

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 749**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2017** **PCT/EP2017/084370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18122162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2017** **E 17832075 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022** **EP 3563155**

54 Título: **Una micropartícula prefabricada para realizar una detección de un analito**

30 Prioridad:

30.12.2016 EP 16207455

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

22.11.2022

73 Titular/es:

BLINK AG (100.0%)
Brüsseler Straße 20
07747 Jena, DE

72 Inventor/es:

STEINMETZER, KATRIN;
HUBOLD, STEPHAN;
ELLINGER, THOMAS;
ERMANTRAUT, EUGEN y
SCHULZ, TORSTEN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 928 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una micropartícula prefabricada para realizar una detección de un analito

La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar una detección y/o cuantificación de un analito o de múltiples analitos en una muestra en la que se utiliza una micropartícula o una colección de micropartículas. En una realización, en la colección de micropartículas, las micropartículas individuales están adaptadas para la detección de analitos específicos y pueden distinguirse unas de otras por una etiqueta específica que indica el analito respectivo para el que la micropartícula individual es específica.

Se han ideado numerosas técnicas y procedimientos para la detección de analitos en una muestra. La detección sensible y cuantitativa de un analito es, en un mundo ideal, digital. Para ello, la muestra se distribuye en una serie de espacios de reacción, y en cada espacio de reacción hay una molécula de analito como máximo. De esta manera, a pesar de la baja cantidad global de analito, se alcanza una alta concentración de analito con referencia al fondo, y así se aumenta la eficiencia de la reacción. La señal generada se concentra en un espacio reducido y, por tanto, puede detectarse fácilmente. Ya en 1961 se midió la actividad de moléculas enzimáticas individuales en gotas acuosas en aceite (Rotman, 1961, PNAS, 47: pp. 1891-1991). Esto demostró la viabilidad de la detección de la actividad de una sola molécula enzimática y, por tanto, la posibilidad de realizar ensayos digitales. Con el desarrollo y el aumento de la distribución de los procesos de amplificación molecular, el concepto de "dilución limitante" se introdujo en la analítica de los ácidos nucleicos (Sykes et al., 1992, Biotechniques, 13: pp. 444-449). La compartimentación se consiguió originalmente dividiendo la solución de muestra que contenía el analito/molécula objetivo en espacios de reacción individuales de una placa de microtitulación. Posteriormente, se consiguió un número considerablemente mayor de espacios de reacción utilizando capilares y sustratos microestructurados (Kalinina et al. 1997, Nucleic Acids Research, 25: pp. 1999-2004). Asimismo, se utilizaron oligonucleótidos cebadores inmovilizados en micropartículas en combinación con inmersiones de agua/aceite (Vogelstein et al. Mater., 2016, 96, pp. 9236-9241). También existen formatos para la realización de inmunoensayos digitales en los que se utilizan sustratos microestructurados que permiten la generación de pequeñas cantidades de solución acuosa y que, por tanto, producen una pluralidad de espacios de reacción (Rissin et al. 2006, Nanolett. 6: pp. 520-523 En esencia, la metodología disponible hoy en día para llevar a cabo la detección de un analito suele implicar dispositivos complejos para la generación de microespacios de reacción o para la realización de las respectivas pruebas de detección.

Kumaresan et al., 2008, Anal. Chem, vol. 80, páginas 3522-3529 describe la generación de microgotas que contienen, entre otras cosas, microperlas funcionalizadas con cebadores inversos que se incorporan a las gotas junto con un objetivo. Las microperlas funcionalizadas se incorporan a las gotas considerablemente más grandes. Las perlas se emplean simplemente para proporcionar una fijación de los cebadores que se extenderá a través de una reacción llevada a cabo en el espacio de reacción que es proporcionado y definido por la gota respectiva.

Zeng et al., 2010, Anal. Chem, vol. 82, p. 3183-3190 divulga perlas funcionalizadas con cebadores que se encapsulan junto con plantillas de analitos en gotas que son mucho más grandes que las dimensiones de las perlas individuales.

En consecuencia, fue un objeto de la presente invención proporcionar una metodología para realizar una detección, preferentemente una detección digital de un analito en una muestra cuya metodología es fácil de manejar y que puede ser realizada sin grandes esfuerzos por parte de los aparatos utilizados. También es un objeto de la presente invención proporcionar una metodología que sea versátil y que se pueda adaptar a diferentes analitos, pero que sea universalmente empleable y que se pueda adaptar fácilmente a diferentes analitos. Es además un objeto proporcionar un procedimiento de detección que permita el enriquecimiento de analitos a partir de diferentes volúmenes de líquido sin tener que ajustar el volumen final de la reacción de detección.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para realizar una detección, preferentemente digital, de un analito en una muestra de acuerdo con las reivindicaciones anexas, dicho procedimiento comprende los pasos:

a) proporcionar una micropartícula prefabricada que tiene una superficie e incluye un volumen vacío para recibir una solución acuosa, donde dicha partícula es dispersable en un medio no acuoso y, al dispersarse en un medio no acuoso, proporciona un espacio de reacción definido en dicho medio no acuoso, en cuyo espacio de reacción definido puede llevarse a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, y en el que dicha micropartícula prefabricada comprende un agente de captura que, tras la exposición de dicha micropartícula a una muestra que rodea a dicha micropartícula prefabricada y que contiene un analito se une selectiva y específicamente al analito a detectar y que, al unirse el analito al agente de captura, forma un complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, en el que dicho agente de captura se une al analito de una muestra que rodea dicha micropartícula prefabricada, y en el que dicha micropartícula prefabricada comprende además un agente de detección que es específico para el analito o dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, y que se une a dicho analito o a dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito;

b) exponer dicha micropartícula prefabricada a una muestra acuosa que se sospecha que contiene un analito a detectar, permitiendo así que el agente de captura se una selectiva y específicamente al analito a detectar, si está presente;

c) colocar la micropartícula prefabricada en una fase no acuosa, por ejemplo, una fase oleosa, y utilizar el volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada como un espacio de reacción definido en el que se lleve a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, ya sea

5 d1) detectando el agente de detección unido a dicho analito o a dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito; o

d2) amplificando el analito, si está presente, mediante una reacción de amplificación, y detectar el producto así amplificado mediante dicho agente de detección, donde dicho analito es un ácido nucleico y dicha reacción de amplificación es una amplificación de ácido nucleico como, por ejemplo, PCR, TMA, NASBA, LAMP, 3SR, SDA, RCA, LCR, RPA, NEAR, o

10 d3) realizando una reacción de amplificación de la señal, por ejemplo, una amplificación del ácido nucleico si un ácido nucleico es o forma parte de dicho agente de detección, o por ejemplo, una amplificación enzimática de una señal, por ejemplo, en forma de una etiqueta, como un colorante o un fluoróforo, si una enzima es o forma parte de dicho agente de detección, y detectar la señal así amplificada,

15 donde dicho espacio de reacción en el que se realiza dicha reacción química o bioquímica que indica la presencia de un analito, está definido por dicho volumen de dicha micropartícula prefabricada y no es mayor que dicho volumen de dicha micropartícula prefabricada.

En una realización, dicha micropartícula prefabricada se proporciona como una micropartícula prefabricada que se seca, preferentemente se seca por congelación.

20 En una realización, dicha micropartícula prefabricada no es una micropartícula generada in situ, preferentemente no es una micropartícula generada in situ en el sitio o en la reacción, en o durante la cual la detección del analito va a tener lugar.

En una realización, la micropartícula prefabricada es una micropartícula porosa.

25 En una realización, dicha micropartícula prefabricada tiene un espacio poroso intersticial que permite a la micropartícula recibir o tomar un líquido como una muestra acuosa y, si está presente, cualquier soluto en ella, como un analito.

En una realización, dicha micropartícula prefabricada se reconstituye en una solución acuosa, preferentemente durante la etapa a) o la etapa b), y, al reconstituirse, recibe dicha solución acuosa en su volumen vacío.

30 En una realización, dicho agente de detección se incluye en dicha micropartícula prefabricada durante un proceso de prefabricación o se incluye en dicha solución acuosa la presente invención y, por lo tanto, pasa a formar parte de la micropartícula prefabricada tras la reconstitución.

En una realización, dicha micropartícula prefabricada está hecha de un agente formador de gel, siendo dicho agente formador de gel preferentemente licuable al aplicar calor o luz, o al cambiar el pH, el potencial rediox, la fuerza iónica, la temperatura, el campo magnético o la radiación electromagnética, o al exponerse a una enzima o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, a un sustrato de dicha enzima, o a cualquier combinación de lo anterior.

35 En una realización, dicho agente formador de gel forma una matriz que define la superficie y el volumen vacío de dicha micropartícula. En una realización, dicha matriz es una matriz porosa.

En una realización, dicho agente formador de gel se selecciona del grupo que comprende

a) polímeros sintéticos preparados a partir de sus correspondientes monómeros, como el metilacrilato y el acrilato, la acrilamida y la metacrilamida, las lactamas cíclicas, los monómeros a base de estireno;

40 b) polímeros a base de silicona, por ejemplo, polidimetilsiloxanos y sus copolímeros;

c) polímeros naturales seleccionados entre polisacáridos, por ejemplo, agarosa, quitina, quitosano, alginato, carragenina, celulosa, fucoidán, laminar, gomas seleccionadas entre la goma xantana, la goma arábica, la goma ghatti, la goma guar, la goma de garrofín, la goma tragacanto, la goma karaya y la inulina; polipéptidos, por ejemplo, por ejemplo, albúminas, colágenos, gelatinas; polinucleótidos; y combinaciones de los mismos.

45 En una realización, dicho agente de captura se selecciona de entre anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluyendo aptámeros, Spiegelmers, proteínas no-anticuerpo capaces de unirse específicamente a un analito o complejo de analitos, tales como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo, estreptavidina.

50 En una realización, dicho agente de detección se selecciona de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, Spiegelmers, proteínas que no son anticuerpos, como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo estreptavidina, cada uno de ellos marcado opcionalmente con una molécula informadora adecuada, como un tinte, una enzima, un catalizador químico o una mezcla de reactivos capaces

de iniciar una reacción química que produce una señal detectable ópticamente o de otro modo que indica la presencia del analito para ser detectado..

En una realización, dicha micropartícula prefabricada está específicamente etiquetada.

5 En una realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo utilizando una colección de micropartículas prefabricadas, siendo dichas micropartículas prefabricadas como se define en cualquiera de las realizaciones de la presente invención.

10 En una realización, en dicha colección de micropartículas prefabricadas, dichas micropartículas prefabricadas son diferentes entre sí en el sentido de que son específicas para diferentes analitos a detectar, en el que cada micropartícula prefabricada está específicamente etiquetada de tal manera que las diferentes micropartículas prefabricadas y sus correspondientes analitos detectados pueden distinguirse por las etiquetas específicas de las micropartículas prefabricadas.

15 En una realización, dicho procedimiento implica el uso de una micropartícula prefabricada o de una colección de micropartículas prefabricadas como se define en la presente invención, para realizar una detección digital de un analito o de una pluralidad de analitos en una muestra o para enriquecer y concentrar una pluralidad de analitos en una pluralidad de volúmenes definidos, en los que, preferentemente, todos dichos volúmenes definidos en dicha pluralidad de volúmenes definidos son iguales.

En una realización, después del paso de exposición b), hay uno o varios pasos de lavado.

20 En una realización, en el paso a), dichas micropartículas prefabricadas se proporcionan en forma seca, y, en el paso b), dichas micropartículas prefabricadas se reconstituyen en una solución acuosa y luego se exponen a una muestra que se sospecha que contiene un analito a detectar, donde, opcionalmente, después del paso de reconstitución, hay uno o varios pasos de lavado.

25 En una realización, en el paso b) el número de micropartículas prefabricadas y el número de moléculas de analito en la muestra se mantienen o se ajustan, según sea necesario, de manera que la unión de una sola molécula de analito por micropartícula prefabricada siga una distribución de Poisson, preferentemente de manera que, en promedio, no haya más de una molécula de analito unida por micropartícula, permitiendo así la detección de una sola molécula de analito por micropartícula prefabricada.

30 En una realización, durante el paso c), la micropartícula prefabricada o la colección de micropartículas prefabricadas se suspende en la fase no acuosa y/o se sitúa en un sustrato sólido que aísla cada micropartícula prefabricada de otras micropartículas prefabricadas, si están presentes, en el que, preferentemente, dicho sustrato sólido es un filtro, un tamiz, un sustrato que tiene un patrón de pocillos, rebajes, ranuras, canales, zanjas, cráteres, agujeros, pilares o cualquier combinación de los anteriores.

35 En una realización, durante o después de la etapa c), el agente formador de gel se licua, preferentemente mediante la aplicación de calor o luz, o por un cambio de pH, potencial redox, fuerza iónica, temperatura, campo magnético o radiación electromagnética, o tras la exposición a una enzima o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, a un sustrato de dicha enzima, o cualquier combinación de lo anterior, dando lugar a una gota acuosa en una fase no acuosa.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, dicho espacio de reacción en el que se realiza dicha reacción química o bioquímica que indica la presencia de un analito, está definido por dicho volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada y no es mayor que dicho volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada.

40 También se divulga un procedimiento para realizar una detección, preferentemente una detección digital, de un analito en una muestra, dicho procedimiento comprende los pasos:

45 a) proporcionar una micropartícula prefabricada, que tiene una superficie e incluye un volumen vacío para recibir una solución acuosa, en la que dicha partícula es dispersable en un medio no acuoso, y, tras la dispersión en un medio no acuoso, proporciona un espacio de reacción definido en dicho medio no acuoso, en el que puede llevarse a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, y en la que dicha micropartícula prefabricada es preferentemente una micropartícula porosa que al exponer dicha micropartícula a una muestra que rodea dicha micropartícula prefabricada y que contiene un analito, se une y/o inmoviliza y/o recibe el analito de una muestra que rodea dicha micropartícula prefabricada, en los poros de dicha micropartícula, tomando una fracción de dicha muestra en dichos poros, y en donde dicha micropartícula prefabricada comprende además un agente de detección que es específico para el analito, y que se une a dicho analito;

50

b) exponer dicha micropartícula prefabricada a una muestra acuosa, que se sospecha que contiene un analito a detectar, permitiendo así que la micropartícula prefabricada se una y/o inmovilice y/o reciba el analito a detectar, si está presente;

c) colocar la micropartícula prefabricada en una fase no acuosa, por ejemplo, una fase oleosa, y utilizar el volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada como un espacio de reacción definido en el que se lleve a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, ya sea

d1) detectando el agente de detección unido a dicho analito; o

5 d2) amplificando el analito, si está presente, mediante una reacción de amplificación, y detectar el producto así amplificado mediante dicho agente de detección, donde dicho analito es un ácido nucleico y dicha reacción de amplificación es una amplificación de ácido nucleico como, por ejemplo, PCR, TMA, NASBA, LAMP, 3SR, SDA, RCA, LCR, RPA, NEAR, o

10 d3) realizando una reacción de amplificación de la señal, por ejemplo, una amplificación del ácido nucleico, si un ácido nucleico es o forma parte de dicho agente de detección, o, por ejemplo, una amplificación enzimática de una señal, por ejemplo, en forma de una etiqueta, como un colorante o un fluoróforo, si una enzima es o forma parte de dicho agente de detección, y detectar la señal así amplificada.

15 Cabe señalar que, en este aspecto de la divulgación, la presencia de un agente de captura en la micropartícula prefabricada no es necesaria, siempre que la micropartícula prefabricada sea capaz de captar líquido del entorno al que está expuesta. Por ejemplo, dicha micropartícula puede ser una micropartícula porosa, permitiendo así la captación de líquido y de un analito presente en dicho líquido en la micropartícula porosa, es decir, en el espacio previsto por los poros de dicha micropartícula. Así, según este aspecto de la presente invención, el procedimiento funciona incluso si la micropartícula prefabricada no tiene un agente de captura. En cambio, cualquier analito presente en una muestra es recibido y captado por una micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención, simplemente por su capacidad de recibir y captar líquido en ella. La presencia de un agente de captura aumenta la especificidad y/o selectividad de las micropartículas prefabricadas para dicho analito pero, sin embargo, no es absolutamente necesaria o esencial para que las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención funcionen. La presencia de agentes de captura en la micropartícula prefabricada puede, sin embargo, en algunas realizaciones, aumentar las capacidades de la micropartícula para enriquecer y/o concentrar un analito de una muestra.

También se divulga una micropartícula prefabricada para realizar una detección, preferentemente digital, de un analito en una muestra, en la que dicha micropartícula tiene una superficie e incluye un volumen vacío para recibir una solución acuosa, en la que dicha partícula es dispersable en un medio no acuoso y, tras la dispersión en un medio no acuoso, es adecuada para proporcionar un espacio de reacción definido en dicho medio no acuoso, en el que puede realizarse una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito.

La micropartícula prefabricada según el párrafo anterior puede ser almacenada, preferentemente durante un periodo de al menos 2 meses, más preferentemente de al menos 6 meses.

La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede ser secada, preferentemente secada por congelación.

35 La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede no ser una partícula generada in situ, preferentemente no una partícula generada in situ en el lugar o en la reacción, en o durante la cual se va a realizar la detección del analito.

La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede ser una micropartícula porosa.

40 Preferentemente, dicha micropartícula prefabricada tiene un espacio de poros intersticial que permite a la micropartícula recibir o tomar un líquido, como una muestra acuosa, y, si está presente, cualquier soluto en ella, como un analito.

45 La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede comprender un agente de captura que, tras la exposición de dicha micropartícula a una muestra que rodea a dicha micropartícula y que contiene un analito, se une selectiva y específicamente al analito a detectar y que, tras la unión del analito al agente de captura, forma un complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, en el que dicho agente de captura se une al analito de una muestra que rodea a dicha micropartícula.

El agente de captura según el párrafo anterior puede estar localizado predominantemente en la superficie de dicha micropartícula, de manera que la micropartícula es capaz de enriquecer y concentrar un analito localizado fuera de la micropartícula.

50 La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede comprender además un agente de detección que es específico para el analito o dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, y que se une a dicho analito o a dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito.

La micropartícula prefabricada según los párrafos anteriores puede reconstituirse en una solución acuosa y, al reconstituirse, recibe dicha solución acuosa en su volumen vacío.

El agente de detección que se incluye en la micropartícula prefabricada de los párrafos anteriores puede incluirse durante un proceso de prefabricación o puede incluirse en dicha solución acuosa en la que se reconstituye y, por tanto, pasa a formar parte de la micropartícula al reconstituirse.

- 5 La micropartícula de los párrafos anteriores puede estar hecha de un agente formador de gel, siendo dicho agente formador de gel preferentemente licuable al aplicar calor o luz, o al cambiar el pH, el potencial rediox, la fuerza iónica, la temperatura, el campo magnético o la radiación electromagnética, o al exponerse a una enzima o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, a un sustrato de dicha enzima, o a cualquier combinación de lo anterior.

El agente formador de gel puede formar una matriz que define la superficie y el volumen vacío de la micropartícula de los párrafos anteriores. La matriz puede ser una matriz porosa.

- 10 El agente formador de gel puede seleccionarse del grupo que comprende
- a) polímeros sintéticos preparados a partir de sus correspondientes monómeros, como el metilacrilato y el acrilato, la acrilamida y la metacrilamida, las lactamas cíclicas, los monómeros a base de estireno;
 - b) polímeros a base de silicona, por ejemplo, polidimetilsiloxanos y sus copolímeros;
 - 15 c) polímeros naturales seleccionados entre polisacáridos, por ejemplo, agarosa, quitina, quitosano, alginato, carragenina, celulosa, fucoidán, laminar, gomas seleccionadas entre la goma xantana, la goma arábica, la goma ghatti, la goma guar, la goma de garrofín, la goma tragacanto, la goma karaya y la inulina; polipéptidos, por ejemplo, por ejemplo, albúminas, colágenos, gelatinas; polinucleótidos; y combinaciones de los mismos.

- 20 El agente de captura puede seleccionarse entre anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluidos los aptámeros, Spiegelmers, proteínas que no son de anticuerpos y que son capaces de unirse específicamente a un analito o a un complejo de analitos, como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo, estreptavidina.

- 25 El agente de detección se puede seleccionar de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, Spiegelmers, proteínas que no son anticuerpos, como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo estreptavidina, cada uno de ellos marcado opcionalmente con una molécula informadora adecuada, como un tinte, una enzima, un catalizador químico o una mezcla de reactivos capaces de iniciar una reacción química que produce una señal detectable ópticamente o de otro modo que indica la presencia del analito para ser detectado.

La micropartícula de los párrafos anteriores puede estar específicamente etiquetada.

- 30 También se divulga una colección de micropartículas, siendo dichas micropartículas como se ha definido anteriormente.

Las micropartículas pueden ser diferentes entre sí en el sentido de que son específicas para diferentes analitos que se van a detectar, en el que cada micropartícula está específicamente etiquetada de manera que las diferentes micropartículas y sus correspondientes analitos detectados pueden distinguirse por las etiquetas específicas de las micropartículas.

- 35 También se divulga el uso de una micropartícula según los párrafos anteriores o de una colección de micropartículas según los párrafos anteriores, para realizar una detección digital de un analito o una pluralidad de analitos en una muestra.

- 40 También se divulga el uso de una micropartícula según los párrafos anteriores o de una colección de micropartículas según los párrafos anteriores para enriquecer y concentrar un analito en un volumen definido, o para enriquecer y concentrar una pluralidad de analitos en una pluralidad de volúmenes definidos, en los que preferentemente, todos dichos volúmenes definidos en dicha pluralidad de volúmenes definidos son iguales.

- 45 Los presentes inventores han ideado una metodología en la que, a diferencia de la técnica anterior, se utilizan micropartículas prefabricadas en y para un procedimiento de realización de una detección, en el que dichas micropartículas prefabricadas definen y limitan por sí mismas el espacio de reacción en el que tiene lugar dicha detección. En otras palabras, de acuerdo con la presente invención, la(s) micropartícula(s) prefabricada(s) se proporciona(n) y se utiliza(n) como compartimento de detección. Así, las dimensiones de la(s) micropartícula(s) de la presente invención definen y limitan las dimensiones de dicho compartimento en el que tiene lugar una detección. En contraste con ello, según el estado de la técnica, en muchos casos se utilizan perlas sólidas en las que se adhieren agentes de captura a la superficie de las mismas, y estas perlas actúan por sí mismas para atrapar, inmovilizar o
- 50 capturar un analito, pero para una reacción de detección posterior estas perlas o partículas se incorporan en gotas o espacios de reacción que son considerablemente más grandes que dichas perlas o partículas. Por el contrario, de acuerdo con la presente invención, una micropartícula prefabricada define y limita por sí misma las dimensiones del espacio de reacción en el que tiene lugar una reacción de detección. Así, las dimensiones de la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención son las dimensiones del espacio de reacción en el que tiene lugar
- 55 la detección de un analito. Por lo tanto, sin querer estar limitados por ninguna teoría, los presentes inventores

consideran su metodología como la primera y única compartimentación mediada por micropartículas para una reacción de detección. Esto distingue a la presente invención de todas las metodologías del arte previo descritas anteriormente. Así, de acuerdo con la presente invención, la micropartícula prefabricada, después de haber sido expuesta a una muestra acuosa sospechosa de contener un analito a detectar, no se incorpora posteriormente a una gota acuosa mayor rodeada de una fase oleosa. Asimismo, de acuerdo con la presente invención, la micropartícula prefabricada después de haber sido expuesta a una muestra acuosa que se sospecha que contiene un analito a detectar, tampoco se coloca en un compartimento más grande, como un pocillo o microreactor donde se combina con otros constituyentes de una solución acuosa, incluyendo un volumen de agua, para formar una gota acuosa que es considerablemente más grande que la propia micropartícula. En cambio, de acuerdo con la presente invención, la propia micropartícula prefabricada define y limita el espacio de reacción/compartimento de reacción en el que tiene lugar la detección de un analito.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la(s) micropartícula(s) prefabricada(s) de la presente invención proporciona(n) un andamio definidor de volumen que se llena o se llena con una solución acuosa hasta tal punto que se llena el volumen vacío total de dicha micropartícula prefabricada, o sólo una fracción del mismo. En otras palabras, de acuerdo con la presente invención, el volumen total del espacio de reacción en el que tiene lugar la detección de un analito, está limitado en el extremo superior por el volumen máximo previsto por la micropartícula prefabricada y está limitado de hecho por el volumen total de líquido o muestra líquida que toma dicha micropartícula prefabricada. Al incorporar dicha micropartícula prefabricada llena de líquido en una fase no acuosa, el volumen lleno de líquido de dicha micropartícula prefabricada representa y actúa así como un espacio de reacción en el que tiene lugar una reacción de detección del analito.

Tal compartimentación de un espacio de reacción por medio de una micropartícula prefabricada que en sí misma actúa como un andamio de volumen para proporcionar dicho espacio de reacción, no se ha descrito antes.

Existen dispositivos generadores de microgotas para llevar a cabo dichos procedimientos y para generar gotas acuosas que pueden adaptarse fácilmente a la presente invención. Por ejemplo, los dispositivos útiles para la presente invención son los dispositivos de dosificación de Dolomite Microfluidics, Reino Unido. Dichos dispositivos también se describen con más detalle en WO 2002/068104 y en WO 2005/089921. Los dispositivos descritos en el mismo pueden adaptarse para generar microgotas acuosas dentro de una fase oleosa, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. En otra realización, las gotas acuosas separadas generadas por el procedimiento anterior, en particular después de la etapa c), pueden lavarse utilizando una solución acuosa o agua. Además, posteriormente, pueden ser secados, por ejemplo, secados por congelación. De acuerdo con la presente invención, las gotas acuosas así producidas son micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención. En una realización, se puede utilizar un agente formador de gel para formar las gotitas acuosas/micropartículas prefabricadas, y dicho agente formador de gel es como se define más arriba. En una realización, las gotas acuosas que incluyen el agente formador de gel se secan, preferentemente secados por congelación. Alternativamente, se puede emplear cualquier otro medio adecuado para eliminar el disolvente. Una vez que se ha eliminado el disolvente y se ha secado la gota acuosa/micropartícula producida, se puede almacenar como polvo. Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que al proporcionar micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar espacios de reacción miniaturizados y definidos que pueden utilizarse de manera muy versátil para reacciones de detección, por ejemplo para realizar una detección digital de un analito en una muestra. Las micropartículas prefabricadas, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, pueden hacerse a medida eligiendo un agente de captura apropiado que esté comprendido en la micropartícula prefabricada y que, tras la exposición de la micropartícula a una muestra que rodee la micropartícula y que contenga un analito, se una selectiva y específicamente al analito que se desea detectar. Debido a su tamaño definido, las micropartículas ocupan un volumen definido de líquido y, por tanto, permiten que cualquier reacción (de detección) tenga lugar en un volumen definido de líquido. Efectivamente, las partículas proporcionan un medio eficiente y fácil de proporcionar una muestra que se sospecha que contiene un analito a detectar en pequeños volúmenes bien y claramente definidos. Las micropartículas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención también proporcionan un medio fácil para enriquecer selectivamente y/o concentrar el analito a detectar selectivamente en la superficie de la micropartícula. Si se desea, permiten además obtener una concentración uniforme y estandarizada de analito a partir de diferentes muestras que tienen diferentes volúmenes y diferentes concentraciones de partida de analito. Diferentes micropartículas pueden ser específicas para diferentes analitos a detectar mediante la elección del agente o agentes de captura adecuados. Además, dependiendo de su respectiva especificidad para un analito a detectar, diferentes micropartículas, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, pueden ser específicamente etiquetadas de tal manera que diferentes micropartículas y sus correspondientes analitos detectados pueden ser distinguidos por las etiquetas específicas de las micropartículas. Este tipo de etiquetado específico y la distinción que puede lograrse con él también se denomina aquí "codificación". Una micropartícula "codificada" es una micropartícula que se ha hecho específica, en términos de sus capacidades de unión, para un analito particular y que también ha sido marcada o etiquetada específicamente en consecuencia. Según una realización, las micropartículas prefabricadas están hechas de un agente formador de gel. En una realización, el agente formador de gel puede existir en dos estados diferentes, siendo uno de ellos un estado sólido o semisólido, y el otro un estado líquido. En una realización, en el estado sólido o semisólido, el agente formador de gel está presente en forma de un gel que forma una matriz y, con dicho gel, las micropartículas pueden, por ejemplo, estar en forma de una suspensión en la que las micropartículas incluyen un volumen de una solución acuosa y están dispersas en un medio no acuoso, como un medio oleoso. Efectivamente,

en este estado, las micropartículas representan gotas acuosas que están reforzadas por una matriz formada por el agente formador de gel/gel. Como se ha señalado anteriormente, dicha matriz define la superficie y el volumen de huecos de la micropartícula. En otra realización, el agente formador de gel puede pasar del estado sólido/semisólido a un estado líquido tras la aplicación de un estímulo adecuado. Dicho estímulo puede ser, por ejemplo, la aplicación de calor o luz o puede implicar un cambio de pH, potencial redox, fuerza iónica, temperatura, campo magnético o radiación electromagnética. Alternativamente, dicho estímulo externo puede ser también la exposición a una enzima (que, por ejemplo, puede digerir la matriz formada por el agente formador de gel) o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, dicho estímulo puede ser la exposición a un sustrato de dicha enzima. También se contemplan combinaciones de cualquiera de los estímulos anteriores. Una vez que el agente formador de gel ha sido transferido del estado sólido/semisólido a un estado líquido, resultará una gota acuosa en un medio no acuoso (por ejemplo, aceite). Mientras el agente formador de gel se encuentre en estado sólido/semisólido, las micropartículas estarán en forma de suspensión de dichas partículas sólidas/semisólidas en una fase no acuosa. Una vez licuado el agente formador de gel, las micropartículas están en forma de emulsión de una fase acuosa en una fase no acuosa.

Las micropartículas prefabricadas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención son almacenables, en particular en estado seco o desecado, preferentemente durante un periodo de al menos dos meses, más preferentemente durante un periodo de al menos seis meses. En una realización, son almacenables durante un período de al menos un año. En una realización, la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o varios agentes estabilizadores que ayudan a conservar la micropartícula. Ejemplos de tales agentes estabilizadores son las ciclodextrinas (por ejemplo, Cavasol[®]), la trehalosa, la sacarosa, la lactosa, la manosa, la glucosa, la galactosa, el manitol, el mioinositol, los poli(óxidos de alquileno), en particular los poli(etilenglicoles) y sus derivados. El término "prefabricado", tal y como se utiliza en el presente documento, pretende diferenciar la micropartícula/micropartículas de acuerdo con la presente invención de otras micropartículas del estado de la técnica que pueden utilizarse posiblemente con fines de detección, en el sentido de que la(s) micropartícula(s) prefabricada(s) de acuerdo con la presente invención no es(n) una(s) partícula(s) que se genere(n) en el momento y/o lugar de su uso previsto. Por lo tanto, una micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención no es una partícula generada in situ, es decir, no es una partícula que se genere en el curso de la reacción, por ejemplo, el ensayo analítico, en el que se pretende utilizar. En particular, no se genera en el lugar o el momento o la reacción en, en o durante la cual debe tener lugar la detección de un analito. El término "generado in situ", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia o partícula que se genera a partir de uno o más precursores en el lugar y/o momento en que se pretende utilizar dicha sustancia o partícula. Además, una micropartícula prefabricada, de acuerdo con la presente invención, no es una partícula que, en el momento de ser generada, esté hecha para abarcar o incluir o incorporar o engullir una muestra que contenga un analito. Más bien, una micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención se genera primero y, opcionalmente, se procesa adicionalmente, por ejemplo, se lava, se seca, se reconstituye, etc.; y sólo después de su generación, una micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención se expone entonces a una muestra que contiene un analito o se sospecha que contiene un analito.

El término "micropartícula", tal y como se utiliza en este documento, se refiere a una partícula cuyas dimensiones medias están en el intervalo de los micrómetros. En una realización, las micropartículas de acuerdo con la presente invención tienen un tamaño medio o dimensión media o diámetro medio de aproximadamente 5 μm - 200 μm , preferentemente 5 μm - 150 μm , más preferentemente 10 μm - 100 μm . En una realización, las micropartículas de acuerdo con la presente invención son esféricas u ovaladas o elipsoidales, preferentemente esféricas, y las dimensiones mencionadas anteriormente se refieren al diámetro medio de dicha micropartícula esférica, ovalada o elipsoidal. En una realización, las micropartículas tienen la forma de una gota (esférica). En otra realización, una micropartícula de acuerdo con la presente invención es un cuerpo esférico o un cuerpo cuasi-esférico, es decir, que tiene la forma de una esfera (o se aproxima a ella), teniendo dicha esfera un diámetro medio de las dimensiones mencionadas. En una realización, una micropartícula de acuerdo con la presente invención es porosa. En otra realización, una micropartícula de acuerdo con la presente invención, en particular una micropartícula porosa, tiene una superficie que está disponible para alojar un agente de captura, en el sentido de que el agente de captura se encuentra predominantemente en la superficie de la micropartícula. En una realización, la superficie de una micropartícula esférica porosa de acuerdo con la presente invención que tiene un diámetro definido, es x veces la superficie de una micropartícula no porosa que tiene el mismo diámetro, siendo x seleccionada entre al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 50, al menos 100 o al menos 500. En una micropartícula esférica porosa de este tipo, de acuerdo con la presente invención, la densidad del agente de captura por micropartícula aumenta considerablemente y permite detectar una concentración particularmente eficaz de analito en la superficie de la micropartícula. Esto se debe a que la densidad del agente de captura en la superficie de la micropartícula también es particularmente alta.

La(s) micropartícula(s) de acuerdo con las realizaciones de la presente invención también se caracterizan por el hecho de que, cuando se generan o cuando se utilizan, no incorporan o incluyen o abarcan una célula biológica. Asimismo, cuando se generan o cuando se utilizan, tampoco incluyen o incorporan o abarcan un analito en su interior. Más bien, cualquier analito que deba ser detectado por medio de la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención se une selectiva y específicamente a la micropartícula prefabricada en su superficie, estando el analito localizado en o procedente de una muestra que rodea a la micropartícula prefabricada. Por lo tanto, en una realización, la micropartícula de acuerdo con la presente invención comprende un agente de captura que, tras la exposición de la

micropartícula a una muestra que rodea a la micropartícula y que contiene un analito, se une selectiva y específicamente al analito que se va a detectar, donde el agente de captura se une al analito de una muestra que rodea a la micropartícula (y no se une a un analito de una muestra que se encuentra dentro de la partícula). En una realización, la micropartícula comprende un agente de captura que está localizado predominantemente en la superficie de la micropartícula, y por lo tanto, la micropartícula es capaz de enriquecer y concentrar un analito localizado fuera de la micropartícula. El término "predominantemente localizado", cuando se utiliza junto con un agente de captura localizado en la superficie de una micropartícula, se refiere a un escenario en el que la mayoría de dichas moléculas de agente de captura están localizadas en la superficie de la micropartícula en lugar de en su interior. Tal y como se utiliza aquí, el término "superficie" se refiere a la parte de una micropartícula que es accesible desde el exterior de la misma. Asimismo, tal y como se utiliza aquí, el término "interior de una micropartícula" se refiere a la parte de una micropartícula que no es accesible al exterior de la misma. En una realización de acuerdo con la presente invención, la micropartícula de acuerdo con la presente invención no encapsula o engloba un analito o una célula biológica o un microorganismo, como una bacteria, y por tanto no contiene dicho analito en su interior.

De acuerdo con las realizaciones de la invención, una micropartícula tendrá una capacidad inherente (limitada) de comprender o alojar un agente de captura. Por lo tanto, en una realización de una colección de micropartículas, preferentemente, las micropartículas individuales tendrán aproximadamente la misma densidad de agentes de captura, es decir, el mismo número de agentes de captura por unidad de superficie de micropartícula. Esto permitirá que las micropartículas enriquezcan y concentren un analito hasta aproximadamente la misma concentración, incluso cuando se utilicen diferentes muestras con distintas concentraciones de analito. Así, las micropartículas prefabricadas según las realizaciones de la presente invención también permiten la generación de múltiples espacios/volumenes de reacción idénticos, preferentemente con una concentración uniforme de analito en la superficie de las micropartículas, después de que las micropartículas hayan sido expuestas a una muestra que contiene un analito.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "detección digital", cuando se utiliza junto con las micropartículas de acuerdo con la presente invención, se refiere a un escenario en el que la relación entre el número de micropartículas y el número de moléculas de analito se ajusta de tal manera que hay un máximo de una sola molécula de analito unida por micropartícula y la unión de una sola molécula de analito por micropartícula sigue una distribución de Poisson. Alternativa o adicionalmente, el término "detección digital", cuando se utiliza junto con las micropartículas de acuerdo con la presente invención, se refiere a un escenario en el que una muestra se porciona mediante una colección de micropartículas de acuerdo con la presente invención, de manera que cada micropartícula proporciona el mismo volumen de reacción y las mismas condiciones de reacción y, preferentemente, también contiene aproximadamente o exactamente el mismo número de moléculas de analito. En este último caso, las micropartículas sirven para crear una pluralidad de espacios de reacción similares (por ejemplo, espacios de detección) para cada tipo de analito que se va a detectar, en los que los espacios de reacción preferentemente las concentraciones individuales de analito son las mismas (o casi idénticas dentro del margen de error) entre las diferentes micropartículas. Así, las micropartículas, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, permiten la generación de una pluralidad de microespacios de reacción idénticos en los que para cada tipo de micropartícula, preferentemente, se consiguen concentraciones de analito y/o condiciones de reacción idénticas o casi idénticas. Este último escenario es de especial interés en condiciones en las que la concentración del analito en una muestra es suficientemente alta. El primer escenario (1 analito unido por micropartícula como máximo) es particularmente aplicable cuando la concentración del analito en una muestra es bastante baja. En una realización, la presente invención también se relaciona con el uso de micropartículas prefabricadas como se definió anteriormente, para la provisión de una pluralidad de espacios de reacción idénticos o casi idénticos, proporcionando volúmenes de reacción idénticos y condiciones de reacción idénticas, por ejemplo, para realizar una reacción de detección.

En una realización, en una colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, todas las micropartículas son de idéntico tamaño y, por tanto, cada una de dichas micropartículas prefabricadas proporciona y define el mismo volumen de reacción, sirviendo dicho volumen de reacción, por ejemplo, como espacio de reacción para una reacción de detección. En una realización, en una colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, todas las micropartículas son del mismo tipo y son específicas para la detección de un analito. En otra realización, en dicha colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, hay diferentes tipos de micropartículas siendo cada tipo específico para la detección de un analito diferente. Esta última colección de micropartículas de acuerdo con la presente invención es particularmente útil para la detección de múltiples (diferentes) analitos en una o varias muestras. A veces, tal y como se utiliza en este documento, el término "micropartícula prefabricada" se utiliza aquí de forma intercambiable con el término "perlas de amplificación digital" (abreviado también como "DAB"). En una realización, en una colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, dichas micropartículas prefabricadas existen como entidades que están totalmente separadas espacialmente unas de otras. En una realización, en dicha colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, dicha colección es por tanto monodispersa. Si es necesario, dicha colección de micropartículas prefabricadas monodispersas puede proporcionarse con las micropartículas prefabricadas situadas en un sustrato o asociadas a él. Por ejemplo, dicho sustrato puede ser un tamiz con pocillos individuales que proporcionan el espacio suficiente para acomodar una sola micropartícula prefabricada por pocillo. Alternativamente, dicho sustrato puede ser un sustrato con rebajes o canales o ranuras dispuestos regularmente para alojar una micropartícula prefabricada cada uno. En una realización, dicho sustrato puede ser un filtro. En una realización, las micropartículas prefabricadas, que contienen una solución acuosa y están dispersas/suspendidas en una fase no acuosa, pueden

someterse a uno o varios pasos de lavado. En este sentido, también pueden mantenerse en un sustrato del tipo mencionado. Alternativa y/o adicionalmente, las micropartículas prefabricadas según las realizaciones de la presente invención pueden ser expuestas posteriormente a una muestra que contenga un analito o que se sospeche que contiene un analito. En virtud de la presencia de un agente de captura adecuado en una micropartícula prefabricada, un analito procedente de una muestra que rodea la micropartícula, puede unirse a la micropartícula y ser detectado posteriormente. La finalidad del agente de captura es una concentración y enriquecimiento local del analito en el exterior de la micropartícula. El propósito del agente de detección es unir el analito o un complejo entre un agente de captura y el analito, y así hacer que dicho analito, solo o en complejo con un agente de captura, sea detectable. En una realización, dicha detección se produce mediante la detección del agente de detección que está unido al analito o al complejo entre el agente de captura y el analito. En una realización, el analito se amplifica mediante una reacción de amplificación, y el producto así amplificado se detecta mediante un agente de detección, siendo esto particularmente preferido en el caso de que el analito sea un ácido nucleico y la reacción de amplificación sea una reacción de amplificación de ácido nucleico. Ejemplos de estas reacciones de amplificación de ácidos nucleicos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o las reacciones de amplificación isotérmica, tales como la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la replicación de secuencia autosostenida (3SR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación por círculo rodante (RCA), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA) y la reacción de amplificación de la enzima con mella (NEAR). Un experto en la técnica conoce bien cualquiera de estas reacciones de amplificación y es capaz de realizarlas, según sea necesario. En otra realización, la detección del analito puede producirse realizando primero una reacción de amplificación de la señal y detectando posteriormente la señal así amplificada. En esta última realización, una señal sólo se amplifica si hay una señal en primer lugar, es decir, una señal sólo se produce cuando hay un analito que detectar, y la reacción de amplificación de la señal puede ser, por ejemplo, una amplificación de ácido nucleico si un ácido nucleico es o forma parte del agente de detección. Alternativamente, la reacción de amplificación de la señal puede ser una amplificación enzimática de una señal, si una enzima es o forma parte del agente de detección. En una realización preferida del procedimiento para realizar una detección digital de un analito en una muestra, una colección de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención se exponen a una muestra que se sospecha que contiene un analito a detectar, y en dicho paso de exposición, el número de micropartículas y el número de moléculas de analito en la muestra se mantienen o se ajustan, según sea necesario, de manera que la unión de una sola molécula de analito por micropartícula sigue preferentemente una distribución de Poisson. En una realización preferida de este procedimiento, en promedio, no hay más de una molécula de analito unida por micropartícula. Esto permite la detección de una sola molécula de analito por micropartícula. En otra realización, el número de moléculas de analito por micropartícula se mantiene o se ajusta, según sea necesario, de manera que, en promedio, en cada micropartícula hay un número idéntico de moléculas de analito unidas por micropartícula. En esta última realización, las micropartículas sirven para crear una pluralidad de espacios de detección similares para que se produzca una reacción de detección.

A continuación, se hace referencia a las Figuras, en las que

La figura 1 muestra una representación esquemática de micropartículas prefabricadas de acuerdo con realizaciones de la presente invención. El panel A muestra una vista exterior de una micropartícula prefabricada (círculo gris grande) en la que se inmovilizan varias moléculas de agentes de captura (pequeños círculos negros rellenos). La micropartícula prefabricada tiene una matriz que es capaz de absorber una solución acuosa que incluye reactivos para cualquier reacción en la que se vaya a utilizar la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención. El panel B muestra una forma de realización de una micropartícula prefabricada que tiene poros. El panel B muestra una realización en la que la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención es porosa y tiene un número de poros, algunos de los cuales son accesibles desde el exterior y otros no. De nuevo, las moléculas del agente de captura se muestran como pequeños círculos negros rellenos. Las moléculas del agente de captura se encuentran predominantemente en la superficie de la micropartícula, refiriéndose dicha superficie a la parte de la micropartícula que es accesible desde el exterior de la micropartícula. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, dicho término "ser accesible" se refiere a la accesibilidad por o para un analito a ser detectado. Las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse en reacciones de detección o cuantificación, por ejemplo una reacción de detección digital.

La figura 2 muestra un diagrama de flujo esquemático de una reacción de detección de acuerdo con la presente invención. A un recipiente que contiene micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención (dicha micropartícula prefabricada se muestra esquemáticamente en la figura como un círculo blanco en el fondo del recipiente de reacción), se añade un líquido de muestra que incluye un analito. La micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención (en este documento también se denomina a veces perla de amplificación digital, "DAB") después de haber sido expuesta al analito (opcionalmente etiquetado) y después de haber unido el analito por el agente de captura, se transfiere a un nuevo recipiente de reacción. Las micropartículas prefabricadas según las realizaciones de la presente invención comprenden un agente de captura adecuado, por ejemplo, estreptavidina, que es capaz de unir el analito de interés, en el presente ejemplo el analito de interés biotinilado. Las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención se colocan en un tamiz o filtro en la parte superior del recipiente de reacción y se lavan

con un tampón de lavado adecuado para eliminar el analito no unido. Las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención contendrán así una solución acuosa y, si el agente de captura de las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención ha unido el analito, también el analito correspondiente en la superficie. A continuación, las micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención, que descansan en el tamiz o filtro, se sumergen en una fase oleosa, por ejemplo, un aceite de inmersión. A continuación, se da la vuelta al tamiz o al filtro y las micropartículas prefabricadas que contienen una fase acuosa que incluye el analito se lavan con más aceite de inmersión para producir una suspensión de micropartículas prefabricadas (que contienen una solución acuosa que incluye un analito) en una fase oleosa, en este caso el aceite de inmersión utilizado para el lavado de las micropartículas prefabricadas del tamiz o del filtro. Las micropartículas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención también contienen un agente de detección que permite la detección de un analito en una reacción de detección posterior. A continuación, se lleva a cabo dicha reacción de detección posterior, como resultado de la cual ciertas micropartículas indican la presencia de un analito, mientras que otras no lo hacen. Las micropartículas que indican la presencia de un analito se muestran en la figura como círculos oscuros rellenos, mientras que las micropartículas que indican un resultado negativo se muestran como círculos blancos.

La figura 3 muestra una reacción similar a la de la figura 2, pero a nivel de la micropartícula individual. A la izquierda, se muestra una micropartícula prefabricada de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, mostrándose dicha micropartícula como un círculo blanco. Hay moléculas de agente de captura situadas predominantemente en la superficie de la micropartícula, y en la parte exterior que rodea a la micropartícula, hay ácidos nucleicos (líneas cuadrículadas) algunos de los cuales están etiquetados con un agente adecuado, por ejemplo, biotina (cuadrado). Las moléculas del agente de captura comprenden otro agente complementario, por ejemplo, estreptavidina (molde negativo de un cuadrado mostrado en el agente de captura, "perlas" decoradas en la superficie de la micropartícula) en esta realización, y aquellos ácidos nucleicos marcados con biotina (cuadrado) se unirán a los respectivos agentes de captura. Está claro que la biotina y la estreptavidina también pueden intercambiarse, es decir, la biotina está comprendida en el agente de captura y la estreptavidina está unida al ácido nucleico. Los ácidos nucleicos no marcados no se unen y pueden ser eliminados en un paso de lavado posterior (véase la figura 2). A continuación, la solución que contiene las micropartículas se mezcla con aceite y se retira de la fase oleosa todo el líquido acuoso que no esté embebido en una partícula. Queda así una suspensión de partículas en una matriz no acuosa (mostrada en la figura como un marco cuadrado). El material del que está hecha la micropartícula prefabricada de acuerdo con la presente invención también puede licuarse en esta realización, y si se produce dicha licuación (véase el marco cuadrado de la derecha de la figura), después de que la micropartícula se haya introducido en una fase oleosa adecuada, se generará un espacio de microrreacción que contiene una solución acuosa que incluye un analito que debe detectarse y una reacción de detección dentro de una fase oleosa (marco cuadrado de la derecha de la figura 3).

La figura 4 muestra diferentes micropartículas prefabricadas (o perlas de amplificación digital, "DAB") codificadas y etiquetadas por colores que han sido marcados con diferentes tintes. Estas etiquetas diferentes pueden lograrse eligiendo diferentes tipos de colorante o diferentes concentraciones de colorante para diferentes micropartículas prefabricadas. En el panel de la derecha (B), esto se muestra esquemáticamente mostrando diferentes micropartículas de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes cantidades de colorante y que son específicas para diferentes analitos. Dicha "codificación" puede estar en relación con la especificidad del agente de captura o la especificidad del agente de detección de la micropartícula individual.

La figura 5 muestra ejemplos de micropartículas prefabricadas de acuerdo con la presente invención. El panel A muestra una imagen de transmisión ampliada 5 veces de micropartículas prefabricadas que contienen una fase acuosa en una fase oleosa. El panel B muestra una imagen de transmisión ampliada 5 veces de micropartículas prefabricadas que contienen una fase acuosa, en solución salina de tampón fosfato (PBS). En ambos paneles se observa que las micropartículas prefabricadas son de tamaño uniforme y proporcionan una pluralidad de volúmenes de reacción/espacios de reacción idénticos para que se produzca una reacción de detección.

La figura 6 muestra una imagen de fluorescencia ampliada 5 veces (con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm) en la que se muestran las micropartículas prefabricadas en una fase oleosa después de haber realizado una reacción de amplificación por PCR. Las micropartículas prefabricadas se produjeron como se describe en la realización 2 de los ejemplos de la presente especificación. Como puede verse claramente, hay micropartículas prefabricadas que tienen una señal de fluorescencia brillante, y hay otras micropartículas prefabricadas que muestran una señal de fluorescencia de bajo flujo. En aquellas micropartículas con una señal de fluorescencia brillante, se ha producido una amplificación exitosa del analito, en este caso de un ácido nucleico, y esto se muestra por la señal de fluorescencia brillante. En otras micropartículas, no se ha producido ninguna reacción de amplificación, lo que se indica por la ausencia de fluorescencia o por una señal de fluorescencia comparativamente baja que se deriva de la fluorescencia de fondo de las sondas que se han utilizado aquí (por ejemplo, las sondas TaqMan).

Además, se hace referencia a los siguientes ejemplos que se dan para ilustrar, no para limitar la presente invención.

Ejemplos

Realización 1: Generación de perlas de amplificación digital monodispersas (DAB)

Generación de mezclas DAB

5 Componente 1:

Agua desionizada, libre de nucleasas

Agarosa de gelificación ultra baja (Sigma-Aldrich, #A5030), marcada con biotina al 2% (p/v)

Para preparar la agarosa marcada con biotina, primero se activó la agarosa de temperatura de gelificación ultrabaja y luego se acopló a la biotina EZ-Link™ Amine-PEGII. Además, la activación puede llevarse a cabo mediante la modificación del cian de bromo, la oxidación suave (generación de grupos aldehídos), el carbonildiimidazol (CDI) o por otros procedimientos conocidos. Alternativamente, un compuesto reactivo de biotina como, por ejemplo, una biotinmonoclorotriazina puede acoplarse directamente sobre la agarosa. La cobertura óptima de biotina se determina por titulación en pruebas preliminares con el fin de maximizar la capacidad de unión de la estreptavidina manteniendo las propiedades de la matriz de la agarosa (comportamiento de fusión y formación de gel, baja unión inespecífica).

15 Los constituyentes del componente 1 se pipetea juntos, se agitan brevemente en un mezclador de vórtice y se centrifugan. Posteriormente, la mezcla se incuba a 65°C a 1500rpm en un termoagitador para fundir la agarosa de gelificación ultrabaja y obtener una mezcla de amplificación de agarosa homogénea. Posteriormente, la mezcla del componente 1 se enfría a 35°C y se mezcla con un volumen igual del componente 2 que se ha mantenido a la misma temperatura.

20 El componente 2 consiste en 2x Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, #13000012). La mezcla de DAB se conserva a continuación a 35°C hasta su uso posterior.

Generación de DABs monodispersos en el sistema Dolomite µEncapsulador

25 Se filtran 5 ml del reactivo de emulsión PicoSurf™ 5% en aceite Novec7500 (Dolomite Microfluidics) a través de un filtro de 0,2µm, se transfieren a un tubo de vidrio limpio de 20ml (Fisher Scientific, # 12353317) y se colocan en el depósito de una bomba que controla el flujo de la fase oleosa (bomba de fase oleosa). Otras dos bombas que controlan el flujo de la fase de agarosa (bombas de mezcla DAB) se llenan con el "líquido conductor" inerte HFE-7500 (Dolomite Microfluidics, #3200425).

30 Se colocan en el sistema µEncapsulador 1 un "Chip de gotas de reactivo" (50µm, Dolomite Microfluidics fluorado, #3200445) y un "Chip de depósito de muestras" (Dolomite Microfluidics, # 3200444). La temperatura de la unidad de control de temperatura (TCU) se ajusta a 35°C. Se añade un volumen de 100µl de la mezcla DAB a cada depósito del chip de depósito de muestras. Las gotas se generan con caudales de aproximadamente 2µl/min para ambas bombas DAB Mix y con aproximadamente 50µl/min para la bomba de fase oleosa. Los parámetros se supervisan con el software Dolomite Flow Control Advanced. Las DABs generadas tienen un volumen de aproximadamente 65pl. El material se recoge en un tubo Eppendorf con hielo y se almacena a 2-8°C.

35 **Transferencia de las DAB a la fase acuosa y exclusión de las partículas no conformes**

Las DAB se extraen de la fase oleosa por centrifugación a través de una estructura de tamiz. Así se eliminan las perlas de tamaño desviado. Para ello, la emulsión de DAB se aplica primero a un tubo equipado con un tejido SEFAR PETEX® w = 44µm) y se centrifuga a 300×g. La fase oleosa y las DAB de tamaño inferior se desplazan a través del tamiz, mientras que las DAB de mayor tamaño permanecen en el tejido SEFAR. Para eliminar completamente la fase oleosa, las DAB se vuelven a suspender en tampón de lavado y se filtran de nuevo a través del tamiz SEFAR. El tampón de lavado empleado consiste en un tampón de PCR Taq ADN polimerasa [20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl] (Invitrogen, # 18067017) y 1% TritonX100 (Sigma-Aldrich, # X100). Este paso de lavado se repite 5 veces hasta que la fase oleosa se haya eliminado por completo. Se realizan dos lavados adicionales con tampón de ADN polimerasa 1×Taq sin detergente. Las DAB se recuperan aplicando la unidad de filtrado en un tubo de centrifugado adecuado en orientación opuesta. El tampón de lavado se aplica desde la parte superior a la cara posterior del filtro (la cara que da la espalda a las partículas). La unidad de filtración se centrifuga durante 1min a 1.000×g. Para recuperar todas las partículas, este paso se repite varias veces. Las DAB sobredimensionadas se filtran pipeteando todo el volumen sobre un filtro equipado con tejido SEFAR PETEX® con un ancho de malla de w = 59 µm (SEFAR AG, 07-59 / 33). La unidad se centrifuga brevemente a 300×g. Se recoge el material que ha pasado el filtro y que contiene las DAB del tamaño deseado.

Recubrimiento de DAB con estreptavidina

El recubrimiento de las DAB con estreptavidina se realiza en el tampón de lavado utilizado anteriormente. La concentración de estreptavidina se selecciona de forma que no quede biotina accesible en la superficie de las DAB.

En cualquier caso, la estreptavidina se aplica en exceso para evitar el entrecruzamiento de las DAB. La concentración óptima de estreptavidina se ha determinado en los ensayos preliminares con estreptavidina marcada mediante la determinación de una cobertura de la superficie de la meseta. Tras el acoplamiento con estreptavidina, las DAB se lavan varias veces en unidades de centrifugación SEFAR PETEX de 44 µm con un tampón de lavado sin estreptavidina. Posteriormente, se determina la concentración de las DAB mediante recuento al microscopio en una cámara de recuento DHC-DHC-N01 (Neubauer Improved) (INCYTO) o citométricamente en el citómetro de flujo CytoFlex (Beckman Coulter).

Las DAB se toman en alícuotas en unidades que contienen aproximadamente 100.000 perlas y se mezclan con 100mM de trehalosa. Una vez eliminado el exceso de volumen de tampón, las DAB se liofilizan.

Realización 2: Aplicación de perlas de amplificación monodispersas (DABs) para realizar la PCR digital

Enriquecimiento de una diana del VIH 1 (subtipo O) en DAB e incubación de esas perlas con una mezcla de amplificación

El ARN del VIH-1 purificado (subtipo O) marcado con biotina mediante transcripción inversa se enriquece en perlas de amplificación digital modificadas con estreptavidina. Todo el volumen de la reacción de transcripción inversa (RT) se añade a una cantidad definida de DABs liofilizadas. Las DAB absorben una parte del líquido aplicado y se hinchan. Las perlas se vuelven a suspender cuidadosamente. Para evitar los aglomerados se puede utilizar el ultrasonido. Posteriormente, la suspensión se aplica a un tubo de centrifugación equipado con tejido SEFAR PETEX® (w = 44 µm). El sobrenadante se elimina por centrifugación de la columna a 300 xg. Para el lavado, se añade a la columna el tampón de lavado utilizado anteriormente y también se centrifuga a 300 xg. El lavado se repite varias veces y las DAB se recogen finalmente en el componente 3. En esta realización las DABs toman todos los componentes necesarios para la PCR por difusión.

El componente 3 consiste en los siguientes reactivos (concentraciones finales):

- 1x Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, # 13000012)
- 0.2µM de cebador de sentido: GCAGTGGCGCCCGAACAGG (Metabion international AG)
- 0.2µM de cebador antisentido 1: ACTGACGCTCTCGCACCCATCT (Metabion international AG)
- 0.2µM de cebador antisentido 2: TGACGCTCTCGCACCCATCTCTC (Metabion international AG)
- 1x SYBR® Green I tinción de ácido nucleico en gel (Sigma-Aldrich, #S9430) o 1x EvaGreen® Fluorescent DNA stain (Jena Bioscience, #PCR-352)

Compartimentación por dispersión de DABs en aceite

Los microcompartimentos con un volumen definido se crean mediante la dispersión de microcápsulas en un aceite de fluorocarbono, por ejemplo, PicoSurf™ 5 % dispersado en aceite Novec 7500 (Dolomite Microfluidics, # 3200214). En lugar de un aceite pesado de fluorocarbono puede aplicarse un aceite mineral ligero con emulsionante, por ejemplo, aceite mineral (Sigma-Aldrich, # M5904 Sigma) con un 5 % (p/p) de Span 80 (Sigma Aldrich, # 85548).

La fase acuosa completa se pone en contacto con un exceso de aceite en un tubo Eppendorf. Los ultrasonidos se aplican durante un minuto. Tanto las DAB cargadas con la diana del subtipo O del VIH-1 como el sobrenadante del componente 3 se dispersan y emulsionan en la fase oleosa. Las gotas acuosas generadas del sobrenadante del componente 3 y las DAB difieren significativamente en su volumen, teniendo las gotas un volumen mucho menor. La emulsión generada se pipetea en un tejido SEFAR PETEX® con una anchura de malla de 44 µm. Las gotas más pequeñas, así como las gotas más grandes que pueden no contener microcápsulas, se eliminan mediante una centrifugación suave. El lavado repetido con el mismo aceite elimina todas las gotas de líquido. Introduciendo la unidad de filtrado en un tubo de centrifugación adecuado en la orientación opuesta, las DAB concentradas se extraen del tamiz. El aceite con las DAB se transfiere a una cámara de detección con un área de aproximadamente 2 cm² y un espesor de capa de aproximadamente inm. Las superficies opuestas de la cámara están hechas de material hidrófobo transparente. Si se utiliza un aceite de fluorocarbono, las DAB se ensamblan como una monocapa (empaquetamiento denso) en la superficie superior hidrófoba debido a la diferencia de densidad entre las perlas y el aceite. Si se aplica un aceite mineral, las DAB se acumulan en la superficie inferior. De este modo, las DAB proporcionan microcontenedores de reacción para la posterior PCR digital.

Reacción de amplificación en microcompartimentos DAB

Las DAB suspendidas en aceite se someten al ciclo de temperatura en la misma cámara en un elemento PELTIER 30×30×4,7mm, 19,3W (Quick-Ohm, Küpper & Co. GmbH, #QC-71-1,4-3,7M). El ADNc capturado se internaliza al fundirse la agarosa y transformarse las DAB en gotas líquidas. La amplificación de moléculas individuales de ADNc tiene lugar en los compartimentos de microrreacción resultantes.

Las condiciones térmicas aplicadas son:

Desnaturalización inicial durante 2 min a 95 ° C, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 seg, fusión a 65 °C durante 15 seg y extensión a 72 °C durante 30 seg. Una vez completado el protocolo térmico, el contenido de la cámara se visualiza a 21 °C en modo de luz blanca transmitida y fluorescencia con excitación λ_{exc} = 470 nm y emisión de paso largo de >496 nm. Se determina el número total de microcápsulas y el número de las que tienen una señal de fluorescencia por encima de un umbral de intensidad definido. El valor del umbral se deriva de las reacciones de amplificación realizadas anteriormente sin plantilla. El número de plantillas en la reacción se determina aplicando los números determinados de gotas positivas y negativas a la estadística de Poisson.

Realización 3: Establecimiento de ELISA digital

Aquí se describe el proceso de establecer un inmunoensayo digital para la detección de cTnI humana. El ensayo emplea la inmuno-PCR en formato digital: un anticuerpo de detección marcado con ADN y un anticuerpo de captura marcado con estreptavidina forman un complejo tipo sándwich con el antígeno en solución. Este complejo queda atrapado en partículas de agarosa recubiertas de biotina con reactivos embebidos para llevar a cabo una amplificación por PCR. El anticuerpo de detección no unido, y por tanto la etiqueta de ADN, se elimina mediante los pasos de lavado adecuados. Las partículas de agarosa se suspenden en aceite para que se formen compartimentos de reacción separados. En la siguiente gota se detecta la etiqueta de ADN unida a la PCR.

Anticuerpos de detección

El anticuerpo de detección de cTnI (clon 3H9, SDIX) se marca utilizando el sistema de conjugación oligo Thunder-Link® PLUS (Innova Bioscience) según el protocolo del fabricante y luego se purifica. La siguiente secuencia está acoplada a los anticuerpos

5'GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTG
CGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT
TGCCGGATCAAGAGCT3'

Anticuerpo de captura:

El clon TPC-110 (SDIX) se utiliza como anticuerpo de captura. Se marcó con Lightning link Streptavidin (Innova Bioscience) según el protocolo del fabricante.

Preparación de las DABs

La preparación de las DABs se realizó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con la siguiente modificación. Tras transferir las partículas de agarosa marcadas con biotina a la fase acuosa y eliminar los tamaños de partícula inadecuados en la realización ejemplar, las partículas se recogen en el tampón PCR 1x. La concentración de las partículas se ajusta a unos 4.000/μl. Las partículas se alicuotan en unidades de 25μl.

Formación del complejo inmunitario y su captura:

Mezcla de reacción

plasma humano	80μl
TBS(K) pH 8,4 (20mM Tris, 50mM KCl pH 8,4), 0,5% TritonX-100, 10mg/ml BS	10 μl
HBR-Plus (Scantibodies)	10 μl
Anticuerpo de detección marcado con ADN	x μl
Anticuerpo de captura marcado con estreptavidina	y μl

Optimización de la concentración de anticuerpos:

La concentración óptima de anticuerpos de detección y de captura se determina mediante la inmuno-PCR convencional. Se variaron sistemáticamente las concentraciones de los dos anticuerpos y se generaron inmunocomplejos utilizando plasma sin troponina (controles negativos) y plasma sin troponina con cantidades definidas de troponina I. Éstas se capturaron en partículas, se lavaron y se sometieron a la PCR convencional. La concentración óptima de los respectivos anticuerpos está indicada por el límite de detección más bajo y el intervalo de medición dinámico más amplio.

Generación y captación del complejo inmunitario:

Se preparan 25μl de mezcla de reacción (ver arriba) con las concentraciones óptimas previamente determinadas de los dos anticuerpos. La mezcla de reacción se incuba durante 10 minutos a 37°C a 800rpm en un termomixer Eppendorf. Posteriormente, la mezcla se mezcla con una alícuota de partículas DAB (100.000 partículas en 25 μl de tampón de polimerasa 1 × Taq).

La mezcla se incuba en un termomixer durante 5 minutos a 25°C a 800rpm. Durante este tiempo se produce la unión de los anticuerpos de captura marcados con estreptavidina, incluidos los complejos inmunes a las DAB. El líquido se aplica a un filtro con tejido SEFAR PETEX® (w = 44µm) y se centrifuga a 300xg. se realizan 5 lavados con 500 µl de TBS (K) pH 8,4 (20 mM Tris, 50 mM KCl pH 8,4), 0,05% TritonX-100, 1 mg / ml BSA. A continuación, se realizan dos lavados adicionales con tampón de PCR Taq ADN polimerasa [20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl].

Se prepara una mezcla de reacción PCR (volumen 25 µl) con la siguiente composición:

500nM Cebador de fw (5' AGCTTGATCCGGCAAACA 3')

500nM Cebador de rev (5' GCGTCAGACCCCGTAGAAAA 3')

Tinción de gel de ácido nucleico SYBR® Green I (Sigma-Aldrich, #S9430) 1:25000

12,5µl 2x PCR-Mastermix

Agua de grado PCR

Las DAB se recuperan del tamiz colocando el filtro en la orientación opuesta en el tubo. La mezcla de reacción PCR se aplica al filtro. A continuación, se centrifuga la unidad durante 1 minuto a 1000 × g. Las DAB se recogen en el fondo del tubo de centrifuga y se incuban durante 10 minutos en la mezcla de reacción de PCR a 25°C a 800rpm en un termomixer.

Realización de la reacción PCR

Las DAB se transfieren a la fase oleosa como se describe en la realización 2. La amplificación por PCR se realiza durante 40 ciclos con los siguientes parámetros:

Ciclo 1:

5min 95°C

30seg 65°C

30seg 72°C

Ciclo 2 - 40:

30seg 94°C

30seg 65°C

30seg 72°C

Después de completar la amplificación, la señal verde SYBR de las partículas individuales se detecta mediante microscopía de fluorescencia. El análisis de los datos se realiza según los algoritmos establecidos para la PCR digital.

Determinación del intervalo de medición dinámico óptimo

La unión inespecífica del anticuerpo de detección marcado con ADN a las DAB representa un parámetro crítico que limita la aplicabilidad de la inmuno-PCR digital. La etiqueta unida inespecíficamente da lugar a falsos positivos en DAB tras la amplificación. Por lo tanto, en la inmuno-PCR digital la cuantificación del analito se consigue determinando la diferencia entre una muestra positiva y un control negativo.

En un escenario extremo la unión inespecífica del anticuerpo de detección puede conducir a una mayoría de DAB con una señal falsa-positiva en reacciones de control sin analitos. Esto se mitiga reduciendo la concentración efectiva del anticuerpo de detección, ya sea reduciendo gradualmente la concentración del anticuerpo de detección en el ensayo o manteniendo la concentración del anticuerpo aumentando la dilución del anticuerpo de detección marcado con ADN con el mismo anticuerpo sin etiqueta de ADN.

Otras modificaciones de las realizaciones preferidas son posibles sin salir del ámbito de la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para realizar una detección, preferentemente una detección digital, de un analito en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento los pasos:

- a) proporcionar una micropartícula prefabricada que tiene una superficie e incluye un volumen vacío para recibir una solución acuosa, donde dicha partícula es dispersable en un medio no acuoso y, al dispersarse en un medio no acuoso, proporciona un espacio de reacción definido en dicho medio no acuoso, en cuyo espacio de reacción definido puede llevarse a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, y en el que dicha micropartícula prefabricada comprende un agente de captura que, tras la exposición de dicha micropartícula a una muestra que rodea a dicha micropartícula prefabricada y que contiene un analito se une selectiva y específicamente al analito a detectar y que, al unirse el analito al agente de captura, forma un complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, en el que dicho agente de captura se une al analito de una muestra que rodea dicha micropartícula prefabricada, y en el que dicha micropartícula prefabricada comprende además un agente de detección que es específico para el analito o dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito, y que se une a dicho analito o a dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito;
- b) exponer dicha micropartícula prefabricada a una muestra acuosa que se sospecha que contiene un analito a detectar, permitiendo así que el agente de captura se una selectiva y específicamente al analito a detectar, si está presente;
- c) colocar la micropartícula prefabricada en una fase no acuosa, por ejemplo, una fase oleosa, y utilizar el volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada como un espacio de reacción definido en el que se lleve a cabo una reacción química o bioquímica que indique la presencia de un analito, ya sea

d1) detectando el agente de detección unido a dicho analito o a dicho complejo entre dicho agente de captura y dicho analito;

o

d2) amplificando el analito, si está presente, mediante una reacción de amplificación, y detectar el producto así amplificado mediante dicho agente de detección, donde dicho analito es un ácido nucleico y dicha reacción de amplificación es una amplificación de ácido nucleico como, por ejemplo, PCR, TMA, NASBA, LAMP, 3SR, SDA, RCA, LCR, RPA, NEAR, o

d3) realizando una reacción de amplificación de la señal, por ejemplo, una amplificación del ácido nucleico si un ácido nucleico es o forma parte de dicho agente de detección, o por ejemplo, una amplificación enzimática de una señal, por ejemplo en forma de una etiqueta, como un colorante o un fluoróforo, si una enzima es o forma parte de dicho agente de detección, y detectar la señal así amplificada, en la que dicho espacio de reacción en el que se realiza dicha reacción química o bioquímica que indica la presencia de un analito, está definido por dicho volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada y no es mayor que dicho volumen vacío de dicha micropartícula prefabricada.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha micropartícula prefabricada se proporciona como una micropartícula prefabricada que se seca, preferentemente secada por congelación.

3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicha micropartícula prefabricada no es una micropartícula generada in situ, preferentemente no es una micropartícula generada in situ en el lugar o en la reacción, en o durante la cual se va a realizar la detección del analito.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que dicha micropartícula prefabricada se reconstituye en una solución acuosa, preferentemente durante el paso a) o el paso b), y, al reconstituirse, recibe dicha solución acuosa en su volumen vacío.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de detección se incluye en dicha micropartícula prefabricada durante un proceso de prefabricación o se incluye en dicha solución acuosa de la reivindicación 4 y, por lo tanto, pasa a formar parte de la micropartícula prefabricada tras la reconstitución.

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha micropartícula prefabricada está hecha de un agente formador de gel, siendo dicho agente formador de gel preferentemente licuable al aplicar calor o luz, o al cambiar el pH, el potencial redox, la fuerza iónica, la temperatura, el campo magnético o la radiación electromagnética, o al exponerse a una enzima o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, a un sustrato de dicha enzima, o cualquier combinación de lo anterior, en la que, más preferentemente, dicho agente formador de gel forma una matriz que define la superficie y el volumen vacío de dicha micropartícula, y en la que, aún más preferentemente, dicho agente formador de gel se selecciona del grupo que comprende

a) polímeros sintéticos preparados a partir de sus correspondientes monómeros, como el metilacrilato y el acrilato, la acrilamida y la metacrilamida, las lactamas cíclicas, los monómeros a base de estireno;

b) polímeros a base de silicona, por ejemplo, polidimetilsiloxanos y sus copolímeros;

c) polímeros naturales seleccionados entre polisacáridos, por ejemplo, agarosa, quitina, quitosano, alginato, carragenina, celulosa, fucoidán, laminar, gomas seleccionadas entre la goma xantana, la goma arábica, la goma ghatti, la goma guar, la goma de garrofin, la goma tragacanto, la goma karaya y la inulina; polipéptidos, por ejemplo, albúminas, colágenos, gelatinas; polinucleótidos; y combinaciones de los mismos.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de captura se selecciona de entre anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, Spiegelmers, proteínas que no son de anticuerpos y que son capaces de unirse específicamente a un analito o a un complejo de analitos, como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo, estreptavidina.
- 5 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de detección se selecciona de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, incluidos aptámeros, Spiegelmers, proteínas que no son anticuerpos, tales como receptores, fragmentos de receptores, proteínas de afinidad, por ejemplo estreptavidina, estando cada uno de ellos marcado opcionalmente con una molécula informadora adecuada, tal como un tinte, una enzima, un catalizador químico o una mezcla de reactivos capaces de iniciar una reacción química que
10 produce una señal detectable ópticamente o de otro modo que indica la presencia del analito para ser detectado..
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha micropartícula prefabricada está específicamente etiquetada.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se realiza utilizando una colección de micropartículas prefabricadas, siendo dichas micropartículas prefabricadas como se definen en
15 cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde, preferentemente, en dicha colección de micropartículas prefabricadas dichas micropartículas prefabricadas son diferentes entre sí en el sentido de que son específicas para diferentes analitos que se van a detectar, en el que cada micropartícula prefabricada está específicamente etiquetada de manera que las diferentes micropartículas prefabricadas y sus correspondientes analitos detectados pueden distinguirse por las etiquetas específicas de las micropartículas prefabricadas.
- 20 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho procedimiento implica el uso de una micropartícula prefabricada o de una colección de micropartículas prefabricadas como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para realizar una detección digital de un analito o de una pluralidad de analitos en una muestra o para enriquecer y concentrar una pluralidad de analitos en una pluralidad de volúmenes
25 definidos, en los que, preferentemente, todos dichos volúmenes definidos en dicha pluralidad de volúmenes definidos son iguales.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, tras el paso de exposición b), hay uno o varios pasos de lavado.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso a), dichas micropartículas prefabricadas se proporcionan en forma seca, y, en el paso b), dichas micropartículas prefabricadas
30 se reconstituyen en una solución acuosa y luego se exponen a una muestra que se sospecha que contiene un analito a detectar, en el que, opcionalmente, después del paso de reconstitución, hay uno o varios pasos de lavado.
14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en el paso b), el número de micropartículas prefabricadas y el número de moléculas de analito en la muestra se mantienen o se ajustan, según
35 sea necesario, de manera que la unión de una sola molécula de analito por micropartícula prefabricada siga una distribución de Poisson, preferentemente de manera que, en promedio, no haya más de una molécula de analito unida por micropartícula, permitiendo así la detección de una sola molécula de analito por micropartícula prefabricada.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, durante el paso c), la micropartícula prefabricada o la colección de micropartículas prefabricadas está suspendida en la fase no acuosa y/o
40 está situada en un sustrato sólido que aísla cada micropartícula prefabricada de otras micropartículas prefabricadas, donde, preferentemente, dicho sustrato sólido es un filtro, un tamiz, un sustrato con un patrón de pocillos, rebajes, ranuras, canales, zanjas, cráteres, agujeros, pilares o cualquier combinación de los anteriores.
16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, durante o después del
45 paso c), el agente formador de gel se licúa, preferentemente mediante la aplicación de calor o luz, o por un cambio de pH, potencial rediox, fuerza iónica, temperatura, campo magnético o radiación electromagnética, o tras la exposición a una enzima o, si el propio agente formador de gel comprende una enzima, a un sustrato de dicha enzima, o cualquier combinación de lo anterior, dando lugar a una gota acuosa en una fase no acuosa.

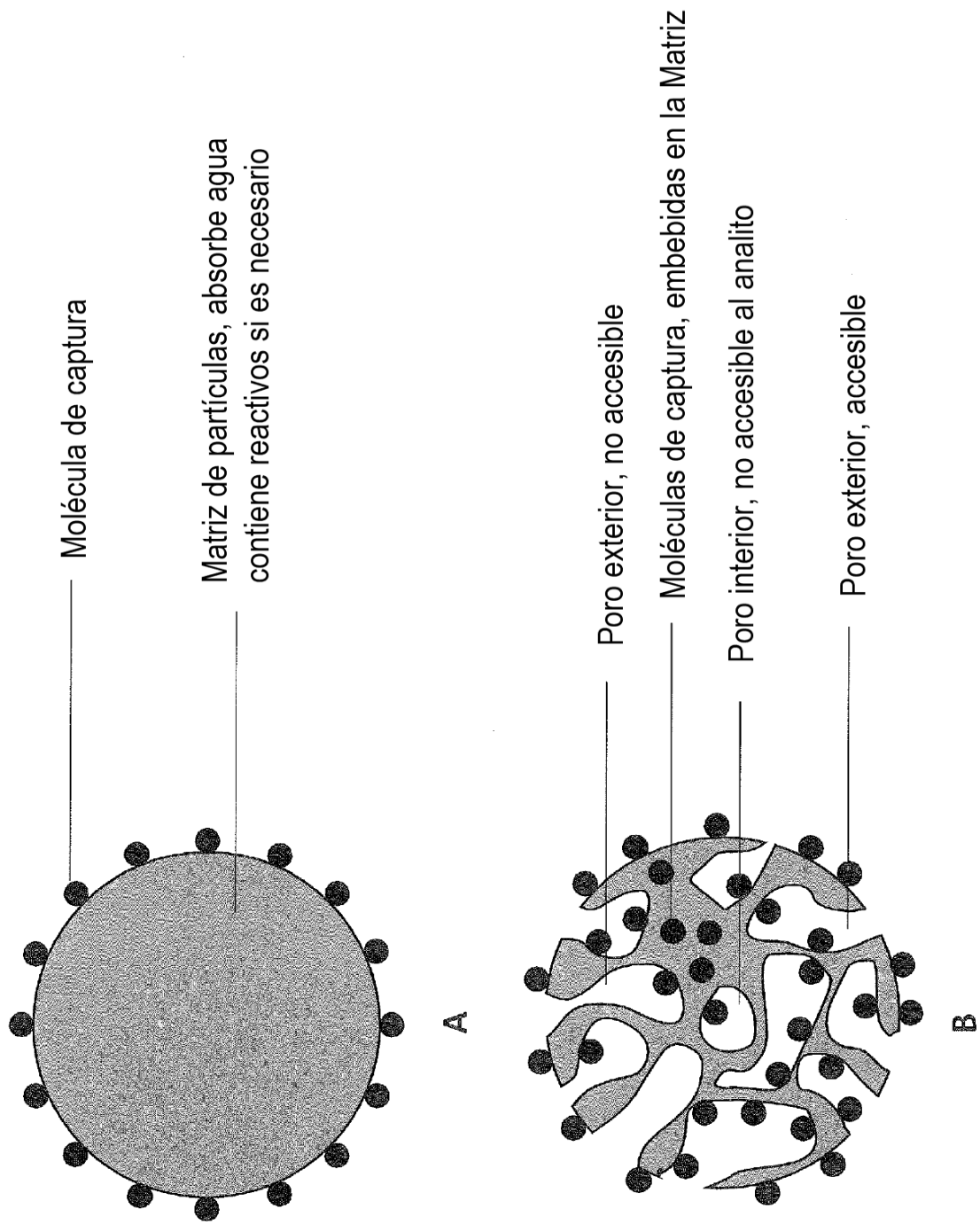


Figura 1

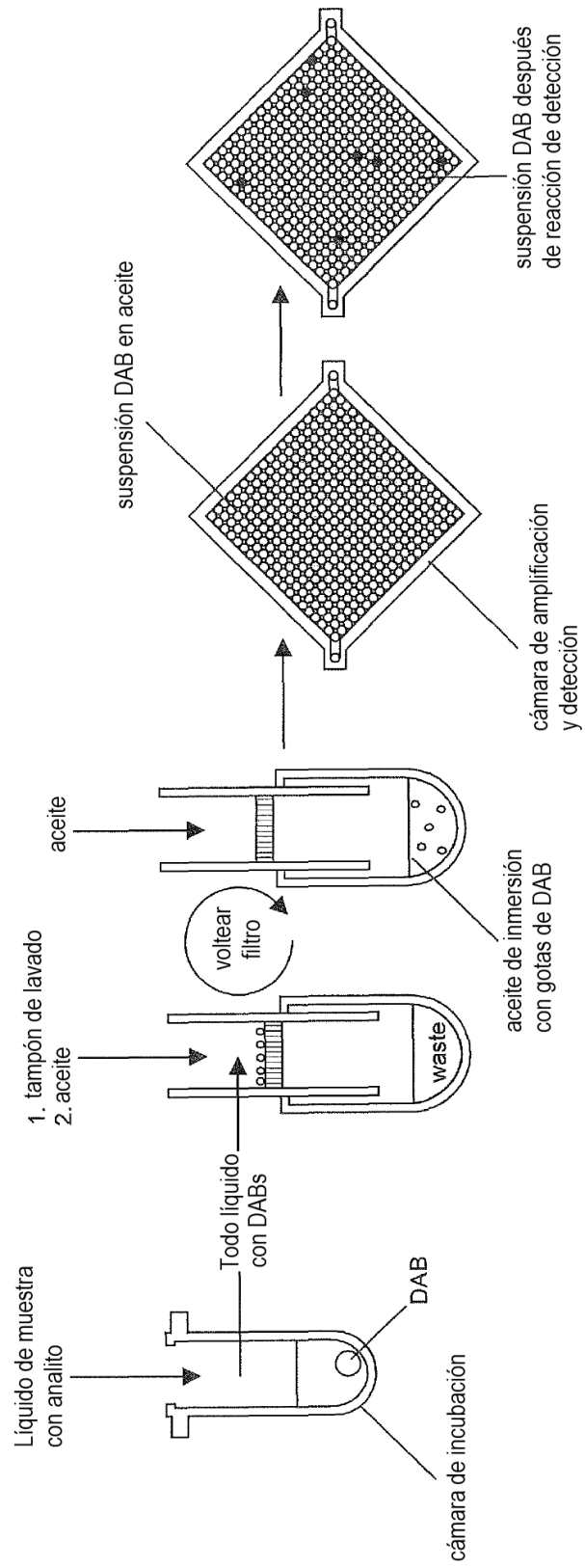


Figura 2

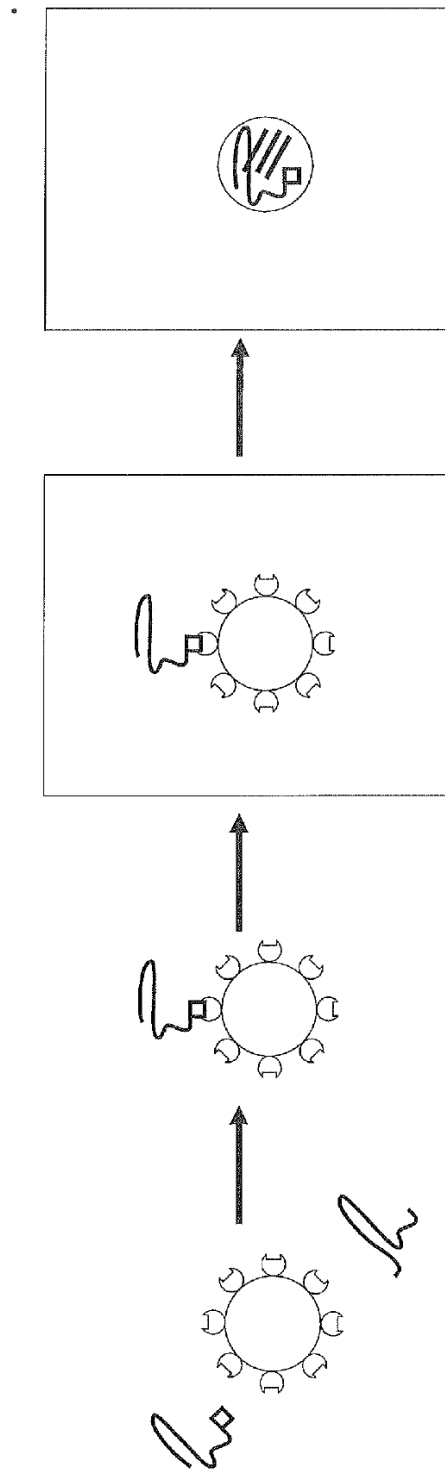


Figura 3

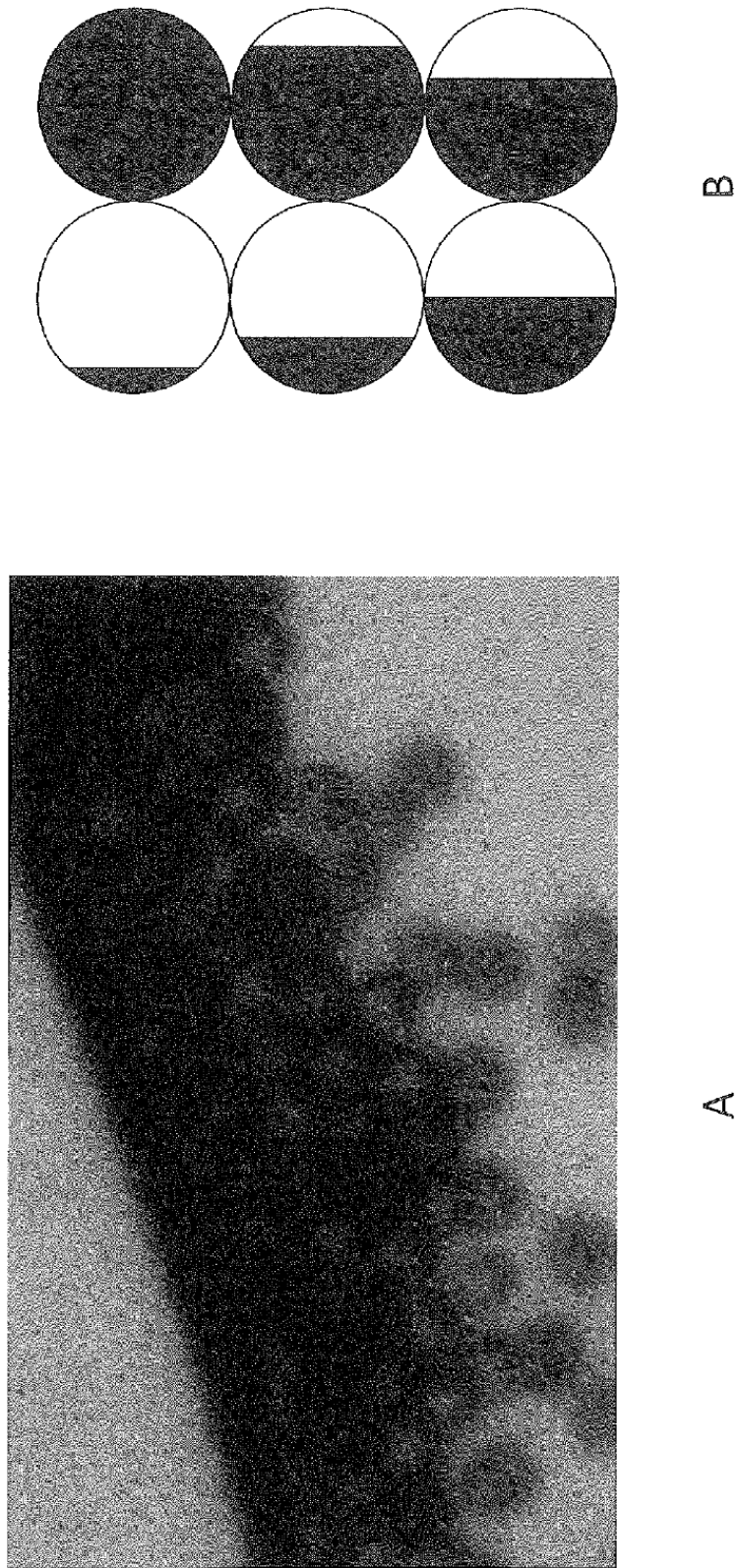
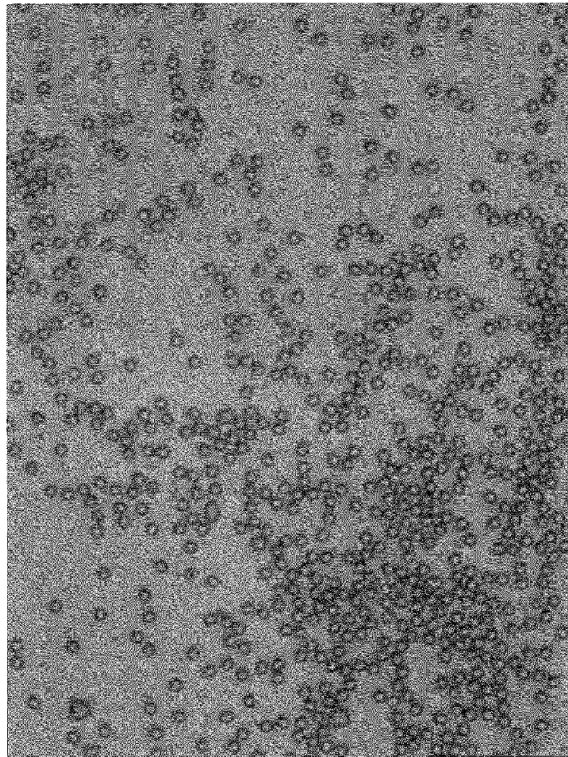
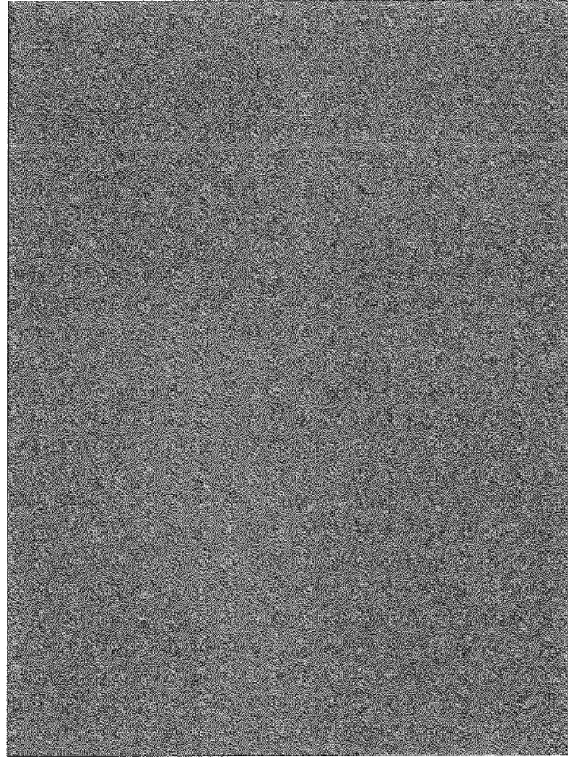


Figura 4



A

ampliación de 5x, imagen de transmisión, DABs en aceite



B

ampliación de 5x, imagen de transmisión, DABs en PBS

Figura 5

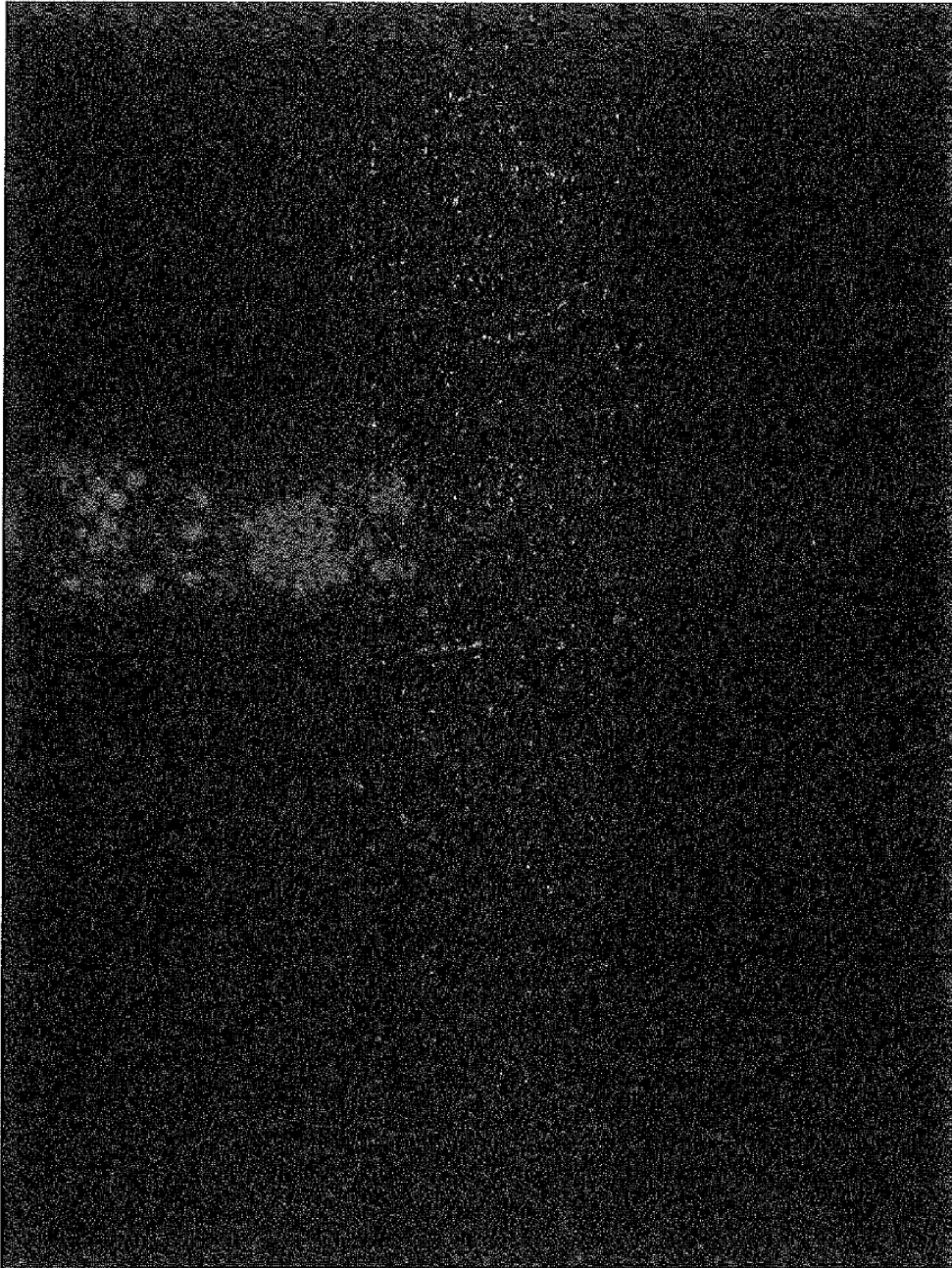


Figura 6