

(12)

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(1) Número de publicación: 2 741 594

51 Int. CI.:	
C12Q 1/6823	(2008.01)
C12Q 1/6827	(2008.01)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacion	nal: 10.11.2	016 PCT/EP201	6/077267
87) Fecha y número de publicación internacional:	18.05.2017	WO17081152	
96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	10.11.2016	E 16794331 (5)	
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea:	15.05.2019	EP 3310930	

54 Título: Métodos y dispositivos de diagnóstico

③ Prioridad:	73 Titular/es:
10.11.2015 EP 15193960 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 11.02.2020	ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA COMMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (33.3%) C/Donostia-San Sebastián 1 01010 Vitoria-Gasteiz (Araba/Álava), ES; UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA (33.3%) y BASQUE CENTER FOR MACROMOLECULAR DESIGN AND ENGINEERING, POLYMAT FUNDAZIOA (33.3%)
	 (⁷²) Inventor/es: LAWRIE, CHARLES, HENDERSON; BASABE-DESMONTS, LOURDES; SCHÄFER, THOMAS; LIZ MARZÁN, LUIS, MANUEL y PARAK, WOLFGANG, JOHANN (⁷⁴) Agente/Representante:
	VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Métodos y dispositivos de diagnóstico

5 Campo de Invención

La presente invención tiene que ver con métodos y dispositivos que utilizan una etapa de amplificación de señal basada en tecnología de nanopartículas para detectar bioanalitos, por ejemplo, biomarcadores de enfermedades.

10 Antecedentes de la Invención

La presente invención está dirigida a métodos y productos relacionados y equipos para detectar bioanalitos tales como biomarcadores de enfermedades, por ejemplo, mutaciones genéticas o material genético no hospedante.

- 15 El cáncer es la segunda causa más común de muerte en la UE, con cerca de 1,75 millones de muertes solo en el año 2012, con un aproximado de 3,45 millones de ciudadanos en la UE diagnosticados con esta enfermedad en el mismo año. El tratamiento de referencia para el diagnóstico del cáncer es el examen histológico del tejido; sin embargo, tales métodos tienen un costo alto, no están exentos de riesgos para el paciente y requieren una evaluación constante por parte de patólogos expertos). En consecuencia, ha habido un gran interés en el desarrollo de tecnologías para detectar
- 20 biomarcadores no invasivos que permitan el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Con respecto a esto, hay un especial interés especial en las tecnologías para detectar secuencias de ADN mutadas, ya que son útiles para el diagnóstico y pueden predecir el pronóstico y la capacidad de respuesta a las terapias dirigidas. Los biomarcadores de esta clase tienen gran valor científico y clínico en la práctica general de la medicina, y son útiles para diagnosticar, pronosticar, detectar y evaluar los riesgos de todo un espectro de enfermedades y trastornos. Esta forma de aplicar biomarcadores,
- 25 ya se está integrando en muchos sistemas de salud, para personalizar el tratamiento y prevenir enfermedades, logrando así, un avance cada vez más importante hacia la "medicina personalizada".

No obstante, las tecnologías disponibles en la actualidad que permiten la detección de tales biomarcadores son limitadas, ya que se requiere de equipos costosos, mucha mano de obra y largos tiempos de respuesta. Por otra parte,
 la mayoría parte de las tecnologías disponibles en el mercado, dependen de la manipulación y amplificación previas del ADN objetivo, ya que no son lo suficientemente sensibles para la detección en una muestra sin procesar que puede tener un volumen limitado. Por lo tanto, su uso está generalmente limitado a laboratorios especializados.

- Las nanopartículas de metales nobles tienen un número de propiedades fisicoquímicas únicas, lo que ha promovido la investigación de su utilización para el desarrollo de nuevas plataformas de biosensores. Aunque existen muchos ejemplos descritos anteriormente de métodos y dispositivos que aprovechan las propiedades únicas de las nanopartículas de metales nobles para la búsqueda de herramientas de diagnóstico biomolecular más específicas y sensibles (ver Doria et al., *Sensors,* 2012, Vol. 12, pp 1657-1687 para una revisión exhaustiva), la mayoría de estos aún requieren que se manipule la muestra y se amplifique el ADN objetivo antes de la detección.
- 40

45

El documento WO 2005/118870 expone un método para detectar una secuencia de ADN objetivo de interés usando una matriz de microelectrodos de oligonucleótidos de sonda inmovilizados y una pluralidad de nanopartículas funcionalizadas con sondas para una segunda región del ADN objetivo. El ADN objetivo en una muestra de prueba se unirá al electrodo con las sondas inmovilizadas, lo que a su vez dará como resultado la agregación de nanopartículas a través del ADN capturado. Esta incorporación puede detectarse como cambios en la impedancia electroquímica en el sitio del electrodo.

El documento WO 2007/044025 expone un método para detectar una secuencia de ADN objetivo de interés usando nanopartículas funcionalizadas con sondas específicas para dos regiones diferentes del ADN objetivo. El ADN objetivo 60 en una muestra de prueba derivará en la formación de compuestos de nanopartículas de oro que pueden detectarse midiendo los cambios en las propiedades de dispersión de la luz de la muestra.

Sanromán-Iglesias et al., ACS Appl. *Mater. Interfaces*, 2015, vol. 7, pp. 15692-15695, describe los polímeros conjugados como puertas moleculares para la liberación controlada de luz de nanopartículas de oro. La liberación remota de nanopartículas en una solución acuosa mediante la foto degradación de un polímero delgado permitió que la liberación de partículas fuera detectada a simple vista.

Sanromán-Iglesias *et al., ACS Sens.*, 2016, vol. 1, pp. 1110-1116, describe la detección de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) por agregación selectiva de nanopartículas. Se investigo el efecto del tamaño de las nanopartículas en el límite de sensibilidad de los biosensores de nanopartículas en la discriminación de SNP. Un aumento de 5 veces en el tamaño de partícula, con una concentración constante de oro, conduce a una mejora en el límite de detección en 3 órdenes de magnitud.

Zhou y otros, *J Am Chem Soc*, 2010, vol. 26, pp 6932-6934 describen un método para la detección de una secuencia de ADN objetivo de interés que incorpora un proceso de amplificación por biomineralización. En este método, se proporcionan una serie de oligonucleótidos de sonda inmovilizados junto con una pluralidad de nanopartículas

funcionalizadas con ambas sondas para una segunda región del ADN objetivo y una silicateína capaz de biomineralización. El ADN objetivo en una muestra de prueba se unirá a las sondas inmovilizadas, lo que a su vez dará como resultado la agregación de nanopartículas a través del ADN capturado. La silicateína unida a nanopartículas cataliza la síntesis de sílice, que puede atrapar una segunda especie de nanopartículas de oro para producir cambios

5 detectables en las propiedades de dispersión de la luz de la muestra. También se puede emplear una etapa adicional de coloración con plata para permitir la detección de la secuencia de interés en concentraciones tan bajas como 50 aM.

Bui et al. (Anal Bioanal Chem (2007) 388: 1185-1190) describe la detección de ADN funcionalizado en nanopartículas de oro, utilizando microscopía de fuerza atómica.

El documento EP 1867990 se refiere a un dispositivo y a un método para amplificar una señal generada a partir de marcadores de nanopartículas primarias en un ensayo.

15 El documento WO 82/02772 describe un método, composición, equipo y sistema para realizar un inmunoensayo para un analito biológico en particular.

Govorov et al. (Nanotoday (2007) VOL 2, número 1: 30-38) describe los efectos fototérmicos de las nanopartículas coloidales metálicas en presencia de radiación electromagnética.

20

El documento US 2004/0180369 describe un ensayo de detección de hibridación de ácidos nucleicos, que utiliza pruebas de captura que comprenden oligonucleótidos monocatenarios inmovilizados sobre una superficie de sustrato sólido.

25 El documento WO 90/02205 se refiere a un método para detectar, identificar y/o cuantificar ácido nucleico en una muestra mediante la determinación de la aglutinación de partículas suspendidas que tienen como miembro a un par vinculante específico unido al mismo.

El documento WO 99/23258 describe métodos y composiciones para detectar una secuencia específica de ácido nucleico en una muestra detectando ópticamente la formación, o inhibición de la formación, de un complejo de hibridación. Aún existe la necesidad de métodos y equipos para la detección de biomarcadores de enfermedades (como las mutaciones genéticas) que sean económicos, rápidos y altamente sensibles. También se necesita portabilidad y facilidad de uso. En particular, se requiere un método que evite la necesidad de manipulación de la muestra y la amplificación del ADN objetivo antes de la detección. Además, existe la necesidad de métodos y equipos

35 que permitan la detección de biomarcadores de enfermedades y, al mismo tiempo, provean una lectura conveniente en el dispositivo. La presente invención aborda estas y otras necesidades, en un sistema que puede adaptarse fácil y rápidamente a la detección de diversos bioanalitos objetivo, y en una variedad de muestras de prueba biológicas o ambientales.

40 Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona métodos y dispositivos para la detección de analitos objetivo en una muestra de prueba. En general, la invención utiliza un método de amplificación de señal en el que la liberación de una señal fácilmente detectable está condicionada a la aglomeración de nanopartículas inducida por el analito objetivo.

45

65

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un analito objetivo en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:

proporcionar una pluralidad de nanopartículas detectoras que comprenden una primera nanopartícula detectora
 funcionalizada con una primera sonda específica para una primera región de un analito objetivo y una segunda
 nanopartícula detectora funcionalizada con una segunda sonda específica para una segunda región de dicho analito objetivo; y

- poner en contacto dichas nanopartículas detectoras con una muestra de prueba en condiciones adecuadas para la unión de las sondas específicas al analito objetivo, en donde la aglomeración inducida por el analito objetivo de las nanopartículas detectoras permite la liberación de un medio de señal detectable desde un depósito de señal al romperse una partición cerrando el depósito de señal, y en donde la partición es una capa de polímero termosesible y las nanopartículas detectoras aglomeradas dirigen una transferencia de calor suficiente para causar una ruptura térmica al menos parcial de dicha capa de polímero termo-sensible, liberando así los medios de señal detectables, y
- 60 en donde la transferencia de calor es disparada por la irradiación de las nanopartículas detectoras aglomeradas con una fuente de radiación electromagnética.

De esta forma, un evento de detección sensible y adaptable está relacionado condicionalmente a un evento de señal; este evento de señal puede ser más fácilmente discernible que el evento de detección, facilitando así la detección de analitos de interés sin la necesidad de una manipulación o amplificación previa de la muestra. Conectar un evento de detección a un evento de señal de esta manera también permite que el método sea fácilmente adaptable a la detección de una variedad de analitos, simplemente cambiando las sondas de nanopartículas del detector.

En ciertos casos, según este y otros aspectos de la invención, el analito objetivo puede ser un ácido nucleico, una proteína u otra molécula biológica. La primera y la segunda sondas se seleccionan para ser específicas para (es decir,

- 5 exhibir una unión selectiva a) el analito objetivo. En los casos en que el analito objetivo comprende un ácido nucleico, la primera y/o segunda sondas pueden ser oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a (porciones respectivas de) la secuencia del analito objetivo. En los casos en que el analito objetivo comprende una proteína (glicosilada o de otro tipo), la primera y la segunda sondas pueden, por ejemplo, tomar la forma de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, FAb, scFV) que se unen selectivamente a un epítopo respectivo
- 10 presente en la proteína. De manera similar, la primera y segunda sondas pueden tomar la forma de aptámeros que se unen selectivamente al analito objetivo. En virtud de la primera y segunda sondas que se unen a diferentes regiones (por ejemplo, diferentes epítopos) en el analito objetivo, se produce una disposición de enlace en sándwich o puente, lo que lleva a una aglomeración mediada por analitos de las nanopartículas detectoras.
- 15 Según la presente invención, la liberación de los medios de señal detectables se hace realiza a través de la ruptura de una partición que cierra el depósito de señal. Esta partición es una capa de polímero termosensible que se puede descomponer mediante una transferencia de calor dirigida por aglomerados de las nanopartículas del detector. Por ejemplo, el depósito de señal puede comprender una o más microesferas que comprenden una envoltura, por ejemplo, una cubierta formada por un polímero termosensible, que encierra un núcleo que comprende los medios de señal
- 20 detectables. De esta manera la cáscara de la microesfera proporciona la partición. Según la presente invención, esta transferencia de calor se desencadena por la irradiación de las nanopartículas de detectores aglomerados con una fuente de radiación electromagnética. Preferiblemente, la fuente de radiación electromagnética está configurada para suministrar energía en o cerca de la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector aglomerado. De esta manera, la liberación de los medios de señal detectables solo puede darse después de la aglomeración inducida
- 25 por el analito objetivo de las nanopartículas del detector y la posterior irradiación de estos aglomerados con radiación electromagnética.

En ciertos casos, la fuente de radiación electromagnética comprende un diodo láser rojo. El diodo láser rojo puede suministrar luz a la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector aglomerado, como en el rango de 600 a 650 nm, por ejemplo, 633 nm. En ciertos casos, la longitud de onda resonante puede estar alejada de los máximos de absorción de Hb y HbO2 presentes en la sangre (434 nm y 414 nm, respectivamente) y/o lejos de las longitudes de onda de absorción de los componentes del dispositivo y/o lejos de la longitud de onda de absorción máximos de plasma. En ciertos casos, la fuente de radiación electromagnética es un diodo emisor de luz (LED). En casos especiales, este LED puede configurarse para proveer energía a una longitud de onda de 415 - 425 nm.

35

En ciertos casos, según este y otros aspectos de la invención, el polímero termosensible está compuesto de al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en: poli (sulfonato de estireno) (PSS), poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC), poli (alilamina)(PAH), poli (N-isopropilacrilamida), poli [2- (dimetilamino) etil metacrilato](pDMAEMA), hidroxipropilcelulosa, poli (vinilcaprolactama) y polivinil metil éter

40

En ciertos casos, según este y otros aspectos de la invención, el polímero termosensible comprende capas alternas de poli (sulfonato de estireno) (PSS) y poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC) o de PSS y poli (alilamina)(PAH). Esto permite que el espesor del polímero se controle fácilmente, simplemente variando el número de capas.

45

En determinados casos, el polímero termosensible comprende poli (alilamina) (PAH). En ciertos casos, el polímero termosensible comprende poli (alfa) metilestireno.

En ciertos casos, el polímero termosensible tiene un espesor de entre 60 y 100 nm. Los actuales inventores han 50 descubierto que es mejor un espesor de polímero en este intervalo para facilitar suficiente rigidez a la partición del polímero y para evitar la liberación de los medios de señal antes de la irradiación.

En algunas ocasiones especialmente preferidas, el polímero termosensible comprende un número impar de capas. Se sabe que un número impar de capas hará que el polímero termosensible se infle y se quiebre a temperaturas superiores a 60°C, debido a la repulsión entre las capas que resulta en cargas no compensadas. Por lo tanto, en ciertos casos preferidos, la irradiación de las nanopartículas del detector aglomerado crea un incremento de la temperatura local de al menos 20°C, 40°C o 60°C.

En algunas ocasiones, el polímero termosensible abarca una capa superficial de poli (alilamina)(HAP). 60

En ciertos casos preferidos, los aglomerados de nanopartículas del detector se ubican en la partición después de la aglomeración. En ciertos casos, esto se hace a través de un par de unión específico, preferiblemente el analito objetivo y la primera y/o segunda sonda de las nanopartículas del detector. Por lo tanto, en algunas ocasiones, la capa superficial del polímero termosensible (por ejemplo, una capa de HAP) puede funcionalizarse con la primera y/o segunda sonda de las nanopartículas. De esta forma, las nanopartículas detectoras aglomeradas se

65 segunda sonda de las nanopartículas detectoras. De esta forma, las nanopartículas detectoras aglomeradas se pueden ubicarse en la partición utilizando la misma estrategia de unión que subyace a la aglomeración de las

nanopartículas de los detectores. El polímero termosensible puede tener secuencias de sonda (por ejemplo, que hibridan específicamente con la secuencia mutante de interés) unidas o incorporadas en ella, por ejemplo, unida o incorporada a la capa superficial del polímero termosensible. Esta disposición ayuda a acercar las nanopartículas aglomeradas a la capa termosensible y, de esta manera, se aumenta la transferencia de energía de las nanopartículas

- 5 irradiadas al polímero termosensible (en lugar de, por ejemplo, la energía que se disipa en la solución). Sin embargo, se considera específicamente en el presente documento que en ciertos casos puede que no haya una sonda de unión presente en o sobre el polímero termosensible. Los inventores han encontrado que, en determinadas condiciones, por ejemplo, dependiendo de las velocidades de sedimentación de los aglomerados de nanopartículas, las nanopartículas aglomeradas se acercan al polímero termosensible sin la necesidad de una sonda dentro o sobre el polímero.
- 10

En ciertos casos, la primera y segunda nanopartículas detectoras comprenden tanto la primera como la segunda sonda mencionada. En situaciones particularmente preferidas, la primera y segunda nanopartículas detectoras son las mismas.

15 En ciertos casos, las nanopartículas detectoras comprenden un núcleo de átomos de metal, preferiblemente metal noble. En particular, el metal puede ser plata.

En algunas ocasiones, el diámetro del núcleo de la nanopartícula del detector está en el rango de 10 a 100 nm, así como en el rango de 40 a 70 nm.

20

En algunas ocasiones, los medios de señalización se seleccionan del grupo consistente en: estreptavidina, un anticuerpo, una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), un fluoróforo, un tinte, uno o más puntos cuánticos y una o más perlas de látex.

- 25 En determinados casos, los medios de señal son una pluralidad de nanopartículas de señal. Los actuales inventores han descubierto que las nanopartículas ofrecen una ventaja útil como medio de señal, ya que permiten el uso de una partición permeable o semipermeable para cerrar el depósito de señal. Un sello hermético, como el que se necesitaría para evitar fugas de, por ejemplo, un tinte líquido, es sensible a las diferencias de presión; por consiguiente, la ruptura o el debilitamiento del material de partición inducido por la presión puede dar como resultado una liberación no deseada
- 30 de los medios de señal, y una mayor incidencia de resultados falsos positivos. Favorablemente, las nanopartículas son lo suficientemente pequeñas como para ser contenidas en un depósito de señal adecuado, pero lo suficientemente grandes como para que la partición que cierra el depósito se pueda hacer permeable para permitir la igualazión de la presión del aire. En ciertas situaciones, el sistema puede tener presión negativa en el dispositivo para facilitar el flujo. Por tanto, aquí se contempla específicamente que la partición que cierra el depósito puede no ser permeable al aire.
- 35 Preferiblemente, el número de nanopartículas de señal liberadas desde el depósito de señal excede (preferiblemente excede en gran medida) el número de nanopartículas de detector necesarias para realizar dicha liberación. En determinados casos, la relación entre los medios de señal liberados (por ejemplo, las nanopartículas de señal) y las nanopartículas de detección es de 1000:1 o mayores de 1000:1, por ejemplo, 10^6:1 (es decir, un medio de señal un millón de veces más (por ejemplo, las nanopartículas de señal) que el detector de nanopartículas o incluso superior).
- 40 Un gran número de medios de señal (por ejemplo, nanopartículas de señal) en relación con el número de nanopartículas del detector ayuda a ofrecer una amplificación de señal, que a su vez permite una mejor detección, por ejemplo, detección visible sin la necesidad de aparatos de imagen altamente sensibles.
- En determinados casos, las nanopartículas de señal comprenden un núcleo de átomos de metal, preferiblemente un metal noble. En especial, el metal puede ser oro. En algunas ocasiones particularmente preferidas, el núcleo metálico de las nanopartículas de señal y el núcleo metálico de las nanopartículas detectoras son metales diferentes. Esto hace que las nanopartículas del detector se usen para dirigir una transferencia de calor al polímero termosensible mediante irradiación en una longitud de onda que no será absorbida por las nanopartículas de señal.
- 50 En determinados casos, el diámetro del núcleo de la nanopartícula de señal está en el rango de 10 a 20 nm. En algunas ocasiones, las nanopartículas de señal tienen una morfología esférica. En otros casos, las nanopartículas de señal tienen una morfología en forma de barra. También se contemplan otras morfologías de nanopartículas de señal, y se pueden aplicar fácilmente a la invención; por ejemplo, nanotubos, nanoboxes y nanoclusters. El uso de múltiples morfologías de nanopartículas de señales permite observar diferentes señales de color después de la liberación de
- 55 las nanopartículas de señal. Esto puede ser beneficioso, por ejemplo, al facilitar salidas codificadas por colores fácilmente observables del método.

En determinados casos, las nanopartículas de señal están funcionalizadas con un polioxietileno nonil fenil éter terminado en tiol (IgeSH). Se ha descubierto que la funcionalización con IgeSH estabiliza las nanopartículas contra la aglomeración, incluso después del secado y la redisolución.

En determinados casos, el depósito de señal comprende una o más de dichas microesferas, por ejemplo, las microesferas termosensibles. El diámetro promedio de las microesferas puede estar en el rango de 1 a 20 μ m, así como en el rango de 5 a 10 μ m.

65

En algunas ocasiones, el depósito de señal comprende una pluralidad de dichas microesferas, y la capa superficial de

la cubierta está cargada negativamente o está cargada positivamente.

En determinados casos, el depósito de señal comprende una pluralidad de dichas microesferas, y las microesferas se suministran en un microcanal adyacente y/o en contacto con una pluralidad de partículas de relleno de mayor diámetro que las microesferas. En especial, las partículas empaquetadas pueden comprender perlas de vidrio, sílice o agarosa. Las partículas empaquetadas pueden tener un diámetro promedio en el rango de 20 a 200 µm, u opcionalmente en el rango de 50 a 150 µm.

En determinados casos, el depósito de señal consta de una o más cavidades en un material de soporte, preferiblemente un sustrato de silicio macroporoso. En algunas ocasiones, las cavidades son microcavidades, micropocillos o microporos. En ciertos casos preferidos, cada cavidad puede contener medios de señal detectables a una concentración de al menos 4x105 nanopartículas/µm3, por ejemplo, si las nanopartículas son esféricas con un radio de 7,5nm, y las cavidades toman la forma de tubos de radio de 0,5µm y profundidad 10 µm y suponiendo un empaquetamiento relativamente denso de las nanopartículas esféricas. De esta forma, la rotura de la partición que

15 cierra el depósito de señal por un número potencialmente pequeño de nanopartículas detectoras aglomeradas permitirá la liberación de un volumen comparativamente grande de medios de señal, creando así una amplificación de la señal.

En algunas ocasiones, la liberación de los medios de señal detectables desde el depósito de señal se ve como una señal de color. En ciertos casos preferidos, la liberación de los medios de señal detectables se observa a simple vista. En determinados casos aún más preferidos, el medio de señal detectable se captura para su detección en una tira de retención después de la liberación del depósito de señal. De esta forma, es mucho más fácil la visualización de la liberación de los medios de señal. Cuando los medios de señal son una pluralidad de nanopartículas de señal, la captura de estos en una tira de retención permite observar su liberación de forma sencilla como un cambio de color resultante de las propiedades ópticas dependientes de la distancia de las nanopartículas.

En determinados casos, de acuerdo con este aspecto de la invención, las sondas detectoras de nanopartículas son oligonucleótidos complementarios a las regiones primera y segunda de un ácido nucleico objetivo. En algunas ocasiones, una o ambas sondas oligonucleotídicas están unidas covalentemente al núcleo de nanopartículas del

- detector a través de un grupo conector. En ciertos casos, la sonda comprende nucleótidos modificados o no naturales. En particular, el uso de nucleótidos que agregan rigidez al esqueleto del oligonucleótido, reduciendo la flexibilidad del ADN natural, se contempla aquí. Los oligonucleótidos más rígidos incrementan la especificidad de la sonda-objetivo, lo que es deseable sobre todo cuando se detecta una mutación de base única contra un fondo de ADN de tipo salvaje. En determinados casos, los oligonucleótidos pueden comprender 2'-o-metil nucleótidos. En ciertos casos, los
- 35 oligonucleótidos pueden abarcar ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En ciertos casos particulares, el grupo conector puede comprender un grupo tiol. En determinados casos adicionales, el grupo conector puede comprender un espaciador alquilo y/o glicol C10 - C20. La incorporación de una molécula espaciadora posibilita la unión de las sondas al ácido nucleico objetivo, cuando se une al núcleo de nanopartículas del

- 40 detector. En ciertos casos, las sondas comprenden o consisten en un enlace tiol al núcleo de la nanopartícula vinculado a un espaciador de PEG, a su vez vinculado a un espaciador C18, a su vez vinculado a la secuencia de la sonda en sí. El espaciador puede limitar o evitar que la sonda con carga negativa se adhiera directamente a la superficie de la nanopartícula.
- 45 En determinados casos, de acuerdo con este aspecto de la invención, los oligonucleótidos de la primera y segunda sonda se unen a regiones del ácido nucleico objetivo separados por 15 a 50 pares de bases. Esto sirve para favorecer la unión del ácido nucleico objetivo a nanopartículas detectoras discretas, ya que la corta diferencia de secuencia dificulta estructuralmente la unión a la primera y segunda sondas en la misma nanopartícula. En ciertos casos particularmente preferidos, los oligonucleótidos de la sonda son: como se muestra en el Ejemplo 1, 5, 9 o 10.
- 50

5

En ciertos casos, cada nanopartícula detectora tiene entre 200 y 300 moléculas de sonda.

En ciertos casos, los medios de señal detectables comprenden un primer miembro de un par de enlace específico. En ciertos casos, ese primer miembro es biotina o estreptavidina. Por lo tanto, en determinados casos según este aspecto de la invención, las nanopartículas de señal comprenden un primer miembro de un par de unión específica y la tira de retención comprende un segundo miembro correspondiente de dicho par de unión específica. En ciertos casos preferidos, dicho primer miembro y segundo miembros se seleccionan de biotina y estreptavidina. En ciertos casos, el primer miembro del par de enlace específico está vinculado covalentemente al núcleo de nanopartículas de señal a través de un grupo conector. En ciertos casos adicionales, este grupo conector consta de un grupo tiol, y opcionalmente comprende además un espaciador/separador alquilo y/o glicol C10 - C20.

En ciertos casos, cada nanopartícula detectora tiene entre 200 y 300 miembros de unión.

En ciertos casos, de acuerdo con este aspecto de la invención, el ácido nucleico objetivo tiene una secuencia que es una variante de una secuencia de tipo salvaje, y la primera o la segunda sonda detectora de nanopartículas se unen a la secuencia de la variante con preferencia a la secuencia de tipo salvaje. En determinados casos preferidos, la

secuencia variante comprende un polimorfismo de nucleótido único (SNP), y la primera o segunda sonda detectora de nanopartículas se hibrida a una porción del ácido nucleico objetivo que comprende la posición de SNP. Se demostró que las nanopartículas detectoras funcionalizadas con la primera y la segunda sonda de oligonucleótidos pueden aglomerarse de forma específica, para distinguir entre las diferencias de una sola base en un ácido nucleico objetivo.

5

10

35

En ciertos casos, de acuerdo con este aspecto de la invención, el ácido nucleico es ADN. Por lo tanto, en determinados casos, el ácido nucleico es un gen o fragmento del mismo, sospechoso de estar asociado con una enfermedad, mientras que, en otros casos, el ácido nucleico es un gen o fragmento del mismo que se sabe que está asociado con una enfermedad. En determinados casos particularmente preferidos, el ácido nucleico es un gen o fragmento del mismo asociado con el cáncer. En otros casos, el ácido nucleico es ARN.

En ciertos casos, el ácido nucleico objetivo comprende una mutación asociada con cáncer u otro trastorno que tiene un componente genético. Los ejemplos de trastornos que tienen un componente genético y para los cuales se puede emplear la detección de mutaciones según la presente invención incluyen: fibrosis quística, hemocromatosis,

- 15 fenilcetonuria, enfermedad renal poliquística, enfermedad de células falciformes, atrofia muscular espinal, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Crohn, y la enfermedad de Huntington. La mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en: un solo cambio de nucleótido, una deleción, una inserción (incluida una repetición de trinucleótidos) o una secuencia de translocación.
- 20 En especial, la mutación puede estar en un gen seleccionado del grupo que consiste en: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) de NCBI Gene ID: 1956; Cáncer de mama humano 1 inicio temprano (BRCA1) de NCBI Gene ID: 672; el gen BRAF humano de NCBI Gene ID: 673; y el protooncogén KRAS humano de NCBI Gene ID: 3845.
- 25 En determinados casos, la mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en:
 - Mutación EGFR c.2573T> G (que codifica L858R); Mutación EGFR c.2369C> T (que codifica T790M); Mutación de deleción del exón 19 de EGFR; y
- 30 Mutación KRAS asociada con cáncer colorrectal.

En determinados casos, se puede sospechar que la muestra de prueba contiene el analito objetivo, mientras que en otros casos se sabe que la muestra de prueba contiene el analito objetivo. En ciertos casos, la muestra de prueba puede ser una muestra ambiental, en particular una muestra de comida o agua. En otros casos, la muestra de prueba puede ser una muestra biológica. En ciertos casos particulares, la muestra de prueba puede ser sangre, plasma sanguíneo, orina u otros biofluidos y sus derivados.

En ciertos casos, según este aspecto de la invención, el método comprende la etapa de desnaturalización por calor de la muestra de prueba antes de poner en contacto dicha muestra de prueba con las nanopartículas detectoras. En determinados casos adicionales, el método puede comprender además la etapa de proveer un agente termoestabilizante antes de la desnaturalización por calor de la muestra de ensayo. En ciertos casos, el agente termoestabilizante es la glucosa. La provisión de un agente termoestabilizante puede ser útil para limitar la desnaturalización de la muestra de prueba que de otro modo podría causar incrementos indeseables en la viscosidad de la muestra. De manera alternativa o adicional, el método puede comprender una etapa en la que la muestra se diluye y/o se trata con un agente para eliminar la albúmina, como el colorante Cibacron Bluesefarosa

(por ejemplo, el flujo rápido de Blue Sepharose 6 de GE Healthcare Life Sciences).

En ciertos casos, de acuerdo con este aspecto de la invención, el método comprende además la etapa de proporcionar una pluralidad de sondas de bloqueo, pudiendo dichas sondas de bloqueo unirse específicamente a la cadena antisentido del ácido nucleico objetivo. En determinados casos, el método comprende además la etapa de poner en contacto un exceso de dichas sondas de bloqueo (por ejemplo, un exceso de 2 a 10 veces, como un exceso de 5 a 7 veces o incluso un exceso de 6 veces, de sondas de bloqueo relativas) al número de sondas de detección de nanopartículas) con la muestra de prueba en condiciones apropiadas para la unión de las sondas de bloqueo a la cadena antisentido del ácido nucleico objetivo, impidiendo así la renaturalización de las cadenas sentido y antisentido

55 del ácido nucleico objetivo. De esta forma, la cadena antisentido del ácido nucleico objetivo se elimina del sistema, lo que permite que la muestra de prueba esté altamente enriquecida y concretamente para la cadena con sentido del ácido nucleico objetivo antes del contacto con las nanopartículas detectoras.

En ciertos casos, las sondas de bloqueo se conforman de nucleótidos modificados, como los 2'-o-metil nucleótidos. 60

En ciertos casos, según este aspecto de la invención, el método incluye además la etapa de proporcionar un agente termoestabilizante antes de la desnaturalización térmica de la muestra de ensayo.

En ciertos casos, según este aspecto de la invención, la fuente de radiación electromagnética es un diodo láser o un diodo emisor de luz, y la irradiación de las nanopartículas del detector aglomerado genera un aumento de la temperatura local de al menos 20°C, 40°C. o 60°C. Preferiblemente, el aumento de la temperatura local es de al menos

40°C.

5

En ciertos casos, la superficie de la capa de polímero termosensible se funcionaliza con la primera y/o la segunda sonda de las nanopartículas del detector, lo que hace que los aglomerados de las nanopartículas del detector se localicen en la capa de polímero termosensible.

En determinados casos, las nanopartículas detectoras comprenden un núcleo de átomos de plata y las nanopartículas de señal comprenden un núcleo de átomos de oro.

10 En ciertos casos, las nanopartículas de señal comprenden un primer miembro de un par de unión biotina-estreptavidina y la banda de retención comprende un segundo miembro correspondiente de dicho par de unión de biotinaestreptavidina.

En ciertos casos, de acuerdo con la invención, las sondas de detección de bloqueo y las sondas de nanopartículas son oligonucleótidos 2'-o-metilo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de un analito objetivo en una muestra de prueba, que comprende:

- i) un compartimento de detección, que contiene una pluralidad de nanopartículas detectoras que incluye una primera nanopartícula detectora funcionalizada con una primera sonda específica para una primera región de un analito objetivo y una segunda nanopartícula detectora funcionalizada con una segunda sonda específica para una segunda región de dicho analito objetivo; y
- ii) Una zona de amplificación de señal que contiene un medio de señal detectable contenido en un depósito de señal por una partición que se puede romper selectivamente luego de la aglomeración inducida por el analito objetivo de las nanopartículas del detector, en donde la zona de amplificación de la señal incluye además una fuente integrada de radiación electromagnética configurada para proveer energía en la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector, y en donde la partición comprende una capa de polímero termosensible.
- 30 En ciertos casos, el compartimento de detección incluye además una fuente integrada de radiación electromagnética configurada para proveer energía a la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector, y la partición que separa el compartimiento de detección y el depósito de señal es una capa de polímero termosensible.
- 35 En ciertos casos, la zona de amplificación de la señal contiene además una fuente integrada de radiación electromagnética configurada para proveer energía en la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector, y en donde la partición incluye una capa de polímero termosensible.

En determinados casos, el depósito de señal contiene una o más microesferas que tienen un núcleo que incluye dichos medios de señal y una envoltura que encierra dicho núcleo, y en la que la envoltura provee dicha partición.

En ciertos casos preferidos, el polímero termosensible es como se definió anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. En especial, el polímero termosensible puede constar al menos de un polímero seleccionado del grupo que consiste en: poli (sulfonato de estireno) (PSS), poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC), poli (alilamina) (PAH), poli (N isopropilacrilamida)), poli [2- (dimetilamino) etil metacrilato] (pDMAEMA), hidroxipropilcelulosa, poli (vinilcaprolactama) y polivinil metil éter

En determinados casos particularmente preferidos de acuerdo con este segundo aspecto de la invención, el polímero termosensible incluye un número impar de capas, ya que se sabe que un número impar de capas hará que el polímero termosensible se infle y se rompa a temperaturas superiores a 60°C, debido a la repulsión entre capas que se presenta en cargas no compensadas.

En ciertos casos, según este segundo aspecto de la invención, la fuente de radiación electromagnética puede ser un diodo láser o un diodo emisor de luz (LED). La fuente de radiación electromagnética puede adaptarse para producir
luz en una longitud de onda que corresponde a la frecuencia de resonancia de las nanopartículas del detector, cuando se encuentra en un estado aglomerado. Por ejemplo, la fuente de radiación electromagnética puede ser un diodo láser rojo que tenga una longitud de onda con un rango de 600 a 650 nm (por ejemplo, 633 nm). Opcionalmente, la fuente de radiación electromagnética puede ser un alongitud de onda con un rango de 415 - 425 nm.

60

45

En determinados casos, el compartimento de detección del dispositivo puede funcionalizarse con Optodex® (CSEM) para disminuir la interferencia de proteínas con la aglomeración de nanopartículas.

En ciertos casos, la partición que divide el compartimento de detección con el depósito de señal se funcionaliza con un miembro de un par vinculante específico para localizar los aglomerados de nanopartículas del detector en la partición. En ciertos casos particulares, la partición está funcionalizada con la primera y/o segunda sonda de las

nanopartículas del detector. Así, las nanopartículas de los detectores aglomerados pueden ser hechas para localizar la partición usando la misma estrategia de unión que subyace a la aglomeración de las nanopartículas. Esta doble función de las sondas es ventajosa en términos de diseño y fabricación del dispositivo.

5 En ciertos casos, de acuerdo con este segundo aspecto de la invención, el polímero termosensible consta de una capa superficial de poli (alilamina) (PAH). Por lo tanto, en determinados casos, la capa de HAP de la superficie está funcionalizada con la primera y/o segunda sonda de las nanopartículas del detector.

En determinados casos, según este y otros aspectos de la invención, la primera y segunda nanopartículas detectoras 10 incluyen tanto la primera como la segunda sondas mencionadas. En ciertos casos particularmente preferidos, la primera y segunda nanopartículas detectoras son las mismas.

En ciertos casos, las nanopartículas detectoras constan de un núcleo de átomos de metal, preferiblemente un metal noble. En casos especiales el metal es plata. En determinados casos, el diámetro del núcleo de la nanopartícula del detector está en el rango de 10 a 100 nm, por ejemplo, en el rango de 40 a 70 nm.

Según este segundo aspecto de la invención, los medios de señal pueden ser como se definen en relación con el primer aspecto de la invención. En particular, los medios de señal pueden incluir estreptavidina, un anticuerpo, una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), un fluoróforo, un tinte, uno o más puntos cuánticos y/o una o más

20 perlas de látex.

15

En ciertos casos, según este y otros aspectos de la invención, los medios de señal son una pluralidad de nanopartículas de señal. Los presentes inventores han descubierto que las nanopartículas proveen una ventaja útil como medio de señal, ya que permiten el uso de una partición permeable o semipermeable para cerrar el depósito de

- 25 señal. Un sello hermético, como el que se requiere para evitar fugas de, por ejemplo, un tinte líquido, es sensible a las diferencias de presión; por consiguiente, la ruptura o el debilitamiento del material de la partición inducido por la presión puede llevar a la liberación no deseada de los medios de señal y a un mayor riesgo de resultados falsos positivos. Favorablemente, las nanopartículas son lo necesariamente pequeñas como para ser contenidas en un depósito de señal apropiado, pero lo suficientemente grandes como para que la partición que cierra el depósito se pueda hacer
- 30 permeable para permitir la igualación de la presión del aire. Preferentemente, el número de nanopartículas de señal liberadas desde el depósito de señal es más alto que el número de nanopartículas del detector requeridas para producir dicha liberación.
- En ciertos casos, las nanopartículas de señal constan de un núcleo de átomos de metal, preferiblemente un metal 35 noble. En determinados casos el metal es oro. En ciertos casos, el diámetro del núcleo de la nano partícula de señal está en el rango de 10 a 20 nm.

En determinados casos particularmente preferidos, el núcleo metálico de las nanopartículas de señal y el núcleo metálico de las nanopartículas detectoras son metales diferentes. De esta forma, las nanopartículas detectoras se 40 pueden utilizar para dirigir una transferencia de calor al polímero termosensible por irradiación en una longitud de onda que no es absorbida por las nanopartículas de señal u otros componentes del dispositivo.

En ciertos casos, las nanopartículas de señal pueden tener una morfología esférica. En otros casos, las nanopartículas de señal pueden tener una morfología en forma de barra. También aplican otras morfologías de nanopartículas de señal y se pueden adaptar fácilmente para su uso en el dispositivo. Las diferentes morfologías de las nanopartículas 45 permiten que se observen diversas señales de color después de la liberación de la señal de las nanopartículas. lo que puede ser beneficioso al suministrar lecturas codificadas por colores desde el dispositivo.

En determinados casos, las nanopartículas de señal están funcionalizadas con un polioxietileno nonil fenil éter 50 terminado en tiol (IgeSH). La funcionalización con IgeSH estabiliza las nanopartículas contra la aglomeración, incluso después del secado y la redisolución.

En ciertos casos, el depósito de señal consta de una o más cavidades en un material de soporte, preferiblemente un sustrato de silicio macroporoso. La utilización de un sustrato de silicio macroporoso permite la carga previa de los 55 medios de señal a gran escala; el sustrato se puede cortar a medida cuando se requiera, lo que brinda enormes ventajas en términos de fabricación del dispositivo.

- En ciertos casos, las cavidades son microcavidades, micropocillos o microporos. En determinados casos preferidos, cada cavidad puede contener medios de señal detectables a una concentración de al menos 4x105 nanopartículas/µm3). De esta forma, la ruptura de la partición que cierra el depósito de señal por un número 60 potencialmente pequeño de nanopartículas detectoras aglomeradas resultará en la liberación de un volumen comparativamente grande de medios de señal, creando así una amplificación de la señal. Preferiblemente, se necesita la ruptura de la partición cerrando múltiples cavidades para generar una señal detectable, con el fin de minimizar los falsos positivos en casos de, por ejemplo, interrupción mecánica de la partición abriendo un pequeño número de cavidades.
- 65

En determinados casos, según el segundo aspecto de la invención, el depósito de señal puede constar de una pluralidad de microesferas como se define en relación con el primer aspecto de la invención. En especial, las microesferas pueden tener un diámetro promedio con un rango de 1 a 20 µm, así como un rango de 5 a 10 µm.

5 En ciertos casos, el depósito de señal consta de una pluralidad de dichas microesferas, y la capa superficial de la cubierta está cargada ya sea negativa o positivamente.

En ciertos casos, el depósito de la señal consta de una pluralidad de dichas microesferas, y dichas microesferas están situadas en un microcanal en la zona de amplificación de señal y están adyacentes y/o en contacto con una pluralidad
 de partículas de relleno. Las partículas de relleno pueden ser de mayor diámetro que las microesferas. En particular, las partículas de relleno pueden incluir perlas de vidrio, sílice o agarosa. Las partículas de relleno pueden tener un diámetro promedio en el rango de 20 a 200 µm, así como un rango entre 50 y 150 µm.

En determinados casos, el microcanal en el que se alojan las microesferas junto con las partículas de relleno forma una cámara de retención de micro fluidos.

En ciertos casos, de acuerdo con este segundo aspecto de la invención, el dispositivo consta de una región de visualización de señal, por ejemplo, que puede estar en comunicación con el compartimento de detección. En determinados casos preferidos, esta región de visualización de señal incluye un medio de retención para capturar el

- 20 medio de señal detectable después de su liberación del depósito de señal. En casos particulares, el medio de retención es una banda de retención. La incorporación de la región de visualización de la señal en el dispositivo permite una lectura conveniente en el dispositivo.
- En determinados casos, según este y otros aspectos de la invención, las sondas detectoras de nanopartículas son oligonucleótidos complementarios de las regiones primera y segunda de un ácido nucleico objetivo. En ciertos casos, una o ambas sondas oligonucleotídicas están unidas covalentemente al núcleo de nanopartículas del detector a través de un grupo conector. En ciertos casos particulares, el grupo conector puede comprender un grupo tiol. En ciertos casos adicionales, el grupo conector puede constar de un espaciador alquilo y/o glicol C10 - C20.
- 30 En ciertos casos, según este aspecto de la invención, los oligonucleótidos de la primera y segunda sonda se unen a regiones del ácido nucleico objetivo separados por 15 a 50 pares de bases.

En ciertos casos, cada nano partícula detectora tiene entre 200 y 300 moléculas de sonda. En determinados casos, los oligonucleótidos de la sonda son oligonucleótidos 2'-o-metilo.

35

15

En ciertos casos, los oligonucleótidos de la sonda de detección de nanopartículas se unen a un gen asociado con una enfermedad. En determinados casos preferidos, el gen es un gen asociado con el cáncer.

- En ciertos casos, los oligonucleótidos de la primera o segunda sonda son complementarios a una secuencia de ácido nucleico objetivo que es una variante de una secuencia tipo salvaje. En casos particulares, esta secuencia variante consta de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) y el oligonucleótido de la primera o la segunda sonda hibrida con una porción del ácido nucleico objetivo que incluye dicha posición de SNP. En determinados casos, la secuencia variante consta de una mutación asociada con cáncer u otro trastorno que tiene un componente genético. Los ejemplos de trastornos que tienen un componente genético y para los cuales se puede utilizar una mutación asociada como
- 45 analito objetivo según la presente invención incluyen: fibrosis quística, hemocromatosis, fenilcetonuria, enfermedad renal poliquística, enfermedad de células falciformes, atrofia muscular espinal, atrofia muscular, enfermedad de Sachs, enfermedad de Crohn y enfermedad de Huntington. La mutación puede seleccionarse del grupo compuesto por: un solo cambio de nucleótido, una deleción, una inserción (incluida una repetición de trinucleótidos) o una secuencia de translocación.
- 50

En determinados casos, la mutación se encuentra en un gen seleccionado del grupo que se compone de: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) de NCBI Gene ID: 1956; cáncer de mama humano 1 inicio temprano (BRCA1) de NCBI Gene ID: 672; el gen BRAF humano de NCBI Gene ID: 673; y el protooncogén KRAS humano de NCBI Gene ID: 3845.

55

En particular, la mutación puede seleccionarse del grupo compuesto por:

Mutación EGFR c.2573T> G (que codifica L858R); Mutación EGFR c.2369C> T (que codifica T790M); Mutación de deleción del exón 19 de EGFR; y Mutación KRAS asociada con cáncer colorrectal.

En determinados casos, según este y otros aspectos de la invención, los medios de señal detectables incluyen un primer miembro de un par vinculante específico. En ciertos casos preferidos, dicho primer miembro es biotina o estreptavidina. Por lo tanto, en ciertos casos particularmente preferidos, las nanopartículas de señal constan de un primer miembro de un par vinculante específico y la banda de retención de la región de visualización de señal consta

65

de un segundo miembro correspondiente de dicho par vinculante específico, en donde dicho primer miembro y dicho segundo miembro se seleccionan de la biotina y la estreptavidina. De esta forma, las nanopartículas de señal pueden capturarse en la banda de retención después de su liberación, y se observan fácilmente como un cambio de color visible en la banda que resulta de las propiedades ópticas de las nanopartículas que dependen de la distancia.

5

En determinados casos, el primer miembro del par vinculante específico está enlazado covalentemente al núcleo de nanopartículas de señal a través de un grupo conector. En ciertos casos particulares, el grupo conector puede incluir un grupo tiol. En ciertos casos adicionales, el grupo conector puede constar de un espaciador alquilo y/o glicol C10 - C20. En determinados casos, cada nanopartícula detectora tiene entre 200 y 300 miembros conectores.

10

En determinados casos, según este segundo aspecto de la invención, el dispositivo consta de una entrada de muestra en comunicación con el compartimento de detección.

En ciertos casos, el dispositivo consta así mismo de un compartimento de lisis dispuesto entre dicha entrada de muestra y el compartimento de detección, incluyendo un elemento de calentamiento. Preferiblemente, el elemento calefactor es de película delgada, ya que estos son más rápidos y eficientes que los componentes calefactores a granel, y se pueden alimentar fácilmente a través de una fuente de energía en el dispositivo (por ejemplo, una batería de botón).

- 20 En determinados casos, la entrada de muestra puede incluir un medio de separación de sangre. Preferiblemente, este será un sistema de análisis de sangre microfluídico integrado y autoalimentado (SIMBAS), que es más eficiente y rentable que otras tecnologías de separación de sangre basadas en membranas. En otros casos, la entrada de la muestra contiene un agente termoestable, como la glucosa o el Cibacron Blue.
- En ciertos casos, el dispositivo de este y otros aspectos de la presente invención puede ser un dispositivo para la detección, por ejemplo, de ADN circulante que puede tomar la forma de un sistema microfluídico autónomo, autoalimentado. El dispositivo puede constar y/o estar hecho de materiales poliméricos. El dispositivo puede estar diseñado para permitir un flujo de trabajo secuencial. En particular, se pueden proporcionar las siguientes etapas de flujo de trabajo y las características correspondientes del dispositivo: preparación de muestra (extracción de plasma y
- 30 enriquecimiento de ADN objetivo), incubación de muestra con nanopartículas de detección, liberación de partículas de señalización de detección y ensayo vinculante final en una banda de ensayo de flujo lateral para dar una señal detectable a simple vista. El dispositivo puede, en determinados casos, contener un volumen de muestra de menos de 500 microlitros. El sistema microfluídico puede, en determinados casos, tomar la forma de un dispositivo híbrido que integra microfluídos similares al papel en un casete de plástico. El transporte de muestras dentro del dispositivo del dispositivo fuerte de activa de muestras dentro del dispositivo puede.
- 35 puede, en ciertos casos, ser impulsado por presión negativa (por ejemplo, bombas de poli (dimetilsiloxano)("PDMS") personalizadas).

En ciertos casos, según este segundo aspecto de la invención, el compartimento de detección incluye además una pluralidad de sondas de bloqueo específicas para la cadena antisentido de un ácido nucleico objetivo. Las sondas de bloqueo pueden ser como se definen en relación con el primer aspecto de la invención.

En ciertos casos, según este y otros aspectos de la invención, las sondas de bloqueo son oligonucleótidos 2'-o-metilo.

En un tercer aspecto, la presente invención suministra un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de un analito objetivo en dos o más muestras de prueba, que incluye los elementos del segundo aspecto de la invención en trayectorias paralelas en el mismo dispositivo.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un dispositivo del segundo o tercer aspecto de la invención para uso en un método de diagnóstico o pronóstico de un sujeto mamífero, en el que la muestra de prueba es biológica y
 se ha obtenido de dicho sujeto o un método de detección de un contaminante bacteriano, parásito u otro contaminante biológico, en donde la muestra de prueba es una muestra ambiental.

En un aspecto adicional, la presente invención facilita un equipo que consta de:

55 i) Un dispositivo que tiene:

65

Una entrada de muestra;

Un compartimento de lisis que incluye un elemento de calentamiento; 60

Una fuente integrada de radiación electromagnética;

Una pluralidad de microesferas termosensibles que tienen un núcleo que contiene medios de señal y una envoltura que encierra el núcleo, en la que la envoltura incluye un polímero termosensible; y

Una región de visualización de señal que consta de una banda de retención para capturar los medios de señal

que siguen a la liberación de las microesferas;

Opcionalmente,

5 ii) una o más poblaciones de una sonda de bloqueo capaz de unirse específicamente a la cadena antisentido de un ácido nucleico objetivo; y

iii) una o más poblaciones de una pluralidad de nanopartículas detectoras funcionalizadas con una primera sonda específica para una primera región de la cadena sentido de dicho ácido nucleico objetivo y una segunda sonda específica para una segunda región de dicho ácido nucleico objetivo.

La presente invención comprende la combinación de las características y aspectos preferidos especificados, salvo que dicha combinación sea claramente inadmisible o se afirme expresamente que se evita. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen más detalladamente a continuación y con referencia a los ejemplos y figuras que se incluyen.

15

10

45

65

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra la unión de las sondas oligonucleotídicas diseñadas a secuencias genéticas BRAF mutantes 20 (sintéticas) y de tipo salvaje, según se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie. A: muestra el grado vinculante de las sondas mutantes (círculos) y de tipo salvaje (cuadrados) a la secuencia del gen BRAF mutante (500 nM de ssDNA sintético 100-mer); la sonda mutante se vincula concretamente al gen BRAF mutante, mientras que la sonda de tipo salvaje se vincula de manera relativamente débil. B: Muestra la vinculación preferencial de la sonda mutante diseñada a la secuencia del gen BRAF mutante (500 nM de ssDNA sintético 100-mer; círculos) en 25 comparación con la secuencia del gen BRAF de tipo salvaje (500 nM de ssDNA 100-mer sintético; triángulos). C: Muestra la fuerza relativa de vinculación de la sonda mutante al gen BRAF mutante para tres químicas de sonda diferentes. La comparación de las curvas vinculantes determinó las constantes de disociación (KD) para las diferentes químicas de la sonda como: ADN = 2.41 nM; 2'-O-Me = 1,81 nM; LNA = 7,55 nM.

- 30 La Figura 2 muestra los datos del modelado computacional de simulación in silico del dispositivo INDICATE. utilizados para optimizar ciertos aspectos del dispositivo antes de su fabricación. A: Muestra el cambio de temperatura (ΔT) en función de la distancia entre las nanopartículas del detector respecto al número de nanopartículas aglomeradas cuando se iluminan uniformemente con un láser LED de 100 mW (intensidad de 1 x 107 W/m2). A partir de esto, se determinó que un aglomerado de 50 nanopartículas detectoras, en las que la 35 distancia entre las nanopartículas es >50 nm (es decir, >15 pares base) provocará un aumento de temperatura de más de 40°C cuando se ilumine uniformemente con un láser LED de 100 mW. B: Muestra el número de microporos necesarios para abrirse y producir una señal detectable, en función de la concentración de nanopartículas de señal en los microporos y el número de nanopartículas detectoras aglomeradas. Sobre la base de que cada microporo puede contener entre 0.2 - 1 x 10⁹ nanopartículas de señal, se determinó que al menos 8 microporos tendrían que 40 abrirse para obtener una señal visible (8 x 109 nanopartículas de señal).
 - La Figura 3 muestra la separación en el dispositivo de una muestra de sangre completa para producir plasma mediante el sistema de análisis de sangre de microfluidos integrado y autoalimentado (SIMBAS). La separación del plasma sanguíneo transparente de toda la sangre se muestra en la medida en que aumenta el tiempo (A, B, C y D). El plasma sanguíneo transparente a la salida de la estructura de zanja se muestra con una línea blanca para quiar la vista.
- La Figura 4 muestra la caracterización de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método Turkevich. A: Muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de oro con una escala 50 indicada de 50 nm. B: Muestra la caracterización espectroscópica UV-Vis de las nanopartículas de oro, con una banda de plasmón de superficie localizada a 519 nm. C: Muestra el histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas sintetizadas. Se determinó un diámetro medio de 13,3 ± 1,2 nm analizando una muestra de más de 100 nanopartículas.
- 55 La Figura 5 muestra la caracterización de las nanopartículas de oro después la funcionalización con sondas de ADN. A: Muestra una imagen TEM de las nanopartículas funcionalizadas con ADN, en la que el ADN vinculado puede observarse como una débil capa molecular que rodea las nanopartículas (grosor aproximado de 1,4 nm). B: Muestra la caracterización espectroscópica UV-Vis de las nanopartículas funcionalizadas, en las que se aprecia un desplazamiento al rojo de la banda de plasmón de aproximadamente 3 nm en todas las muestras después de 60 vincularse al ADN; indicativo de la formación de una capa molecular como se ve en las imágenes TEM.

La Figura 6 muestra una representación esquemática de la vinculación "tipo sándwich" de las secuencias de sonda requeridas para la aglomeración de nanopartículas en presencia del ácido nucleico objetivo. A: La secuencia de tipo salvaje del gen objetivo puede vincular a la sonda ascendente, pero no se vincula a la sonda específica del gen mutante, y por tanto no produce una aglomeración de las nanopartículas (es decir, sigue siendo monodispersa). B: La secuencia mutada del gen objetivo puede unirse tanto a la sonda específica para el gen

mutante como a la sonda ascendente. La secuencia objetivo actúa como un puente molecular, vinculando las dos sondas en nanopartículas separadas, lo que genera la aglomeración de las nanopartículas. **C:** La falta de coincidencia entre la secuencia de tipo salvaje del gen objetivo y la sonda específica para el gen mutante evita la unión "tipo sándwich".

- La Figura 7 muestra el efecto de la concentración de analito (ADN objetivo) en la aglomeración de nanopartículas para una concentración dada de sondas vinculadas a nanopartículas (1,5 nM), según lo especificado por espectroscopia UV-Vis. A C: Muestra los cambios en los espectros UV-Vis con el tiempo para concentraciones variables (de 50, 25 y 5 nM, respectivamente) de ADN mutante (coincidente). D F: Muestra los cambios en los espectros UV-Vis con el tiempo para concentraciones variables (de 50, 25 y 5 nM, respectivamente) de ADN mutante (coincidente). D F: Muestra los cambios en los espectros UV-Vis con el tiempo para concentraciones variables (de 50, 25 y 5 nM, respectivamente) de ADN de tipo salvaje (no coincidente). Una única no coincidencia de pares base en el ADN objetivo da como resultado una aglomeración menos pronunciada de las nanopartículas, lo que indica que las nanopartículas funcionalizadas con sondas de ADN pueden aglomerarse de tal manera que se puede distinguir las diferencias de base sencilla en la secuencia objetivo. G I: Muestra datos cinéticos comparativos para diferentes concentraciones de ADN objetivo coincidente (es decir, mutante) y no coincidente (es decir, de tipo salvaje).
 - La Figura 8 muestra la caracterización de nanopartículas de señal de oro sintetizadas de acuerdo con el método de Turkevich. A: Muestra la estructura química del polioxietilen nonil fenil éter terminado en tiol (IgeSH) con el que se funcionalizaron nanopartículas de señal para estabilizarlas contra la aglomeración. B: Muestra una representación esquemática del proceso reversible de secado/ hidratación de las nanopartículas de señal funcionalizadas IgeSH. C: Muestra los espectros UV-Vis de las nanopartículas de señal funcionalizadas IgeSH en agua antes y después del secado.

Figura 9 A - D: Muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) del sustrato de silicio macroporoso
 usado para formar el reservorio de señal desde una variedad de ángulos y aumentos. Las dimensiones aproximadas de las cavidades micropilares se han indicado junto con una barra de escala de 5 µm.

Figura 10 A - D: Muestra imágenes SEM del sustrato del depósito de señal cargado con nanopartículas de señal en diversos aumentos. Se indican barras de escala de 500, 20 y 5 µm. Las nanopartículas de señal de oro se observan como áreas de color blanco.

La **Figura 11** muestra el proceso de transferencia capa a capa de una membrana de polímero termosensible a la superficie del sustrato de silicio macroporoso. **A:** Muestra una representación esquemática de este proceso: primero, el sustrato de silicio se recubre con la película 1 (PEI (PSS/PAH)₁₀ PSS), mientras que la película 2 (PEI (PSS/PDADMAC)₁₂) se forma sobre un sustrato de sacrificio poli (metilmetacrilato) (PMMA); ambas películas se unen luego a través de interacción electrostática y presión; por último, el sustrato de sacrificio se elimina por disolución o por desprendimiento mecánico para llegar a la película final. **B:** Muestra imágenes SEM tomadas durante cada paso de este proceso, con el grosor de la película final medido en aproximadamente 60-100 nm.

- 40 La **Figura 12** muestra imágenes SEM de la película termosensible dopada con nanorods de oro antes (**A**) y después (**B**) de la irradiación con un láser de 980 nm (0,3 W/cm2). Las rupturas en la película son claramente visibles después de la irradiación con láser.
- La **Figura 13 A E:** Muestra imágenes SEM del sustrato del depósito de señal cargado con nanopartículas de señal en las cavidades de micropilares y con la película termosensible 2 presente en la superficie. Se muestran barras de escalas 2, 5 y 10 µm. Las rupturas en la película son visibles después de la iluminación con láser (D y E).
- La **Figura 14** muestra una gráfica de la relación de absorción en función del tiempo para la sonda coincidente base 50 70 (cuadrados); sonda no coincidente base 70 (círculos); sonda coincidente base 140 (triángulos verticales); y sonda no coincidente base 140(triángulos invertidos). Se observa un claro aumento dependiente del tiempo en la relación Abs₆₂₀/Abs₅₃₈ para ambas sondas coincidentes, que supera significativamente la línea base cercana, observándose un cambio mínimo de absorción para las sondas no coincidentes. Los resultados indican una aglomeración de nanopartículas específicas objetivo en las que se ha discriminado una única diferencia de 55 nucleótidos.

La **Figura 15** muestra (panel izquierdo) una gráfica de la relación Abs620 / Abs538 contra el tiempo en minutos para la sonda de coincidencia antes del calentamiento (curva inferior) y después del calentamiento (curva superior); y (panel de la derecha) una gráfica de la relación Abs₆₂₀/Abs₅₃₈ contra el tiempo en minutos para la sonda no coincidente antes del calentamiento (curva inferior) y después del calentamiento (curva superior).

La **figure 16** muestra un diagrama esquemático de la zona de amplificación de la señal (cámara de retención) en la que se muestran nanopartículas de detectores aglomerados entrando desde la izquierda y encontrando una pluralidad de microesferas cargadas con medios de señalización (mostrados debajo de una fuente de luz láser "hv" representada por una bombilla). Las nanopartículas aglomeradas se asocian estrechamente con las microesferas. A la derecha de las microesferas, se muestra una pluralidad de sílice o perlas de vidrio en una formación muy

65

60

5

20

30

compacta, que tiene un diámetro mayor que las microesferas. Las perlas actúan para retener las microesferas intactas. La absorción de luz láser por las nanopartículas aglomeradas provoca la resonancia de plasmón y el calentamiento de las nanopartículas, lo que a su vez provoca la ruptura de las capas de las microesferas termosensibles, lo que permite que los medios de señal se escapen. Los medios de señal pasan a través de las perlas hacia la derecha en la dirección de la flecha, facilitándose el flujo mediante una microbomba (no se muestra).

La **Figura 17** muestra una representación esquemática de la liberación de medios de señal activados por nanopartículas aglomeradas desde una microesfera. El panel de la izquierda muestra una microesfera que tiene una capa de un polímero termosensible y un núcleo que contiene medios de señal (por ejemplo, moléculas fácilmente detectables). El panel central muestra la microesfera ahora rodeada de nanopartículas aglomeradas, muchas de las cuales están en contacto cercano con la superficie de la cubierta de la microesfera. El panel de la derecha muestra microesferas y nanopartículas aglomeradas ahora iluminadas por una fuente de luz (por ejemplo, un diodo láser que tiene una longitud de onda correspondiente a la frecuencia de resonancia de las nanopartículas aglomeradas se calientan por la fuente de luz y el calor se transfiere a la cubierta de la microesfera, lo que provoca su descomposición, y la liberación de los medios de señal del núcleo de la microesfera.

La **Figura 18** muestra **A**) partículas empaquetadas dentro de los canales de polímero de olefina cíclica (COP) en el que perlas de vidrio de 75 µm de diámetro obstruyeron el canal, reteniendo así microesferas cargadas con dextrano-FITC; y **B**) liberación de dextrano-FITC de las microesferas (comparar antes del láser a la izquierda con después del láser a la derecha).

La **figura 19** muestra un diagrama esquemático de un dispositivo integrado de la invención que ilustra la relación entre los diferentes módulos. El panel superior muestra una vista superior del dispositivo integrado. El panel inferior muestra el dispositivo en vista en perspectiva. La entrada de muestra se puede observar a la izquierda. Moviéndose hacia la derecha, se observa el filtro SIMBAS, el calentador ("ΔT"), el área de almacenamiento de la sonda de bloqueo, la batería, el detector de la sonda de nanopartículas ("AuNP"), el diodo emisor de luz (LED), la matriz de microcápsulas, el panel de ensayo de flujo lateral (LFA) y la bomba.

30 Descripción detallada del invento

Con el fin de describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

35 Nanopartículas

5

10

15

20

Como se utiliza en este documento, "nano partícula" se refiere a una partícula que tiene una escala nanométrica, y no pretende reflejar ninguna limitación de forma específica. Las "nanopartículas" abarcan nanoesferas, nanotubos, nanoboxes, nanoclusters, nanorods y similares. En ciertas incorporaciones, las nanopartículas y/o núcleos de nanopartículas contempladas en este documento tienen una geometría generalmente poliédrica o esférica. Las referencias al "diámetro" de una nanopartícula o un núcleo de nanopartículas generalmente se consideran la dimensión más larga de la nanopartícula o el núcleo de nanopartículas, respectivamente. Para las nanopartículas que tienen una geometría sustancialmente poliédrica o esférica, la dimensión más corta a través de la partícula estará típicamente dentro del 50% de la dimensión más larga a través de la partícula y puede estar, por ejemplo, dentro del

45 25% o 10%.

Como se utiliza en este documento, "corona" se refiere a una capa o recubrimiento, que puede cubrir parcial o completamente la superficie expuesta del núcleo de las nanopartículas. La corona incluye una pluralidad de ligandos unidos covalentemente al núcleo de la nanopartícula. Por consiguiente, la corona puede considerarse como una capa

- 50 orgánica que rodea o envuelve parcialmente el núcleo metálico. En ciertas incorporaciones, la corona provee y/o participa en la pasivación del núcleo de la nanopartícula. Por tanto, en ciertos casos, la corona puede incluir una capa de revestimiento suficientemente completa para estabilizar el núcleo. En determinados casos, la corona facilita la solubilidad, como la solubilidad en agua, de las nanopartículas.
- 55 Las nanopartículas son partículas pequeñas, por ej. grupos de átomos de metal o semiconductores, que pueden usarse como sustrato para inmovilizar ligandos.

Como se utiliza en este documento, el término "nanopartícula detectora" se refiere a una nanopartícula que está funcionalizada con una o más sondas específicas para un analito objetivo de interés. Preferiblemente, las nanopartículas tienen núcleos que tienen diámetros medios entre 10 y 100 nm, más preferiblemente entre 20 y 60 nm. Cuando los ligandos se consideran además de los núcleos, preferiblemente el diámetro medio total de las partículas está entre 22 y 70 nm, más preferiblemente entre 30 y 60 nm y lo más preferiblemente entre 40 y 50 nm. El diámetro medio se puede medir utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, como la microscopía electrónica de transmisión.

65

Como se utiliza en el presente documento, el término "nanopartícula de señal" se refiere a una nanopartícula que está

destinada a funcionar como una molécula de señal. Esta señal puede surgir como resultado de las propiedades intrínsecas de la nanopartícula, por ejemplo, las propiedades ópticas dependientes de la distancia de las nanopartículas de metales nobles, o mediante la incorporación de una etiqueta detectable. Preferiblemente, las nanopartículas tienen núcleos con diámetros medios entre 5 y 30 nm, más preferiblemente de 15 nm. Cuando los

5 ligandos se consideran, además de los núcleos, preferiblemente el diámetro medio total de las partículas está entre 7 y 40 nm, más preferible entre 10 y 30 nm y lo más preferible entre 15 y 20 nm. El diámetro medio se puede medir utilizando técnicas bien conocidas, como la microscopía electrónica de transmisión.

El material del núcleo puede ser un metal o un semiconductor y puede estar formado por más de un tipo de átomo.
 Los núcleos de nanopartículas también pueden formarse a partir de aleaciones. Preferiblemente, el material del núcleo es un metal seleccionado de Au o Ag. Los núcleos de las nanopartículas constan de al menos 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro) para proporcionar diámetros de núcleo en el rango nanométrico.

En algunas incorporaciones, la nanopartícula o su ligando pueden incluir una etiqueta detectable. La etiqueta puede
 ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o el ligando. La etiqueta puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de ese elemento de la nanopartícula o al estar vinculada, conjugada o asociada con una porción adicional que es detectable. Los ejemplos preferidos de etiquetas incluyen una etiqueta que es un grupo fluorescente o un tinte. Los grupos fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil-rodamina, Texas-Red, Cy3, Cy5, etc., y pueden detectarse por excitación de la etiqueta fluorescente y detección de la luz emitida utilizando espectroscopía de dispersión Raman (YC Cao, R. Jin, CA Mirkin, Science 2002, 297: 1536-1539).

Aglomeración

Como se utiliza en este documento, "aglomeración" se refiere a la formación de aglomerados de nanopartículas detectoras. Los "aglomerados" son un conjunto de nanopartículas detectoras unidas por interacción física entre las sondas de nanopartículas y el analito objetivo de interés. Como el analito objetivo es el "puente" físico entre las nanopartículas de detectores discretos, la aglomeración solo puede ocurrir cuando el analito objetivo está presente. Los aglomerados no son unidades fijas, y pueden cambiar de tamaño y forma; por ejemplo, los aglomerados grandes pueden descomponerse en aglomerados más pequeños, o los aglomerados pequeños pueden unirse para formar aglomerados más grandes.

Polímero termosensible

Como se utiliza en el presente documento, "polímero termosensible" o "polímero sensible a la temperatura" se refiere a un polímero o combinación de polímeros que muestran un cambio drástico y discontinuo de sus propiedades físicas con la temperatura. En particular, el polímero termosensible puede ser un polímero que muestre un cambio en la solubilidad en agua o solución acuosa con la temperatura. Los ejemplos específicos incluyen: poli (sulfonato de estireno) (PSS), poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC), poli (alilamina) (PAH), poli (N-isopropilacrilamida), poli [2- (dimetilamino) etil metacrilato] (pDMAEMA), hidroxipropilcelulosa, poli (vinilcaprolactama) y polivinil metil éter.

40

45

55

65

Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Desarrollo de sondas de bloqueo y detección para la detección de mutaciones BRAF.

Las mutaciones en el gen BRAF se encuentran en más del 45% de los melanomas, y hasta el 80% de estos son la mutación de base simple T1799A (V600E). Se cree que la detección del estado de esta mutación BRAF es un sustituto confiable para las pruebas de tumores.

Para detectar el estado de mutación BRAF, se desarrollaron dos sondas:

1) Una sonda de bloqueo, complementaria a la cadenaantisentido de la secuencia de ADN mutada de interés; esta sonda se une preferentemente a la cadena antisentido de la secuencia de ADN mutada después de la desnaturalización por calor del ADN de doble cadena (dsADN).

La sonda de bloqueo es corta y se proporciona en exceso, de modo que las cinéticas de unión favorecen en gran medida la formación de la sonda de bloqueo: cadena antisentido en lugar de la renaturalización de la secuencia mutada dsDNA. Esto da como resultado el enriquecimiento de la cadena con sentido de la secuencia de ADN mutada para su posterior detección por parte del dispositivo.

2) Una sonda de detección, complementaria a la cadena sentido de la secuencia de ADN mutada y que forma la base del evento de aglomeración. Esta sonda se une selectivamente a la secuencia de ADN mutada pero no a la secuencia de ADN de tipo salvaje.

. .

Se sintetizaron secuencias de BRAF mutadas y de tipo salvaje, y su unión con sondas de detección para BRAF de tipo salvaje y mutante se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) en tampón PBS. Se encontró que la secuencia BRAF mutada se unía preferentemente a la sonda BRAF mutante (Figura 1A) en lugar de a la sonda de tipo salvaje. Sonda BRAF mutante:

5

5'-TGG TCT AGC TAC AGA GAA ATC TCG -3 '(SEC ID NO: 1); Sonda WT BRAF: 5'-TGG ATC CAG ACA ACT GTT CAA ACT -3 '(SEC ID NO: 2) (corresponde a los primeros 24 nucleótidos de la secuencia sintética). De manera similar, la sonda BRAF mutante se une más fuertemente a la secuencia BRAF mutada que a la secuencia BRAF de tipo salvaje (Figura 1B). Estos datos demuestran que las sondas diseñadas pueden unirse específicamente a secuencias mutadas de interés.

10

También se probaron varias químicas de sonda diferentes (ADN, 2'-o-Me y LNA) (Figura 1C), para determinar la fuerza relativa de la unión de la sonda mutante al gen BRAF mutante para cada una. Sonda ADN Exigon: 5'-AT CGA GAT TTC TCT GTA GCT AG-3 '(SEC ID NO: 3); Sonda 2'-o-metil:

15

20

30

35

5'-AT CGA GAT TTC TCT GTA GCT AG-3 (SEC ID NO: 4) (ambas se unen a la cadena antisentido de ADN mutado 70mer); sonda mutante de LNA: 5'-TG GTC TAG CTA CAG AGA AAT CTC G -3 '(SEC ID NO: 5) (se une a la cadena sentido del ADN mutado 70-mer). La comparación de las curvas de unión determinó las constantes de disociación (KD) para las diferentes químicas de la sonda como: ADN = 2.41 nM; 2'-o-Me = 1,81 nM; LNA = 7,55 nM. A partir de estos datos, se determinó que la química de la sonda 2'-o-Metil es la preferida.

Ejemplo 2 - Modelado in silico de las características del dispositivo INDICATE.

Para optimizar las características funcionales del dispositivo, se usó el modelado computacional para simular el 25 dispositivo INDICATE in silico.

Primero, se definieron las ecuaciones matemáticas individuales responsables de cada uno de los componentes individuales, y luego se combinaron utilizando algoritmos genéticos (GA) (Goldberg y Deb, 1991, Fundamentos de los algoritmos genéticos en Fundamentos de los algoritmos genéticos, GJE Rawlins, Ed. Morgan Kaufmann, San Mateo, CA). Tales técnicas ya están bien establecidas en la optimización del diseño de dispositivos plasmónicos (Sukharev y Seideman, Nano Lett, 2006, Vol. 6, No. 4, pp 715-719).

Se utilizaron simulaciones para optimizar el dispositivo con respecto a: 1) alta sensibilidad (es decir, una tasa de falsos negativos baja); 2) alta relación señal/ruido; y 3) alta tasa de amplificación de la señal de entrada. El análisis se realizó mediante enfoques multifísicos dentro del software de computación numérica Matlab (MathWorks) y Comsol Multiphysics (Comsol AB).

La separación del plasma de los glóbulos rojos en el módulo de muestra se modeló utilizando métodos probabilísticos para el proceso de filtración (Roussel et al., Phys Rev Lett, 2007, Vol. 98, pp 114502). Se simuló la fusión electrotérmica 40 de templado y renaturalización del ADN en el módulo de lisis utilizando el modelo de termodinámica de dos estados (Owczarzy et al., Biopolymers, 1997, Vol. 44, No. 3, pp 217-239). La energía vinculante asociada con la unión del ADN mutado a las sondas en la zona de amplificación de la señal se modeló usando el método de Berg von Hippel (Berg y von Hippel, J Mol Biol, 1987, Vol. 193 pp 723-750), mientras que la transferencia de energía entre El láser y las nanopartículas detectoras aglomeradas del polímero termosensible fueron modelados por la teoría clásica de la 45 transferencia de calor (Baffou y Quidant, Laser Photonics Rev, 2013 Vol. 7, pp 171-187; Hohenester y Trügler, Comput Phys Commun, 2012, Vol. 183, pp. 370-381).

Para proporcionar un rango de rendimiento inicial para el dispositivo, el tamaño del aglomerado formado cuando la cadena de ADN de sentido mutado se une a las nanopartículas del detector se modeló de la siguiente manera:

$$S = N_{pNP^{\pi}} (\Phi_{AgNP} + \frac{p}{2})^2$$

donde S representa la superficie cubierta por el aglomerado que contiene varias nanopartículas de sondas unidas al ADN (N_{pNP}), Φ_{AqNP} representa el diámetro de las nanopartículas de plata, y p es la distancia entre partículas.

55

Esto se combinó con un modelo de iluminación uniforme, basado en trabajos previos teóricos y experimentales (Baffou et al., Appl Phys Lett, 2009, Vol. 94 pp 153109-153103):

$$\Delta T \approx \frac{\sigma_{abs^{I}}}{\kappa} \frac{\ln(1+\sqrt{2})}{\pi} \frac{s}{p^{2}}$$

60

donde σ_{abs}, I, κ, S y p son el coeficiente de absorción de los NP de la sonda, la intensidad de potencia proporcionada por la fuente de LED, la conductividad térmica del aglomerado, el tamaño lateral del aglomerado y la distancia entre partículas, respectivamente.

La Figura 2A muestra ΔT en función de la distancia entre las nanopartículas del detector (en número de pares de bases) respecto al número de partículas de sonda aglomeradas (N_{pNP}) cuando se iluminan uniformemente con un láser LED de 100mW (intensidad de 1 x 107 W/m2). A partir de este análisis, se determinó que un aglomerado de 50NPs, en el que d_{pNP-pNP} es> 50 nm (es decir,> 15 pares de bases), resultará en un aumento de temperatura de más de 40°C por encima de la temperatura ambiente.

Al modelar los microporos cilíndricos con dimensiones fijas (10 µm de diámetro por 500 µm), para un rango de concentración de nanopartículas de señal de 10⁻⁵ - 5 x 10⁻⁵ mol/L, podemos perfilar el número mínimo de microporos que se requieren abrir contra el número de nanopartículas de sonda contenidas en aglomerados. La Figura 2B muestra

- 10 el número de microporos necesarios para abrir en función de la concentración de las nanopartículas de señal en los microporos y el número de nanopartículas de detectores aglomerados. Cabe señalar que, en el caso de micropocillos de sustrato de silicio macroporoso, las cavidades tienen un diámetro de aproximadamente 1 µm y una profundidad de aproximadamente 10 µm. En este caso, la aplicación del enfoque anterior para calcular el número de poros abiertos para una señal positiva da una cifra de 7 (concentración de nanopartículas 0,1 mol/L, número de nanopartículas por
- 15 poro 4x109). Por consiguiente, las figuras anteriores, aunque ilustrativas de ciertas incorporaciones, no limitan la invención como se define más adelante en este documento.

Sobre la base de que cada microporo puede contener entre 0,2 y 1 x 10⁹ nanopartículas de señal, se determinó que al menos 8 microporos deberían activarse para generar una señal visible (8 x 10⁹ nanopartículas de señal). Este umbral de señal visible ayuda a evitar falsos positivos en el dispositivo en caso de que se abra un solo poro. Sin embargo, como se vio anteriormente, para cavidades de dimensiones de 1 µm por 10 µm, el umbral correspondiente puede calcularse como 7 poros abiertos.

Para que esto ocurra, se requieren al menos 50 nanopartículas de sonda por aglomerado por microporo. Esto corresponde a 400 copias de ADN de cadena sentido mutado en total para una señal visible. Suponiendo una eficiencia del dispositivo del 25%, se obtiene un límite teórico de detección (LOD) de 1.600 copias de ADN mutado o 16.000 copias por ml de sangre. Esto se encuentra dentro de los niveles informados de copias de ADN KRAS mutadas o copias BRAF mutadas en la sangre de pacientes con cáncer (se informa entre 50 y 180.000; Spindler et al., Clin Cancer Res, 2012, Vol. 18, páginas 1177-1185).

30

5

El modelado de este tipo también se puede utilizar para adaptar la fabricación del dispositivo para que cumpla con los requisitos específicos de detección o de mercado. Por ejemplo, si bien un dispositivo para fines de diagnóstico necesita de una alta sensibilidad, uno que facilite la toma de decisiones clínicas para la administración de terapias dirigidas costosas, puede beneficiarse de una alta especificidad (es decir, una baja tasa de falsos positivos).

35

40

Ejemplo 3 - Validación de la separación de sangre microfluídica.

La filtración de la muestra de sangre completa para dar plasma se realiza mediante el sistema de análisis de sangre de microfluidos integrado y autoalimentado (SIMBAS) (Dimov et al., Lab Chip, 2011, Vol. 11, pp 845-850), que es más eficiente y económico que otras tecnologías de separación de sangre basadas en membrana.

El sistema SIMBAS se adaptó para aceptar volúmenes más altos (100 µl), a través de la modificación del diseño. Los principales cambios en el diseño original (es decir, los descritos en la referencia anterior de Dimov et al., 2011) fueron los siguientes.

45

Se usó una técnica de fabricación diferente para los chips. En este caso, se empleó una técnica rápida y simple de laminación de películas delgadas de plásticos múltiples (PMMA, PSA, COP).

Las dimensiones del pozo se escalaron a un volumen de 60 microlitros para obtener 40 microlitros de plasma de una 50 muestra de sangre completa de 100 microlitros.

Las relaciones de aspecto del canal se adaptaron a las restricciones del proceso de fabricación.

Las dimensiones finales del canal fueron diseñadas para reducir la resistencia hidráulica del chip.

55

Se suministró una mejora particular en forma de ausencia de bordes afilados en las paredes laterales que se cambiaron a bordes mezclados. Todos los bordes en el camino propuesto se han combinado para evitar la agregación de plaquetas y la formación de coágulos que podrían bloquear fácilmente el flujo.

- Finalmente, los segmentos del canal ubicados en la entrada y la salida del pozo se han modificado con una forma de difusor y boquilla, respectivamente. Por un lado, el difusor ralentiza el flujo cuando se aproxima al borde del pozo para obtener un proceso de llenado suave (homogeneidad al llenar el pozo). Por otro lado, la boquilla acelera el plasma a la salida del pozo, lo que mejora el flujo de plasma separado y, de hecho, la eficiencia de separación.
- La Figura 3 muestra la separación del plasma sanguíneo transparente de una muestra de sangre completa mientras aumenta el tiempo, lo que demuestra la capacidad de separación de la sangre en el dispositivo.

Ejemplo 4 - Detector de síntesis de nanopartículas y funcionalización.

- Las nanopartículas de oro (AuNPs) se sintetizaron de acuerdo con el método de Turkevich (Turkevich et al., Discuss 5 Faraday Soc, 1951, Vol. 11, pp 55-75), para producir partículas con un diámetro medio de 13,3 ± 1,2 nm (estimado por análisis sobre 100 nanopartículas). La caracterización UV-Vis mostró la banda de plasmón superficial localizada a 519 nm (Figura 4). Se utilizaron nanopartículas detectoras de oro durante el desarrollo del prototipo del dispositivo, por su química de superficie estable. En el dispositivo final, se utilizarán nanopartículas detectoras de plata.
- Los AuNPs estabilizados con citrato se funcionalizaron con ADN monocatenario (ADNss) según protocolos recientes 10 (Mirkin et al., Anal Chem, 2006, Vol. 7, pp 8313 8318). Los AuNPs estabilizados con ADN exhiben estabilidad coloidal en una solución acuosa que contiene surfactante aniónico - dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,01 wt%, según lo confirmado por espectroscopia UV-Vis. La banda de plasmón redshshings ~3 nm en todas las muestras después de la unión al ADN sugiere la formación de una capa molecular alrededor de la superficie de las nanopartículas. El análisis 15 de TEM confirma la formación de una cubierta molecular de un espesor de ~1,4 nm (Figura 5).

Ejemplo 5 - Validación de la aglomeración de nanopartículas del detector en presencia de ADN objetivo mutado.

- 20 La Figura 6 muestra una representación esquemática de la vinculación "sandwich" de dos sondas separadas entre 15 y 50bp, usada para interrogar concentraciones variables de un analito de ADN objetivo. Cuando ambas sondas se conjugan con nanopartículas detectoras, se hibridarán con sus respectivas regiones complementarias de la cadena de ADN de sentido mutado para formar un puente entre nanopartículas discretas, lo que induce la aglomeración de las nanopartículas detectoras que flotan libremente.
- 25

La aglomeración se midió con el cambio de color y la tasa de Abs (620/520) con el tiempo (Figura 7). La hibridación con el ADN no coincidente de una sola base (Figura 7D - 7F) creó una agregación menos pronunciada y tiempos de hibridación más largos en comparación con la secuencia complementaria completa (Figura 7A - 7C), lo que demuestra que las nanopartículas funcionalizadas con sondas de oligonucleótidos pueden aglomerarse de una manera específica

- 30 para distinguir entre mutaciones de una base simple. La Figura 7G - 7I muestra la cinética comparativa para diferentes concentraciones de ADN objetivo coincidente (es decir, mutante) y no coincidente (es decir, tipo salvaje), en el que existen claras diferencias entre el perfil cinético de las secuencias coincidentes y no coincidentes.
- Dos tipos de AuNPs conjugados con sondas denominadas "1triplex" (HS-3'-T10-CTT GTT TTC-5') (SEC ID NO: 6) y 35 "2triplex" (HS-5'-T10-GAT TTT CTT C- 3') (SEC ID NO: 7) se prepararon y utilizaron como soluciones madre. Las dos partículas complementarias se mezclaron en un tampón que contenía PBS 10 mM. pH 7.4. 0.137 M NaCl v 2.7 mM KCI, y NaCl extra (0.2 M). Utilizamos tres concentraciones diferentes de ADN coincidente y no coincidente, es decir, 5, 25 y 50 nM, completando un total de 6 experimentos. Independientemente de la concentración de analito, el ADN no coincidente de base simple mostró una agregación menos pronunciada y un tiempo de hibridación más prolongado, 40 en comparación con la secuencia coincidente.

La disminución de la concentración de analito de ADN a la mitad, de 50 a 25 nM, aumenta el tiempo de hibridación de 9 a 12 minutos. Los valores relativamente grandes de la tasa Abs620/520 (0,4), en Th, para ambas concentraciones de secuencias coincidentes, sugieren un buen desempeño del sensor. La disminución adicional de la concentración de analito hasta 5 nM tiene poco efecto en el Th, pero el pequeño valor de Abs620/520 = 0,18, en Th, sugiere un bajo 45 rendimiento en las condiciones particulares de este ejemplo. Por tanto, el sensor plasmónico pudo diferenciar el polimorfismo de una base simple con la concentración de analito de 25 nM en menos de 15 minutos.

- Con el objetivo de mejorar aún más el límite de detección de la secuencia coincidente, evaluamos el rendimiento 50 variando la concentración de sal. Se prepararon dos tipos de AuNPs conjugados con 1triplex y 2triplex y se utilizaron como soluciones madre. Las dos partículas complementarias se mezclaron en un tampón que contenía PBS 10 mM, pH 7,4 y 50 nM de secuencias coincidentes y no coincidentes. Utilizamos tres concentraciones diferentes de NaCI, como son, 0.2, 0.3 y 0.4 M, dando un total de 6 experimentos. Con el aumento de una concentración de NaCl, el tiempo de hibridación disminuye. De hecho, la alta concentración de NaCl (0,4 M) acorta el Th (6 minutos), pero la
- 55 especificidad del sensor se ve afectada va que la hibridación de la secuencia no coincidente se vuelve significativa. Tenga en cuenta que queremos mantener la mayor diferencia posible entre coincidencia y no coincidencia en el menor tiempo de hibridación posible. Por consiguiente, se encontró que el límite superior de la concentración de sal en las condiciones de este ejemplo particular es de 0,3 M.

60 Conclusiones y pronósticos:

El sensor plasmónico puede diferenciar una mutación de una base simple a una concentración de 25 nM o superior, en menos de 15 minutos.

- La concentración óptima de sal en los experimentos de detección se encontró cerca de 0,2 M.
- 65

La concentración óptima de partículas [NPs] en los experimentos de detección se encontró que era 1,5 nM.

Se contempla una evaluación adicional de la detección de moléculas de ADNss más largas (100 y 250 unidades) utilizando el sistema de sándwich.

5 Se contempla el uso de partículas con mayor coeficiente de absorción (nanorods) que permitan mejorar el rendimiento en términos de tiempo de detección (tiempo de hibridación) y sensibilidad (límite de detección).

Ejemplo 6 - Síntesis y funcionalización de nanopartículas de señal.

- 10 Las nanopartículas de señal de oro se sintetizaron de acuerdo con el método de Turkevich (Turkevich et al., *Discuss Faraday Soc,* 1951, Vol. 11, pp 55-75), y se funcionalizaron con un polioxietileno nonil fenil éter terminado en tiol (IgeSH). Esta molécula es anfifílica y hace que las nanopartículas sean estables frente a la aglomeración.
- Estas señales de NP se pueden secar y volver a disolver en agua sin una aglomeración significativa. La Figura 8 muestra la estructura química del polioxietilen nonil fenil éter terminado en tiol (IgeSH), una representación esquemática del proceso reversible de secado/hidratación de las nanopartículas señalizadas funcionalizadas con IgeSH, y el espectro UV-Vis de las nanopartículas señalizadas funcionalizadas IgeSH en agua antes y después del secado (ver Mao et al., *Anal. Chem.*, 2009, Vol. 81, pp. 1660-1668).
- Las nanopartículas de oro se pueden funcionalizar con un segundo ligando compuesto por cadenas lineales de poli (etilenglicol) modificadas con un grupo tiol en un extremo y una molécula de biotina en el otro (ver Li et al., J *Phys Chem B.*, 2006, Vol.110 (32), pp. 15755-15762). Por consiguiente, el grupo tiol se unirá fuertemente a la superficie de oro, permitiendo la funcionalización del doble ligando. Las moléculas de biotina se utilizarán para la inmovilización en la banda de retención que se funcionalizará con estreptavidina. Para estabilizar las nanopartículas y evitar interacciones no específicas, se necesita de una proporción adecuada de los dos ligandos IgeSH y biotina.

Ejemplo 7 - Carga de nanopartículas de señal en el depósito de señal y síntesis de la membrana de polímero termosensible.

- 30 Se seleccionó un sustrato de silicio macroporoso para usar como depósito de señal; estos son fabricados por grabado electroquímico de obleas de silicio tipo p. La Figura 9 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) del sustrato de silicio macroporoso con las dimensiones aproximadas de los micropilares indicados. Estos micropilares huecos tienen un volumen de aproximadamente 8 μm3 (r = 0,5 μm, h = 10 μm).
- 35 Las nanopartículas de señal se cargaron en los micropilares de sustrato desde arriba, para formar un depósito de señal. La Figura 10 muestra imágenes SEM del sustrato del depósito cargado con nanopartículas de señal en diversos aumentos; las nanopartículas de señal de oro se observan como áreas de color blanco.
- Los sustratos de silicio se oxidan para tener SiO2 en la superficie. Por consiguiente, es posible envolver la superficie con polímeros cargados positivamente. Se utilizó un enfoque de capa a capa para desarrollar la película termosensible a partir de capas alternas de poli (sulfonato de estireno) (PSS) y poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC). Estos polielectrolitos se autoensamblan debido a las interacciones electrostáticas y se sabe que se hinchan y rompen a más de 60°C si el número de capas en la película es impar, debido a la repulsión entre capas que resulta en cargas no compensadas.
- 45

En la Figura 11A se muestra una representación esquemática de la transferencia capa a capa de una película sobre un sustrato de silicio macroporoso mediante la eliminación de un sustrato de sacrificio. Primero, el sustrato de silicio se recubrió con la película 1 (PEI (PSS/PAH)₁₀ PSS), mientras que la película 2 (PEI (PSS/PDADMAC)₁₂) se formó sobre un sustrato de sacrificio de poli (metilmetacrilato)(PMMA). Ambas películas fueron luego unidas a través de interacciones electrostáticas y presión. Einalmente, se eliminó el sustrato de sacrificio, ya sea por disolución con un

50 interacciones electrostáticas y presión. Finalmente, se eliminó el sustrato de sacrificio, ya sea por disolución con un solvente orgánico (CH2Cl2) o por peeling mecánico.

La Figura 11B muestra imágenes de SEM tomadas durante los tres pasos de deposición de la película 1, adhesión de la película 2 y eliminación del sustrato de PMMA. Las películas producidas de esta manera se pueden formar a diferentes grosores simplemente controlando el número de capas y la fuerza iónica de la solución de polielectrolito, etc. El espesor de la película medido a partir de estas imágenes es de alrededor de 60-100 nm.

Ejemplo 8 - Validación de la descomposición del polímero por irradiación.

- 60 Para probar la capacidad de respuesta de la película al calor/luz, se depositaron nanopartículas de señal en las cavidades de un sustrato de Si macroporoso y las cavidades se cubrieron con una película (PSS/PDADMAC)₁₂ dopada con nanorods de oro.
- Luego se iluminó con un láser de 980nm (0,3w/cm2), lo que dio lugar a la formación de agujeros en las películas. La
 Figura 12 muestra una película (PSS/PDADMAC)₁₂ dopada con nanorods de oro antes y después de la iluminación con láser, con rupturas en la película claramente visibles inducidas por la irradiación. De manera similar, la Figura 13

muestra imágenes SEM del sustrato de Si con nanopartículas de señal acumuladas dentro de los poros y la película termosensible 2 en la superficie. Las rupturas en la película son visibles después de la iluminación con láser (**D** y **E**).

Ejemplo 9 - Sondas de detección y discriminación SNP

Funcionalización de AuNP con secuencias EGFR.

En este estudio, nos enfocamos en la mutación EGFR que se relaciona con el NSCLC. Para detectar el objetivo del analito mutado, se funcionalizó AuNP con un diámetro de 63 nm con el correspondiente ssADN terminado en tiol (sondas de captura). Se prepararon dos lotes de AuNPs; estabilizado con sondas de captura MUT y WT que constaban

- (sondas de captura). Se prepararon dos lotes de AuNPs; estabilizado con sondas de captura MUT y WT que constaban de las siguientes secuencias:
 Sonda de captura EGFR 5'(WT): 5'-A AAA TCT GTG 10T-SH-3' (SEC ID NO: 8)
 Sonda de captura EGFR 3'(MUT): 5'-SH-10T GTT TGG C<u>CCG</u>CC C-3' (SEC ID NO: 9)
 Para aumentar la afinidad de la sonda de captura con el objetivo, introdujimos una modificación <u>2'-OMe</u> en 3 bases en la sonda de captura MUT. Los AuNPs estabilizados con sondas de captura, ya sea WT y MUT, son coloidalmente
- 15 la sonda de captura MUT. Los AuNPs estabilizados con sondas de captura, ya sea WT y MUT, son coloidalmente estables durante un período prolongado de tiempo en solución tampón (resultados no mostrados).

Estudio de Sensibilidad y Selectividad - 23baseAnalito

- Se utilizaron secuencias de analitos con una longitud de 23 bases para el ensayo: 23base coincidente: 5'-CAC AGA TTT TGG GC<u>G</u> GGC CAA AC-3'(SEC ID NO: 10) 23base no coincidente: 5'-CAC AGA TTT TGG GC<u>T</u> GGC CAA AC-3'(SEC ID NO: 11)
- La sensibilidad y la selectividad del ensayo se realizaron hacia la mutación de una sola base utilizando Coincidencia y no Coincidencia. Dos tipos de NP se mezclaron en PBS con un extra de 0,2 M NaCl en una micro cubeta UV. La concentración de [Au0] fue de 0,1 mM en todos los experimentos. Luego, se adicionó una alícuota de analito a la solución. La adición de las partículas fue seguida por espectroscopia UV-Vis. El grado de agregación se calculó como una relación de absorción a 620 y 538 nm. El rango de concentración para las secuencias de analito estuvo entre 50 y 0,05 nM.
- 30

5

Aunque pudimos detectar la coincidencia y la no coincidencia hasta 50 pM, no se observó selectividad entre la coincidencia y la no coincidencia.

Para confirmar los resultados de UV-Vis, también se realizaron mediciones de dispersión de luz dinámica para conocer el tamaño de los agregados.

El tamaño de los NP iniciales fue de 86,3 y 72,9 nm para AuNP@MUT y AuNP@WT, respectivamente. Después de 30 minutos de agregación, el tamaño de los aglomerados fue de 250 nm aproximadamente, para las secuencias de coincidencia y no coincidencia.

40

Estudio de sensibilidad y selectividad: Analito base 70 y base 140

En paralelo al estudio anterior, verificamos el rendimiento del ensayo hacia la detección de secuencias largas de ADN, 70 bases.

50 Método estándar

AuNPs@WT y AuNPs@MUT fueron mezclados en una microcubeta UV con PBS y NaCl. Finalmente, se agregaron $2,5 \,\mu$ L de [analito] = 1 μ M de solución a la mezcla, para alcanzar una concentración de 5 nM. El proceso de hibridación fue seguido por espectroscopia UV-Vis.

55

60

El ensayo no pudo detectar secuencias largas. Especulamos que el proceso de hibridación se inhibe debido a la estructura secundaria de las secuencias de coincidencia y no coincidencia.

Método de pre-incubación

Para verificar si la estructura secundaria de coincidencia y no coincidencia inhibe la agregación de partículas, rediseñamos el ensayo para promover la hibridación de la secuencia larga con la sonda de ADN-AuNP antes de agregar un segundo lote de nanopartículas. Al hacerlo, el analito base 70 se preincubó (5 nM) con un tipo de sondas AuNP en eppendorf en rodamiento. Después de una hora de incubación, se añadió el otro tipo de AuNP y se dejó de

65 nuevo en el mezclador de rodillos. El proceso de hibridación se estudió mediante espectroscopia UV-Vis. Para confirmar la estabilidad de las partículas en condiciones de mezcla, se llevó a cabo un experimento de control sin

analito. Después de 3 horas de incubación, las diferencias en el color entre los experimentos de coincidencia, no coincidencia y control son claramente visibles a simple vista.

Para confirmar aún más nuestra observación mediante UV-Vis, se realizaron mediciones de DLS para evaluar el 5 tamaño de los agregados durante el proceso de hibridación.

Se determinó el diámetro medio de los agregados en diferentes etapas experimentales. Se encontró que el tamaño de los agregados aumenta con el tiempo solo en presencia de la secuencia coincidente. Para la no coincidente, sin embargo, se observó un ligero aumento, pero a las 3h; y en el experimento de control, se observó que las partículas se mantuvieron estables durante todo el tiempo del experimento.

También verificamos si es posible detectar concentraciones más bajas (0,1 nM) de analito de 70 bases utilizando el método de preincubación. La detección, de hecho, fue posible y la selectividad entre el coincidente y no coincidente fue clara. Sin embargo, al disminuir la concentración del analito aumenta el tiempo de detección.

15

10

El siguiente paso fue detectar secuencias de ADN aún más largas. Los experimentos con secuencias de analito de 140 bases se llevaron a cabo utilizando el método de preincubación. La concentración de analito fue de 5 nM.

Observamos que después de 2 horas de incubación había una clara diferencia entre la secuencia coincidente y no coincidente. Mientras que, en presencia de coincidencia, las NP se agregan completamente; en presencia de no coincidencia, las NP se mantienen estables.

Detección dsDNA 23base - Desnaturalización térmica

- Se estudió la desnaturalización térmica de dsDNA y la detección de ssDNA. Se realizó un estudio cinético utilizando dsDNA como analito, antes del tratamiento térmico. Se observó un ligero aumento en el grado de agregación. Después, en el baño termico (THERMOBATH), la solución se calentó durante 5 minutos a 70°C. Después de eso, el proceso de hibridación se registró por UV-Vis y se calculó el grado de agregación.
- 30 El grado de agregación aumenta después de la desnaturalización térmica, pero no es tan alto como en el caso de la detección de ssDNA. Se encontró que el proceso de rehibridación del ADN compite con la hibridación de las sondas de captura.

Detección de dsDNA 23base - Sonda de bloqueo

35

45

Se realizó un trabajo adicional para detectar una mutación de una sola base en dsDNA en la que una de las secuencias de ssDNA lleva la mutación. Por consiguiente, siguiendo el concepto de PCR, es necesario deshidratar el dsDNA y luego inhibir la renaturalización mediante el uso de una secuencia corta de ssDNA (sonda de bloqueo) que es complementaria al ssDNA libre de mutación (analito antisentido). Tenga presente que, en este escenario, las secuencias de la sonda de bloqueo también son complementarias de la sonda de bloqueo también son complementarias de la sonda de valuer.

40 secuencias de la sonda de bloqueo también son complementarias de la sonda de captura (WT y MUT) ancladas a la superficie de las nanopartículas. Se seleccionaron las siguientes secuencias de sondas de bloqueo, asignadas como BP1 y BP2:

BP1: 5'GCG GGC CAA AC-3' (SEC ID NO: 14) BP2: 5'CAC AGA TTT TGG-3' (SEC ID NO: 15)

Primero, confirmamos que las AuNP permanecen estables en presencia de dsDNA (Analito == Anti-Analito) y los agregados en presencia de ssDNA (Analito - Match o Mismatch). Luego, probamos la capacidad de las secuencias de la sonda de bloqueo para inhibir la formación de dsDNA (Analito == Anti-Analito). La secuencia de Anti-analito se

- 50 incubó con BP1 o BP2, así como con la mezcla de ambos. Luego, se agregó la secuencia de analito que es complementaria a Anti-analito. Después de un período de 15 minutos de incubación, se agregaron AuNPs@WT y AuNPs@MUT y se siguió la cinética de hibridación con UV-Vis. La concentración de la sonda de bloqueo, anti-analito y analito fue de 5 nM.
- 55 Esperábamos observar el desplazamiento de las sondas de bloqueo por el analito y la formación de dsDNA que, a su vez, inhibiría la agregación de partículas. Los resultados, sin embargo, muestran que este no es el caso. La mezcla de BP1 y BP2 puede bloquear eficazmente el Anti-analito, lo que permite que el analito agregue AuNPs@WT y AuNPs@MUT. Curiosamente, BP2 bloquea Anti-analito más eficientemente que BP1 tanto para coincidencia como para no coincidencia.

60

Los resultados mostraron que las sondas de bloqueo se unen fuertemente a Anti-analito y la posterior adición de analito no desplaza las sondas de bloqueo. Con el fin de investigar si el analito añadido a la mezcla que contiene las sondas de bloqueo y el analito (no complementario) se uniría más rápido a las sondas de bloqueo cortas o al analito largo, se realizaron experimentos para la secuencia coincidente y no coincidente, en una concentración de sonda de

65 bloqueo Anti-analito y analito de 5 nM.

Al llevar a cabo el experimento de esta manera competitiva, se observó una ligera diferencia en el grado de agregación entre el coincidente y el no coincidente. Se encontró que la mejor estrategia de bloqueo era el uso de oligonucleótidos cortos. La capacidad de bloqueo de BP2 se encontró que era mejor que BP1.

- 5 A continuación, se investigó la adición de sondas de bloqueo al dsDNA acompañado de un tratamiento térmico para ver si las sondas de bloqueo pueden inhibir la formación de dsDNA una vez que la temperatura disminuye. Primero, formamos dsDNA mezclando analito (coincidencia y no coincidencia) con el Anti-analito. A continuación, agregamos la sonda de bloqueo en PBS/NaCI. La solución se calentó a 65°C en el baño térmico. Después de 10 minutos de calentamiento, esta solución se mezcló con los AuNPs, seguido del registro UV-Vis. Observamos que la agregación
- 10 de las partículas en presencia y ausencia de BP fue muy similar para la secuencia coincidente y no coincidente.

Bloqueo de la Sonda de valoración

Como se observó anteriormente, las sondas de bloqueo pueden bloquear la formación de dsDNA, facilitando la 15 detección de la mutación. Siguiendo esta observación, se puede decir que las sondas de bloqueo pueden tener un mejor desempeño a concentraciones más altas. Sin embargo, observamos que la sonda de bloqueo induce la agregación de nanopartículas de oro en ausencia de la secuencia del analito. Sin desear estar ligados a ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que la sonda de bloqueo, cuando está unida a la sonda de captura en la superficie de la nanopartícula, puede disminuir la repulsión electrostática/estérica entre las nanopartículas, facilitando

- 20 así una agregación no específica. Se estima que la concentración de oligonucleótidos en la superficie de las nanopartículas (WR o MUT) fue de 20 nM, lo que corresponde a 1500 ssDNA por nanopartícula. Por consiguiente, se seleccionó un rango de concentración de la sonda de bloqueo, que se extiende de 1 a 100 nM, para investigar la concentración de BP por debajo, a través y por encima de la concentración de las sondas de captura.
- Observamos que, con el incremento de la concentración de las sondas de bloqueo, la estabilidad coloidal de las 25 nanopartículas disminuye. Curiosamente, a 20 nM de sondas de bloqueo, observamos un punto de inflexión que equivale a la concentración total de la sonda de captura en la superficie de las partículas. A concentraciones aún mayores de la sonda de bloqueo, domina la agregación no específica. Por lo tanto, se seleccionó una concentración de Sonda de bloqueo de hasta 5 nM como óptima en estas condiciones.
- 30

35

Selectividad inducida por la sonda de bloqueo

Finalmente, estudiamos el efecto de la concentración de la sonda de bloqueo en la selectividad del ensavo hacia la mutación de una base simple. Las AuNPs recubiertas con las sondas de captura se hibridaron con las secuencias de las sondas de bloqueo en un rango de concentración entre 0,5 y 5 nM.

La presencia de sondas de bloqueo mejora la selectividad del ensavo hacia la detección de mutaciónes de una base simple. Observamos que, con el aumento de la concentración de BP hasta 3 nM, la selectividad mejora, pero los aumentos adicionales de la BP conducen a una especificidad más pobre. La concentración óptima de 3 nM 40 corresponde a ~6 sondas de bloqueo por sonda de captura. De acuerdo con la presente invención, cuando se emplea una sonda de bloqueo, la relación de la sonda de bloqueo a la sonda de captura puede estar en ciertos casos en el intervalo de 2 a 10, por ejemplo, alrededor de 5 a 7, y en particular alrededor de 6.

Ejemplo 10 - Más objetivos y secuencias de sondas

45

Ejemplos de sondas para la detección de BRAF mutante se describen en el Ejemplo 1. Otros ejemplos de secuencias de genes que pueden servir como analitos objetivo según la presente invención incluyen los genes relacionados con el cáncer EGFR (NCBI Gene ID: 1956) y BRCA1 (NCBI Gene ID: 672). En particular, las sondas pueden servir para la detección de mutantes de EGFR L858R o T790M. A continuación, se muestran ejemplos de sondas de detección EGFR L858R (SEC ID Nos: 16-22):

50

EGFR L858R 140 unidades TS (MM)

5'-GGT-GAA-AAC-ACC-GCA-GCA-TGT-CAA-GAT-CAC-AGA-TTT-TGG-GCT-GGC-CAA-ACT-GCT-GGG-TGC-GGA-AGA-GAA-AGA-ATA-CCA-TGC-AGA-AGG-AGG-CAA-AGT-GCC-TAT-CAA-GTG-GAT-GGC-ATT-GGA-ATC-AAT-TTT-ACA-CAG-AAT-CT-3'

EGFR L858R 140 unidades MUT (M)

5'-GGT-GAA-AAC-ACC-GCA-GCA-TGT-CAA-GAT-CAC-AGA-TTT-TGG-GCCG-GGC-CAA-ACT-GCT-GGG-TGC-GGA-AGA-GAA-AGA-ATA-CCA-TGC-AGA-AGG-AGG-CAA-AGT-GCC-TAT-CAA-GTG-GAT-GGC-ATT-GGA-ATC-AAT-TTT-ACA-CAG-AAT-CT-3'

EGFR L858R 70 unidades TS (MM)

5'-GGT-GAA-AAC-ACC-GCA-GCA-TGT-CAA-GAT-CAC-AGA-TTT-TGG-GC<u>T</u>-GGC-CAA-ACT-GCT-GGG-TGC-GGA-AGA-GAA-A-3'

EGFR L858R 70 unidades MUT (M)

5'-GGT-GAA-AAC-ACC-GCA-GCA-TGT-CAA-GAT-CAC-AGA-TTT-TGG-GC**G**-GGC-CAA-ACT-GCT-GGG-TGC-GGA-AGA-GAA-A-3'

EGFR L858R 23 unidades TS (MM) 5'-CAC-AGA-TTT-TGG-GC*T*-GGC-CAA-AC-3'

> EGFR L858R 23 unidades MUT (M) 5'-CAC-AGA-TTT-TGG-GC**G**-GGC-CAA-AC-3'

EGFR L858R 23 unidades anti-MUT (antiM) 5'-GTT-TGG-CCC-GCC-CAA-AAT-CTG-TG-3'

Como se aprecia en la Figura 14, las sondas EGFR de 70 bases y 140 bases fueron capaces de efectuar aglomeración de nanopartículas específicas de analito mutante (según lo evaluó la tasa Abs₆₂₀/Abs₅₃₈) en 1 hora. Esto provee una demostración adicional de ventajas prácticas porque las secuencias de ADN de longitud reflejan la longitud promedio de 150-165 nucleótidos del ADN plasmático (por ejemplo, ADN tumoral circulante); consulte Underhill et al., *PLoS Genet.*, 2016, 12 (7): e1006162. Además, la aglomeración específica de analito observada demuestra la viabilidad de detectar muestras de ADN bicatenario mediante desnaturalización inducida por calor (ver Figura 15).

10 En ciertos casos, las sondas de detección pueden ser las descritas en Sanromán-Iglesias et al., ACS Sens., 2016, vol. 1, pp. 1110-1116. Estas sondas de detección revelan un SNP en el gen BRCA1, un indicador importante del aumento del riesgo para el desarrollo de cánceres de mama y de ovario (SEC ID Nos: 23-26):

Nombre	Secuencias oligonucleotídicas	
ADN sonda conjugado en AuNP		
1triplex (19 bases)	HS- 3'-C ₆ -TTT-TTT-TTT-T <i>CT-TGT-TTT-C</i> -5'	
2Triplex) (20 bases)	HS-5'-C ₆ -TTT-TTT-TTT-T <u>GA-TTT-TCT-TC</u> -3'	
ADN diana para hibridación		
Match (19 bases)	5'-GAA-CAA-AAG-GAA-GAA.AAT-C-3'	
Mismatch (19 bases)	5'-GAA-CAA-AAG-GAA-TAA-AAT-C-3'	

15

Ejemplo 11 – Unidad de Preparación de la Muestra (SPU)

La SPU es donde se carga la sangre completa antes de ser separada en plasma por un sistema de microtrench. El plasma se mezcla con sondas de nanopartículas (sondas NP) antes de separarse térmicamente en ADN
 monocatenario (ss) para una unión eficaz a las secuencias de la sonda. La SPU consta de los siguientes componentes: dispositivo de carga de muestras, sistema de purificación de plasma SIMBAS, elemento de calentamiento y depósito de sonda de nanopartículas.

Dispositivo de carga de muestras

25

35

Para activar el dispositivo, el paciente presiona un área con el pulgar o un dedo sobre un área de muestra de la ampolleta levantada. El área de la muestra contiene una aguja de orificio hueco que sobresale 1,6 mm de la plataforma del dispositivo principal y al oprimirla se pincha el dedo de una manera similar a los dispositivos de punción que los diabéticos usan habitualmente para las pruebas de glucosa. Al ocultar la aguja de la muestra dentro del dispositivo, se minimiza la angustia causada al paciente, se reducen las lesiones accidentales por pinchazos y se reducen las

30 se minimiza la angustia causada al paciente, se reducen las lesiones accidentales por pinchazos y se reducen las preocupaciones de contaminación de los trabajadores de la salud.

El dispositivo se empaqueta bajo presión negativa, el vacío parcial resultante ayuda a facilitar la extracción de sangre en el dispositivo, lo que lleva a un volumen de muestra de 200-300 µl sin que el paciente tenga una molestia significativa ni observe la muestra de sangre en sí.

Sistema de purificación de plasma SIMBAS

La muestra de sangre ingresa a un sistema de microtrench donde los glóbulos rojos se extraen para formar plasma mediante el sistema de análisis de sangre integrado por microfluidos (SIMBAS) autoalimentado (consulte el Ejemplo 3 anterior). Este sistema es más eficiente y rentable que las tecnologías de separación de sangre actuales basadas en membranas (consulte la Figura 3).

Elemento de calefacción

5

- 10 El plasma se calienta porque el ADN es de doble cadena (ADNds) y, por lo tanto, no es muy eficaz en las sondas de unión. El calor desnaturaliza el dsDNA para formar un ADN monocatenario (ss), el mismo proceso que ocurre en el PCR. También análogo al PCR, el ssDNA que contiene la secuencia de interés mutada se une preferentemente a un exceso de sondas cortas complementarias específicas de la secuencia, unidas a las NP.
- El calentamiento se lleva a cabo utilizando un simple elemento de calentamiento de película delgada incrustado dentro 15 del microcanal. Los elementos calefactores de película delgada son mucho más rápidos y eficientes que los de calentamiento a granel (8 °C s-1 cf. 1-3 sC s 1) y se pueden encender fácilmente en el dispositivo con las baterías de botón.
- 20 Aunque el calentamiento instantáneo se usa para minimizar la probabilidad de desnaturalización de la proteína, que tiene una cinética más lenta que la desnaturalización del ADN, es probable que ocurra alguna desnaturalización de la proteína que resulte en un aumento de la viscosidad del plasma. Hemos demostrado que este fenómeno se puede superar, diluvendo el plasma en un 50% en presencia de Cibacron Blue, un colorante absorbente de proteínas que puede ser absorbido en el canal microflúdico después del módulo SIMBAS. Hemos demostrado que el tratamiento con 25 Cibacron Blue no inhibe ni elimina el ADN del plasma.

Depósito de sonda NP

El plasma resultante (100-150 µl) ingresa en un canal microfluídico donde se mezcla con nanopartículas de sonda de 30 oro precaroadas. Hemos optimizado el diseño de secuencia de las sondas de ácido nucleico por su capacidad para distinguir entre secuencias mutadas de un solo nucleótido y de tipo salvaje, como lo demuestran los estudios de resonancia de plasmones de superficie (SPR) utilizando una máquina Biacore 3000 (ver Figura 1).

Las sondas de ADN se unieron a los NP de oro a través de un enlace tiol e incluyen una molécula espaciadora C18 35 para evitar la unión no específica de la sonda con la superficie de oro. Cada sonda NP contiene entre 200 y 300 sondas.

Hay dos tipos distintos de secuencia de sonda (y sondas NP), una complementaria a la secuencia normal (o de tipo salvaje) y la otra a una secuencia descendente (o ascendente) que contiene la mutación a detectar (Figura 6C). El 40 ssDNA del paciente (el analito) forma un puente entre las dos sondas que une los NP para formar un aglomerado. La distancia entre las NP puede controlarse modificando el diseño de las sondas.

Aunque el ADN de la secuencia WT también puede unirse a la sonda ascendente, no puede unirse a la sonda mutada y, por consiguiente, no forma un aglomerado (compare las Figuras 6A y 6B). Hemos demostrado la capacidad de este 45 sistema para distinguir entre WT y mutaciones de un solo nucleótido hasta una concentración de 10,8 fmol (ver Sanromán-Iglesias et al., ACS Sens., 2016, Vol. 1, pp. 1110-1116).

Con el fin de optimizar adicionalmente la aglomeración de la sonda de nanopartículas inducida por el analito, se puede emplear una solución antiincrustante para mitigar el bloqueo de la aglomeración inducido por proteínas plasmáticas. 50 Las proteínas de la sangre completa y/o plasma pueden cubrir las nanopartículas de detección que tienden a inhibir la unión del analito a la sonda de nanopartículas y la aglomeración subsiguiente. Un ejemplo de una solución antiincrustante es Optodex®. La plataforma OptoDex® es una tecnología de ingeniería de superficies desarrollada por el Centro Suisse d'Electronique et Microtechnique (CSEM) que integra tecnologías de ciencia de materiales, guímica de superficies y bioquímica e incluye materiales novedosos, químicas de superficie controlables y bien caracterizadas

55 para fijación de biomoléculas y pasivación superficial.

Ejemplo 12 - Zona de amplificación de señal

- Como una alternativa a la amplificación de señal basada en la liberación de nanopartículas de señal de microporos, 60 que se describe en los Ejemplos 7 y 8 anteriores, los presentes inventores buscaron conseguir una mayor eficiencia de liberación de señal empleando un depósito de señal basado en microesfera termosensible. En particular, el uso de microesferas aborda el problema de la liberación de nanopartículas de señal de microporos después de la ruptura de la película termosensible que recubre las aberturas de microporos. Los actuales inventores han encontrado que, bajo ciertas condiciones, la liberación de nanopartículas de señal de microporos era <5% del total que se había cargado
- en los microporos. Por el contrario, se estima que la liberación de medios de señal de las microesferas termosensibles 65 después de la ruptura inducida por el calor de la cubierta de la microesfera es> 80% del total que se había cargado

en las microesferas:

Liberación de medios de señal desde el depósito de señal		
Microporos	Microesferas	
+	++++	

- Se descubrió que las perlas de alginato/agarosa empaquetadas con nanopartículas de señal son significativamente 5 más permeables que las microesferas basadas en polielectrolitos, en particular, bicapas de PHH/PSS. Por consiguiente, estos últimos se seleccionaron como una opción óptima para el depósito de señal para los medios de señal.
- En la Figura 16 se muestra una representación esquemática de la zona de amplificación de la señal. Los aglomerados
 de nanopartículas de detección fluyen a lo largo de los microcanales dentro del dispositivo hasta que encuentran microesferas termosensibles (mostradas a la izquierda en la Figura 16) en la zona de amplificación.

Las microesferas termosensibles (~10 µm de diámetro) se empaquetan adyacentes a perlas de sílice mucho más grandes (~100 µm de diámetro) en una cámara de retención del canal de microfluidos (las perlas de sílice se muestran a la derecha en la Figura 16). Esta disposición similar a la que se encuentra en la cromatografía asegura que el flujo continúe a través del dispositivo sin impedimentos, al mismo tiempo que acerca los aglomerados de nanopartículas de detección a las microesferas termosensibles que se retienen mientras están intactas.

Los aglomerados se energizan mediante un diodo láser rojo en el dispositivo que suministra luz en la longitud de onda
 resonante (es decir, 633 nm). El diodo láser (1 mW disponible comercialmente) se alimenta con la misma batería de botón que el calentador de película delgada.

La absorción de luz láser a 633 nm por las nanopartículas de oro aglomeradas produce una emisión de energía localizada como resonancia de plasmón. Estos nanocalentadores pueden elevar la temperatura por encima de 40-50°C, lo que provoca la desintegración de las microesferas termosensibles.

Aunque las nanopartículas de sonda de flotación libre también pueden absorber la luz, esta energía es menos del 1% de la absorbida por las nanopartículas aglomeradas. Hay poca absorción por parte de otros componentes, como los plásticos del dispositivo de microfluidos o el plasma mismo o la sangre contaminante que tiene un máximo de absorción de 434 nm y 414 nm para la Hb y la HbO2, respectivamente.

Las microesferas termosensibles están compuestas por 5 x bicapa PSS/PAH usando micelas de coprecipitación $CaCO_3$ encapsulando moléculas ~10⁹ de moléculas de señal (por ejemplo, estrepavidina). Esta disposición conduce a una amplificación masiva de la señal.

35

25

30

Las moléculas de señal liberadas por microesferas rotas (y las sondas NP no aglomeradas) viajan a través de las perlas de sílice hacia la zona de señal de prueba.

Los ejemplos, de microesferas cargadas, con señales que se han probado incluyen: microcápsulas de bicapa
 PSS/PAH cargadas con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y microcápsulas de bicapa PSS/PAH cargadas con dextrano-FITC. Se ha demostrado la liberación de la carga de señal inducida por láser (resultados no mostrados). Además, la presencia de nanopartículas aglomeradas en la superficie de las microcápsulas se ha visualizado mediante microscopía electrónica.

45 **Producción de microcápsulas y envasado en microcanales**

Las microesferas termosensibles fueron producidas esencialmente como se describe en Ambrosone et al., *ACS Nano,* 2016, vol. 10 (4), pp. 4828-4834 (ver materiales suplementarios S2).

- 50 Poli (4-estirenosulfonato de sodio) (PSS, Mw ≈ 70 kDa, #243051), poli (hidrocloruro de alilamina) (PAH, Mw ≈ 56 kDa, #283223), cloruro de calcio dihidrato (CaCl2, #223506), carbonato de sodio (Na2CO3), #S7795), y poli (estireno) poli (ácido acrílico) (PSS-b-PAA, Mn ≈ 8700, #735892) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.
- Las microesferas de PSS/PAH CaCO₃ (diámetro 5-10 µm) se cargaron con HRP, dextrano-FITC o estreptavidina como
 medios de señal. La cubierta de polielectolito multicapa (por ejemplo, 5-8 capas alternas de PSS y PAH) puede
 proporcionar una carga positiva o negativa en la capa más externa.

Diseño de cámara de retención

60 La cámara de retención de microfluidos aborda el problema de cómo reunir todos los componentes (es decir, aglomerados y microesferas) mientras retiene el flujo a través del dispositivo. La cámara de retención comprende un microcanal con bolas de sílice/vidrio más grande (~50-100µm), que a su vez retienen las microesferas intactas (~5-10µm) y el flujo lleva los aglomerados a las microesferas y permite que continúen los NP flotantes a través del

dispositivo junto con moléculas de señal liberadas de microesferas rotas.

Se investigó el empaquetamiento de microesferas en los canales de polímero de olefina cíclica (COP). Se usaron perlas de vidrio de 75 µm de diámetro para bloquear el microcanal, manteniendo así las microesferas (5-10 µm) en

- 5 posición (ver Figura 18A). Usando microesferas de 8 capas que terminaron en una capa más externa negativa, las microesferas fueron estables (sin pérdida de señal cargada de dextrano-FITC) durante al menos 3 meses y se mantuvieron en posición. También se probó una solución alternativa para obstruir los canales COP: perlas de agarosa de un diámetro de 150 µm.
- 10 En la Figura 18B se ilustra la liberación inducida por láser de medios de señal de dextrano-FITC de las microesferas.

Ejemplo 13 - Zona de señal de prueba

Tras la liberación de los medios de señal del depósito de señal (por ejemplo, microesferas), los medios de señal fluyen a la zona de señal de prueba (por ejemplo, una banda de nitrocelulosa) donde los medios de señal se capturan en 15 una banda de retención por medio de una interacción vinculante específica, lo que da como resultado una línea visible. La zona de señal de prueba puede emplear componentes estándar como se usa en los equipos de prueba de flujo lateral disponibles comercialmente (por ejemplo, equipos de prueba de embarazo). En un ejemplo, los medios de señal pueden incluir estreptavidina y la banda de retención puede constar de biotina.

20

Ejemplo 14 - Dispositivo integrado y aplicaciones de diagnóstico

En algunas incorporaciones, la presente invención provee un dispositivo integrado que comprende los módulos separados, pero conectados funcionalmente:

25

1. Unidad de preparación de muestras (SPU). La sangre completa se carga en la SPU, donde es separada en plasma a través de un sistema de microtrench. El plasma se mezcla con sondas de nanopartículas (sondas NP) antes de separarse térmicamente en ADN de una hebra simple (ss) para una unión eficaz a las secuencias de la sonda.

30

35

60

65

2. Zona de amplificación. La unión específica de la secuencia de ssDNA mutada a dos sondas de ADN de puente complementarias da como resultado su aglomeración específica. La aglomeración hace que las NP se encuentren muy cerca unas de otras, y cuando son activadas por un diodo láser, la resonancia de plasmón convierte la energía luminosa en energía térmica localizada. Esta energía térmica interrumpe las microesferas termosensibles que encapsulan decenas de millones de moléculas de señal correspondientes a una amplificación masiva de la señal.

3. Señal de prueba. Las moléculas de señal liberadas viajan a lo largo de una banda de nitrocelulosa hasta que son capturadas por una banda de prueba que da como resultado una línea visible.

- Una ilustración esquemática del dispositivo integrado se muestra en la Figura 19. Es un dispositivo híbrido de flujo 40 lateral de microfluídica, la sección de microfluídos que consta de la SPU y la zona de amplificación está alimentada por el flujo de Degas a través de microbombas especialmente diseñadas como resultado del dispositivo siendo envasados bajo presión negativa. La región de la señal de prueba del flujo lateral es impulsada por la fuerza capilar del líquido que sale de la sección de microfluidos a través de una disposición del depósito. Las baterías de botón
- 45 alimentan el diodo láser y los elementos de calefacción del dispositivo. La SPU contiene un módulo de sonda NP intercambiable que permite probar diferentes secuencias de biomarcadores dentro de una carcasa de prueba estandarizada para minimizar los costos de fabricación.
- La detección de mutaciones de EGFR en pacientes con NSCLC, por ejemplo, es indicativa de su respuesta a los 50 inhibidores de la tirosina guinasa (TKI, por sus siglas en inglés), como Gefitinib, erlotinib, brigatinib y lapatinib. Las mutaciones principales son la mutación L858R presente en hasta el 90% de los casos de NSCLC mutado con EGFR, y las deleciones del exón 19 presentes en aproximadamente el 40% de los casos. Ambas mutaciones pueden ser detectadas por el dispositivo de la presente invención. Las tecnologías de diagnóstico complementarias con licencia actuales para las pruebas de mutación de EGFR se basan en el PCR y en biopsias obtenidas de forma invasiva, que 55
- son subóptimas por conveniencia del paciente y el médico.

En el caso de NSCLC, las últimas pautas de la ESMO recomiendan monitorear la aparición de la mutación T790M como un indicador de resistencia emergente a terapias basadas en TKI y el consecuente cambio a una terapia de segunda línea (Osimertinib). Para los procedimientos de seguimiento actuales en pacientes con NSCLC se requieren visitas al hospital y el uso de técnicas de imagen como la tomografía computarizada. El dispositivo de la presente invención ofrece una alternativa más simple que puede efectuarse en un centro de salud local.

Las realizaciones específicas, descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo, no a modo de limitación. Todos los subtítulos de este documento se incluyen solo por conveniencia, y no deben interpretarse como limitantes de la divulgación de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o ausencia de un analito objetivo en una muestra de prueba, que comprende los siguientes pasos:

5

 i) Proporcionar una pluralidad de nanopartículas detectoras que comprenden una primera nanopartícula detectora funcionalizada con una primera sonda específica para una primera región de un analito objetivo y una segunda nanopartícula detectora funcionalizada con una segunda sonda específica para una segunda región de dicho analito objetivo; y

- 10 ii) Poner en contacto dichas nanopartículas detectoras con una muestra de prueba en condiciones adecuadas para la unión de las sondas específicas al analito objetivo, en donde la aglomeración inducida por el analito objetivo de las nanopartículas detectoras permite la liberación de un medio de señal detectable desde un depósito de señal por descomposición de una partición que cierra el depósito de señal y en donde la partición es una capa de polímero termosensible y las nanopartículas detectoras aglomeradas dirigen una transferencia de calor suficiente
- 15 para causar una ruptura térmica, al menos parcial de dicha capa de polímero termosensible, liberando así los medios de señal detectables y en donde la transferencia de calor es disparada por la irradiación de las nanopartículas detectoras aglomeradas con una fuente de radiación electromagnética.

 El método de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el depósito de señal incluye una o más microesferas que tienen un núcleo, consta de dichos medios de señal y una cubierta que encierra dicho núcleo, y en el que la cubierta es la partición mencionada.

- 3. El método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el analito objetivo es un ácido nucleico.
- 25 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

(i) El polímero termosensible comprende al menos un polímero seleccionado del grupo que comprende: poli (sulfonato de estireno) (PSS), poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC), poli (alilamina)(PAH), poli (N isopropilacrilamida), poli [metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo] (pDMAEMA), hidroxipropilcelulosa, poli (vinilcaprolactama) y polivinil metil éter; y/o

(ii) La irradiación de las nanopartículas detectoras aglomeradas produce un aumento de la temperatura local de al menos 20°C, 40°C o 60°C; y/o

(iii) La fuente de radiación electromagnética es un diodo láser o un diodo emisor de luz (LED) y/o

- (iv) Los aglomerados de nanopartículas del detector se localizan en la partición después de la aglomeración.
- 35 (v) Las nanopartículas detectoras comprenden un núcleo de átomos de metal.
 (vi) En donde los medios de señal comprenden estreptavidina, un anticuerpo, una enzima, un fluoróforo, un colorante, uno o más puntos cuánticos, una o más perlas de látex, o es una pluralidad de nanopartículas de señal.
- 5. El método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el depósito de señal comprende una pluralidad 40 de dichas microesferas, y en el que:

(i) El diámetro promedio de las microesferas está en el rango de 1 a 20 μm, opcionalmente de 5 a 10 μm; y/o
 (ii) La capa superficial de la cubierta está cargada negativamente o está cargada positivamente.

45 6. El método según la reivindicación 3, en el que las sondas detectoras de nanopartículas son oligonucleótidos complementarios a las regiones primera y segunda del ácido nucleico objetivo.

 7. El método según la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico objetivo tiene una secuencia que es una variante de una secuencia de tipo salvaje, y dichas primera o segunda sondas se unen a la secuencia de la variante con preferencia a la secuencia de tipo salvaje

8. El método según la reivindicación 7, en el que la secuencia variante comprende un polimorfismo de nucleótido único (SNP) y la primera o segunda sonda detectora de nanopartículas se hibrida con una porción del ácido nucleico objetivo que comprende la posición de SNP.

55

30

9. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la secuencia variante comprende una mutación asociada con cáncer, opcionalmente en la que dicha mutación se selecciona del grupo que consta de: un solo cambio de nucleótido, una eliminación, una inserción o una secuencia de translocación.

- 10. El método según la reivindicación 9, en el que la mutación está en un gen seleccionado del grupo que consta de: un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) de NCBI Gene ID: 1956; Cáncer de mama humano 1 inicio temprano (BRCA1) de NCBI Gene ID: 672; el gen BRAF humano de NCBI Gene ID: 673; y el protooncogén KRAS humano de NCBI Gene ID: 3845.
- 65 11. Un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de un analito objetivo en una muestra de prueba, que comprende:

i) Un compartimento de detección, que contiene una pluralidad de nanopartículas detectoras que comprenden una primera nanopartícula detectora funcionalizada con una primera sonda específica para una primera región de un analito objetivo y una segunda nanopartícula detectora funcionalizada con una segunda sonda específica para una segunda región de dicho analito objetivo; y

- 5 ii) Una zona de amplificación de señal que contiene un medio de señal detectable contenido en un depósito de señal por una partición que se puede romper selectivamente después de la aglomeración inducida por el analito objetivo de las nanopartículas del detector, en donde la zona de amplificación de la señal comprende además una fuente integrada de radiación electromagnética configurada para proporcionar energía en la longitud de onda resonante de las nanopartículas del detector, y en donde la partición comprende una capa de polímero 10 termosensible.

12. El dispositivo según la reivindicación 11, en el que el depósito de señal consta de una o más microesferas que tienen un núcleo, incluye dichos medios de señal y una cubierta que encierra dicho núcleo, y en el que la cubierta es dicha partición.

15

13. El dispositivo según una de las reivindicaciones 11 y 12, en el que el compartimento de detección contiene además una pluralidad de sondas de bloqueo específicas para la cadena antisentido de un ácido nucleico objetivo.

- 14. Uso de un dispositivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en un método de:
- 20

diagnóstico o pronóstico de un sujeto mamífero, en el que dicha muestra de prueba es una muestra biológica que se ha obtenido de dicho sujeto; o

detección de un contaminante bacteriano, parásito u otro contaminante biológico, en donde dicha muestra de prueba es una muestra ambiental.

25

40

15. Un equipo que comprende:

i) Un dispositivo que tiene:

30 una entrada de muestra:

un compartimento de lisis que comprende un elemento de calentamiento;

una fuente integrada de radiación electromagnética;

una pluralidad de microesferas termosensibles que tienen un núcleo que comprende medios de señal y una envoltura que encierra el núcleo, en la que la envoltura comprende un polímero termosensible; y

una región de visualización de señal que comprende una banda de retención para capturar los medios de señal 35 que siguen a la liberación de las microesferas:

opcionalmente,

ii) una o más poblaciones de una sonda de bloqueo capaz de unirse específicamente a la cadena antisentido de un ácido nucleico objetivo; y

iii) Una o más poblaciones de una pluralidad de nanopartículas detectoras funcionalizadas con una primera sonda específica para una primera región de la cadena sentido de dicho ácido nucleico objetivo y una segunda sonda específica para una segunda región de dicho ácido nucleico objetivo.

ES 2 741 594 T3



Figura 1



Figura 2



Figura 3

ES 2 741 594 T3





Figura 5

К

മ

ES 2 741 594 T3



ES 2 741 594 T3



Figura 7A



Figura 7B

ES 2 741 594 T3



Figura 7C



Figura 7D

ES 2 741 594 T3



Figura 7E



Figura 7F

ES 2 741 594 T3



Figura 7G



Figura 7H

ES 2 741 594 T3



Figura 7I



Figura 8

ES 2 741 594 T3



С

D

Figura 9



Figura 10

ES 2 741 594 T3



K

Щ

ES 2 741 594 T3



44

ES 2 741 594 T3



ES 2 741 594 T3







ES 2 741 594 T3









Figura 18B

