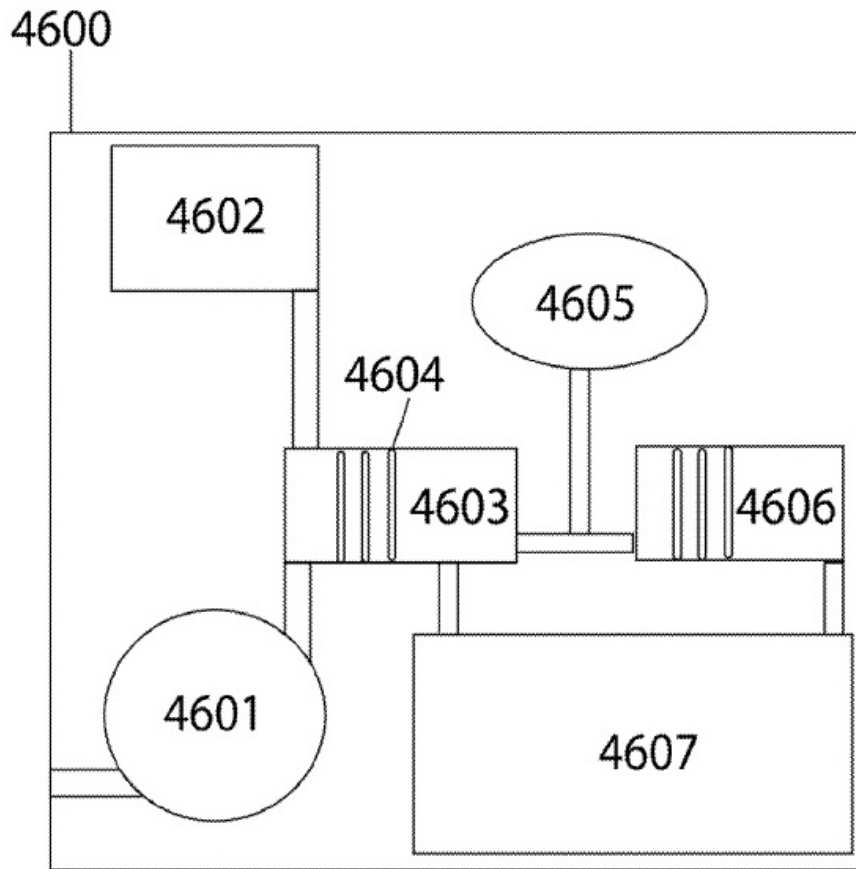


Fig. 46

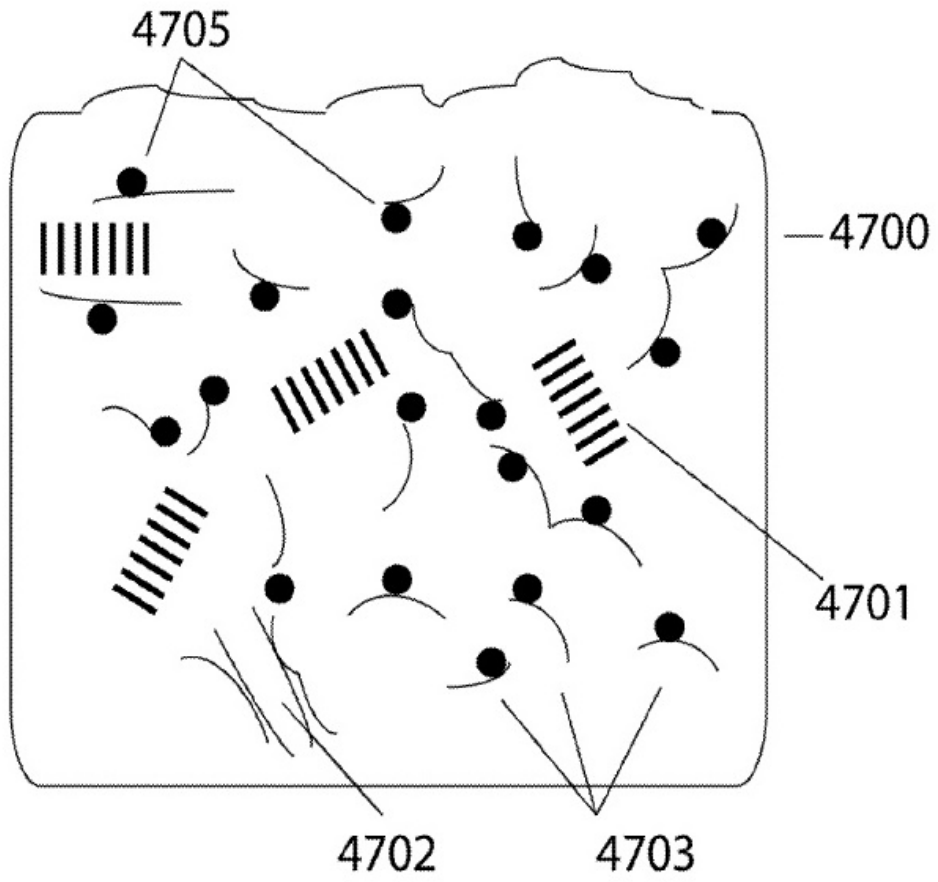


Fig. 47

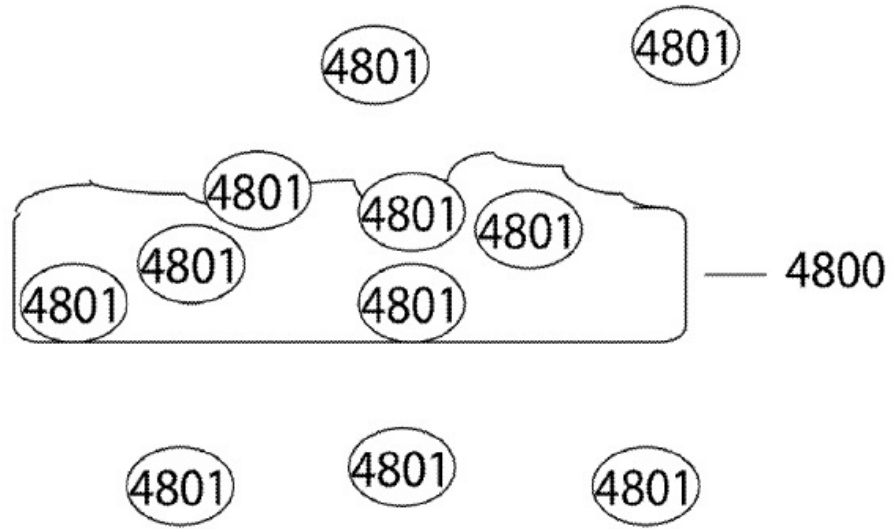


Fig. 48

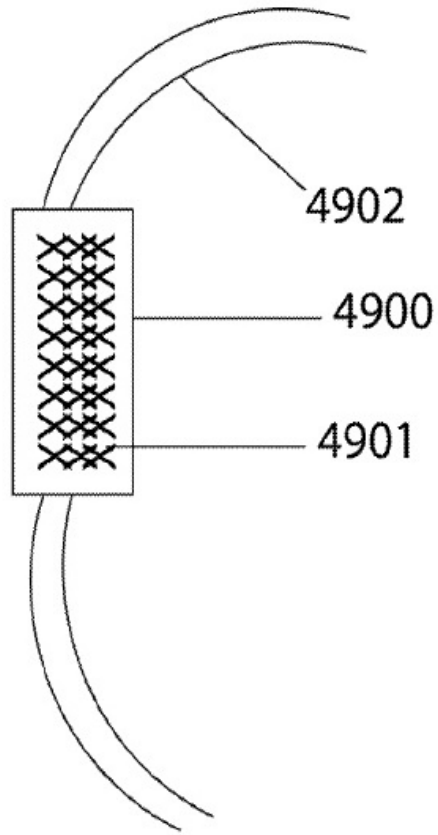


Fig. 49

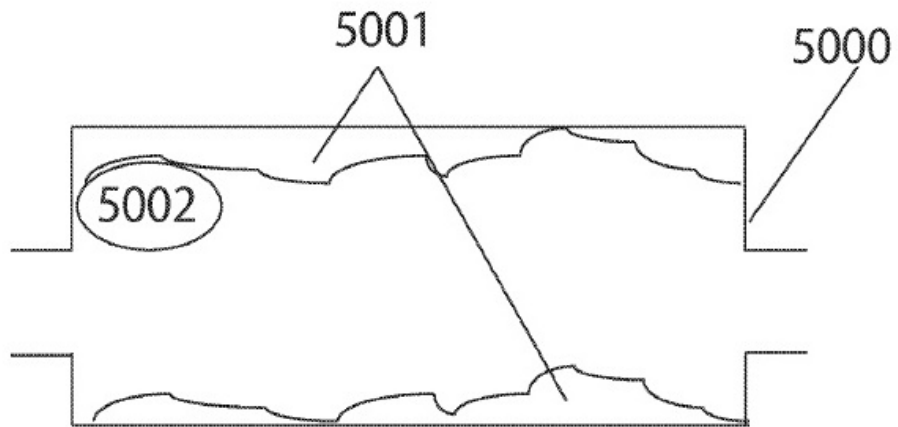


Fig. 50

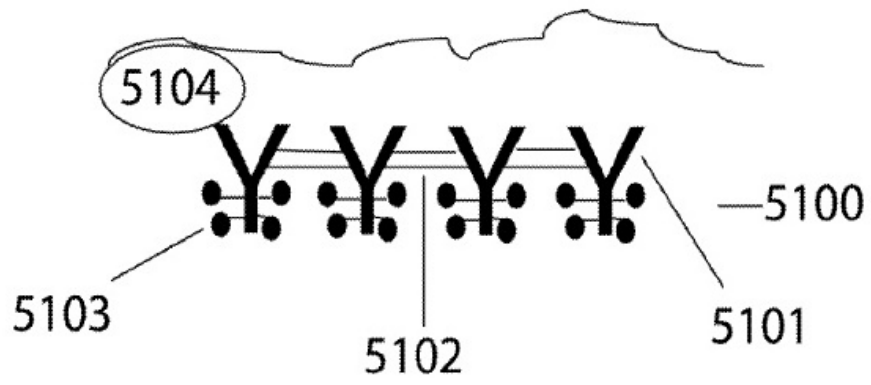


Fig. 51