

KONINKRIJK BELGIEFOD ECONOMIE, K.M.O.,
MIDDENSTAND & ENERGIE

Dienst voor de intellectuele Eigendom

PUBLICATIENUMMER : 1020732A5

INDIENINGSNUMMER : 2013/0102

Internat. klassif. : B82Y G01N

Datum van verlening : 01 April 2014

De Minister van Economie,

Gelet op het verdrag van Parijs van 20 Maart 1883 tot bescherming van de intellectuele eigendom;

Gelet op de wet van 28 Maart 1984 op de uitvindingsoctrooien
inzonderheid artikel 22;

Gelet op het Koninklijk Besluit van 2 December 1986, betreffende het aanvragen, verlenen en in stand houden van uitvindingsoctrooien, inzonderheid artikel 28;

Gelet op het proces-verbaal opgesteld door de Dienst voor Intellectuele Eigendom op 15 Februari 2013 te 14u05

BESLUIT :

Enig artikel-Er wordt toegestaan aan : PHARMADIAGNOSTICS NV
ZI Research Park 310, B-1731 ZELLIK(BELGIE)

vertegenwoordigd door : VAECK Elke, DE CLERCQ & PARTNERS C.V.B.A., Ed. Gevaertdreef
10a - B 9830 ST MARTENS LATEM.

een uitvindingsoctrooi voor de duur van 20 jaar, onder voorbehoud van de betaling van de jaartaksen voor : METHODE VOOR HET METEN VAN INTERACTIE TUSSEN MOLECULES.


UITVINDER(S) : Roskamp Meike, Am Takelmast 20, D-26871 Papenburg (DE); Bonnard Vanessa, Avenue de la Floride 34, B-1180 Ukkel (BE); Boucharens Sylviane, 25 Shiel Drive, Larkhall ML9 2TJ (GB)

VOORRANG(EN) 16.02.12 GBGBA12026316 16.02.12 USUSA61599455

ARTIKEL 2.- Dit octrooi is toegekend zonder voorafgaand onderzoek van zijn octrooierbaarheid, zonder waarborg voor zijn waarde of van de juistheid van de beschrijving der uitvinding en op eigen risico van de aanvrager(s).

Voor eensluidend verklaard afschrift

Brussel 01 April 2014
BIJ SPECIALE MACHTIGING :


DRISQUE S.
Adviseur
S. DRISQUE
Adviseur

METHODE VOOR HET METEN VAN INTERACTIE TUSSEN MOLECULES

GEBIED VAN DE UITVINDING

De huidige uitvinding heeft betrekking op methoden om de interactie tussen een eerste en
5 een tweede molecule te meten, bijvoorbeeld een proteïne en een antilichaam, door
conjugatie van één van deze moleculen met nanodeeltjes en door de interactie tussen de
eerste en de tweede molecule te meten aan de hand van veranderingen in de optische
eigenschappen van de nanodeeltjes. De huidige uitvinding houdt verder verband met het
coaten van nanodeeltjes.

10

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Metalen nanodeeltjes die gecoat zijn met moleculen zoals proteïnes kunnen gebruikt
worden om bindingsgebeurtenissen te bepalen door een verandering in de optische
eigenschappen van de deeltjes te monitoren, bijvoorbeeld door middel van
15 sensormetingen van de gelokaliseerde oppervlak-plasmonresonantie (Localized
Oppervlak Plasmon Resonance - LSPR). In het gebruikelijke schema wordt er een
herkenningsinterface gebouwd op de metalen nanostructuur. De specifieke binding van
een analyt met de bovengenoemde herkenningsinterface wordt omgezet in een optisch
signaal, bv. een verandering in absorptie (golflengte, intensiteit) die gedetecteerd en
20 geanalyseerd wordt.

Sensormeting van de LSPR is gebaseerd op de gevoeligheid van de gelokaliseerde
plasmon-absorptie van metalen nanodeeltjes voor veranderingen in de diëlektrische
eigenschappen van het contactmedium.

In principe kan LSPR gebruikt worden voor de detectie van antilichaam-ligand interacties,
25 receptor-ligand interacties, enzyme-ligand binding en antilichaam-antigen associatie-
dissociatie kinetiek.

In de praktijk werd er echter waargenomen dat dergelijke methoden waar nanodeeltjes in
een oplossing gebruikt worden dikwijls niet de vereiste nauwkeurigheid bieden.

Om deze reden blijft er een behoefte in het vakgebied om methoden te voorzien die een
30 nauwkeurige bepaling van interacties tussen moleculen aan de hand van nanodeeltjes
mogelijk maken.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

De huidige uitvinding houdt verband met de methoden om de interactie tussen een eerste
35 en een tweede molecule te meten, door conjugatie van een van deze moleculen met
nanodeeltjes en door de interactie tussen de eerste en de tweede molecule te meten aan
de hand van veranderingen in de optische eigenschappen van de nanodeeltjes. De

huidige uitvinding biedt de mogelijkheid om nanodeeltjes te gebruiken in hoeveelheden die voldoende zijn voor een betrouwbare detectie, terwijl depletie (uitputting) van het ligand vermeden, of tenminste gereduceerd, wordt.

5 In een eerste aspect biedt de huidige uitvinding een methode om de interactie tussen een eerste en een tweede molecule te bepalen, omvattende:

- a) nanodeeltjes te voorzien die een of meerdere metalen bevatten;
- b) de bovengenoemde nanodeeltjes te voorzien van een of meerdere functionele groepen, of de eerste molecule te koppelen met een molecule die een
10 metaalbindende functionaliteit bevat;
- c) de bovengenoemde eerste molecule te conjugeren met bovengenoemde nanodeeltjes, waarbij de hoeveelheid van de bovengenoemde eerste molecule gehecht aan bovengenoemde nanodeeltjes minder is dan 70%, en bij voorkeur tussen 10% en 70%, van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van
15 bovengenoemde nanodeeltjes met bovengenoemde eerste molecule;
- d) bovengenoemde nanodeeltjes te incuberen met bovengenoemde tweede molecule;
- e) stap d) te monitoren door bovengenoemde nanodeeltjes te belichten met ten minste één excitatielichtbron en één of meerdere optische eigenschappen van
20 bovengenoemde nanodeeltjes te monitoren; en
- f) een verandering van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes te detecteren waarin bovengenoemde verandering een resultaat is van de aanwezigheid van een interactie tussen bovengenoemde eerste molecule en bovengenoemde tweede molecule.

25 In bepaalde uitvoeringsvormen bevatten de nanodeeltjes goud, zilver van koper. In bepaalde uitvoeringsvormen zijn de nanodeeltjes nanostaafjes.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvat stap f) de bepaling van een associatie-dissociatie evenwicht tussen bovengenoemde eerste en tweede molecule. In bepaalde uitvoeringsvormen omvat stap f) de meting van bovengenoemde één of meerdere
30 optische eigenschappen op twee of meerdere golflengtes tussen 350 en 1000 nm.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvat stap b) de voorziening van nanodeeltjes, met aan hun oppervlak gehecht:

- één of meerdere molecules die een metaalbindende functionaliteit bevatten en een functionele groep geselecteerd uit carboxyl, amino, azide, alkynyl, carbonyl en hydroxyl; en
35

- één of meerdere molecules die bovengenoemde metaalbindende functionaliteit bevat(ten) en die bovengenoemde functionele groep geselecteerd uit carboxyl, amine, azide, alkynyl, carbonyl en hydroxyl niet bevat(ten).

5 In bepaalde uitvoeringsvormen omvat stap c):

- c1) optioneel, de selectie van een geschikte pH en een ionensterkte voor conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanodeeltjes via een buffertest;
- 10 c2) de bepaling van de hoeveelheid van bovengenoemde eerste molecule, vereist voor de conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanodeeltjes;
- c3) conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanodeeltjes, gebaseerd op de informatie, verkregen in stap c2) en optioneel c1).

15 In verdere uitvoeringsvormen omvat stap c2) een concentratie-titratie van bovengenoemde nanodeeltjes met bovengenoemde eerste molecule, optioneel aan de pH en ionensterkte, geselecteerd in stap c1).

In bepaalde uitvormingsvormen omvat stap b) de koppeling van bovengenoemde eerste molecule aan een linkermolecule die een metaalbindende functionaliteit heeft en omvat
20 stap c) de conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemd nanodeeltje via bovengenoemde linkermolecule. In verdere uitvoeringsvormen is de linkermolecule een mercaptocarbonsuur.

In bepaalde uitvoeringsvormen is de eerste molecule een proteïne en is het oppervlak van bovengenoemde nanodeeltjes voorzien van carboxylgroepen. In verdere
25 uitvoeringsvormen omvat de huidige methode verder reagerende vrije carboxylgroepen op het oppervlak van bovengenoemde nanodeeltjes met een carboxyl-blokkeermiddel.

In een verder aspect, biedt de huidige uitvinding een methode om een metalen nanodeeltje met een verbinding te coaten, omvattende:

- 30 i) een vloeibare samenstelling te voorzien die metalen nanodeeltjes bevat die ten minste gedeeltelijk gecoat zijn met cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB);
- ii) een thiol-polyethyleen glycol aan bovengenoemde samenstelling toe te voegen waardoor een vloeibare samenstelling bekomen wordt die metalen nanodeeltjes, gecoat met thiol-polyethyleen glycol bevat;

- iii) bovengenoemde samenstelling, bekomen in stap ii) te zuiveren door bovengenoemde nanodeeltjes te scheiden van vrije thiol-polyethyleen glycol en vrije CTAB;
- iv) mercaptocarbonsuur aan bovengenoemde samenstelling, bekomen in stap iii), toe te voegen waardoor een vloeibare samenstelling bekomen wordt die metalen nanodeeltjes, gecoat met mercaptocarbonsuur, bevat, en
- v) bovengenoemde deeltjes, bekomen in stap iv), in contact te brengen met de bovengenoemde verbinding.

In bepaalde uitvoeringsvormen is de vloeibare samenstelling in stappen i), ii), iii) en iv) een waterige samenstelling.

In een verder aspect, voorziet de huidige uitvinding in een kit, omvattende:

- een medium die een veelheid aan metalen nanodeeltjes bevat;
- instructies voor het gebruik van bovengenoemde nanodeeltjes in de methode voor de bepaling van een interactie tussen een eerste en een tweede molecule volgens de huidige uitvinding;
- optioneel, bovengenoemde eerste molecule; en
- optioneel, bovengenoemde tweede molecule.

20 KORTE BESCHRIJVING VAN DE FIGUREN

De uitvinding wordt nu beschreven, onder andere met verwijzing naar de begeleidende Afbeeldingen, die enkel voorzien worden als een voorbeeld en niet kunnen beschouwd worden als een beperking van de reikwijdte van huidige uitvinding.

Afbeelding 1A toont een proteïne-titratie curve voor humaan Serum Albumine (HSA) en toont een grafiek van ΔRU (i.e. $\Delta OD(\lambda_{max} + 80)/OD(\lambda_{max})$) ten opzichte van een hoeveelheid HSA per mL nanodeeltje suspensie.

Afbeelding 1B toont het absorbantiespectrum van identieke nanostaafjes, geconjugeerd met verschillende hoeveelheden van een proteïne.

Afbeelding 2 toont een grafiek van ΔRU ten opzichte van een hoeveelheid antilichaam per mL nanodeeltje-HSA conjugaat suspensie.

Afbeelding 3 stelt een plot van ΔRU voor ten opzichte van een hoeveelheid van BSA_MUDA toegevoegd aan een suspensie van met mPEG-SH gecoate gouden nanostaafjes.

Afbeelding 4 toont een conjugatie van een eerste molecule (1) en een nanodeeltje (2) volgens een bepaalde uitvoeringsvorm van de huidige uitvinding.

Afbeelding 5 toont een conjugatie van een eerste molecule (1) en een nanodeeltje (2) volgens een bepaalde uitvoeringsvorm van de huidige uitvinding.

GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

5 De huidige uitvinding wordt beschreven met betrekking tot bepaalde uitvoeringsvormen, maar zijn daartoe niet beperkt, maar alleen door de conclusies. Enigerlei referentietekens in de conclusies kunnen niet geïnterpreteerd worden alsof ze de reikwijdte ervan zouden beperken.

Zoals hierin gebruikt, omvatten de enkelvoudsvormen "een" en "de" zowel de enkelvoudsvormen als de meervoudsvormen, tenzij de context duidelijk anders uitwijst.

De termen "omvattende", "omvat" en "bestaande uit", zoals hierin gebruikt, zijn synoniem van "met inbegrip van", "begrijpende" van "bevattende", "bevat", en hebben een inclusief karakter van een open einde en sluiten geen bijkomende, niet-vermelde delen, elementen van methodestappen uit. Wanneer de termen "omvattende", "omvat" en "bestaande uit" verwijzen naar vermelde delen, elementen van methodestappen, behelzen deze ook uitvoeringsvormen die "bestaan uit" voornoemde vermelde delen, elementen van methodestappen.

Bovendien worden de termen eerste, tweede, derde en dergelijke in de beschrijving en in de conclusies gebruikt om onderscheid te maken tussen gelijkaardige elementen en niet noodzakelijkerwijze om een sequentiële van chronologische volgorde te beschrijven, tenzij dit zo gespecificeerd is. De termen zijn onder passende omstandigheden onderling uitwisselbaar en de hierin beschreven uitvoeringsvormen kunnen in andere sequenties dan hierin beschreven van geïllustreerd worden toegepast.

De term "ongeveer", zoals hierin gebruikt, wanneer deze verwijst naar een meetbare waarde, zoals een parameter, een hoeveelheid, een tijdsduur en dergelijke, omsluit variaties van +/-10% van minder, bij voorkeur +/-5% van minder, en liever +/-1% van minder, maar liefst +/-0,1% van minder van de gespecificeerde waarde, in zover dergelijke variaties geschikt zijn om dezelfde functie uit te voeren. De waarde waarnaar de bepaling "ongeveer" verwijst is zelf ook specifiek, en bij voorkeur, bekendgemaakt.

30 De aanduiding van de numerieke bereiken door eindpunten, omvat alle nummers en fracties binnen de respectievelijke bereiken, alsook de aangeduide eindpunten.

Alle documenten, vermeld in onderhavige specificatie, zijn hierbij door verwijzing in hun geheel geïncorporeerd.

Tenzij anders bepaald, hebben alle termen, gebruikt in de beschrijving, met inbegrip van technische en wetenschappelijke termen, de gangbare betekenis, zoals deze begrepen wordt door iemand met normale ervaring in de kunde. Als verder richtsnoer bevat dit document definities voor de in de beschrijving gebruikte termen voor een beter begrip van de bijgebrachte concepten, hierin voorzien. De termen van de definities, hierin gebruikt, zijn enkel voorzien voor een beter begrip van de uitvinding.

Zoals hierin gebruikt, heeft de term "gelokaliseerde oppervlak-plasmonresonantie" (localized surface plasmon resonance) of "LSPR" betrekking op methoden die veranderingen op of nabij het oppervlak van metalen nanodeeltjes detecteren. 10 Normalerweise werden diese Veränderungen gedetecteert door de detectie van veranderingen in één of meerdere optische eigenschappen van de deeltjes. Wanneer de metalen oppervlakken van de nanodeeltjes geëxciteerd worden door elektromagnetische straling, vertonen zij collectieve oscillaties van hun geleidingselektronen, die bekend staan als gelokaliseerde oppervlak-plasmons (LSPs). Wanneer ze op deze manier geëxciteerd 15 worden, gedragen de nanodeeltjes zich als nanoschaal antennes, die het elektromagnetische veld in heel kleine volumes nabij de deeltjes concentreren. Op deze manier kunnen uitzonderlijk grote verbeteringen in elektromagnetische intensiteit bereikt worden. De nanodeeltjes gebruikt in de LSPR maken het optreden van resonantie-oscillaties mogelijk.

20 Zoals hierin gebruikt, verwijst de term "absorbantie" naar de mate waarin een monster licht of elektromagnetische straling absorbeert in het UV, visuele of nabij-infrarood gebied van het spectrum. In LSPR kunnen veranderingen in de brekingsindex gedetecteerd worden door monitoring van veranderingen in de absorbantie. Na belichting van een monster veroorzaken veranderingen in de LSPR extinctieband veranderingen in de 25 intensiteit en/of de golflengte van de maximale absorbantie.

De term "colloïde" verwijst naar een vloeibare samenstelling van deeltjes die gesuspendeerd zijn in een vloeibaar medium. De afmetingen van de deeltjes in representatieve colloïden variëren van één nanometer tot één micrometer.

De term "monster", zoals hierin gebruikt, verwijst naar een vloeibare samenstelling, 30 waarbij in bepaalde uitvoeringsvormen de vloeibare samenstelling een waterige samenstelling is. Terwijl een deskundig persoon zou begrijpen dat ieder type van monster kan gebruikt worden in de context van de huidige uitvinding, omvatten niet-beperkende voorbeelden biologische monsters, met inbegrip van patiënt- en milieumonsters, plasma, hybridoom supernatanten enz.

35 De term "C₄₋₁₆alkyl", als een groep van een deel van een groep, verwijst naar een hydrocarbyle radicaal van Formule C_nH_{2n+1} waarbij n een nummer variërend van 4 tot 16 is.

Alkylgroepen kunnen lineair of vertakt zijn en kunnen gesubstitueerd worden zoals hierin aangegeven. Wanneer hierin subschrift gebruikt wordt na een koolstofatoom, verwijst het subschrift naar het aantal koolstofatomen dat de genoemde groep kan bevatten. Dus, bijvoorbeeld, C₆₋₁₂alkyl betekent een alkyl van 6 tot 12 koolstofatomen. Voorbeelden van 5 alkylgroepen zijn octyl, decyl, undecyl en de ketenisomeren daarvan.

De term "C₄₋₁₆alkylthiol" verwijst naar HS-R^w, waarbij R^w C₄₋₁₆alkyl is. Niet-beperkende voorbeelden van geschikte C₄₋₁₆alkylthiol omvatten undecaan-1-thiol, decaan-1-thiol of octaan-1-thiol.

De term "azide" verwijst naar -N₃. De term "amine" op zichzelf of als deel van een andere 10 substituent, verwijst naar -NH₂.

De term "alkynyl" verwijst naar een vertakte of onvertakte en cyclisch of acyclische onverzadigde koolwaterstofgroep die ten minste één drievoudige binding bevat. Niet-beperkende voorbeelden van alkylgroepen zijn ondermeer ethynyl, propynyl, 1-butynyl, 2-butynyl en dergelijke.

15 De term "waterig", zoals hierin gebruikt, betekent dat meer dan 50 procent van het volume van het oplosmiddel water is. Waterige samenstellingen of dispersies kunnen verder andere organische vloeistoffen bevatten die mengbaar zijn met water.

Verwijzing in deze specificatie naar "één uitvoeringsvorm" of "een uitvoeringsvorm" betekent dat een bepaald element, structuur of eigenschap, beschreven in verband met 20 de uitvoeringsvorm, deel uitmaakt van minstens één uitvoeringsvorm van de uitvinding, zoals hierin beoogd. Dus, indien de uitdrukkingen "in één uitvoeringsvorm" van "in een uitvoeringsvorm" op verschillende plaatsen in deze specificatie voorkomen, verwijzen deze niet noodzakelijk allemaal naar dezelfde uitvoeringsvorm, maar mogelijk wel. Bovendien kunnen de bijzondere elementen, structuren van eigenschappen 25 gecombineerd worden op elke geschikte wijze in één of meerdere uitvoeringsvormen, zoals dit vanzelfsprekend zou zijn voor iemand met ervaring in de kunde van deze openbaarmaking. Hoewel sommige uitvoeringsvormen, hierin beschreven, sommige, maar niet de andere elementen die deel uitmaken van andere uitvoeringsvormen, bevatten, vallen combinaties van elementen van verschillende uitvoeringsvormen binnen 30 het bereik van de uiteenzettingen, hierin voorzien, en vormen zij verschillende uitvoeringsvormen, zoals dit zou begrepen worden door personen met ervaring in de kunde. Bijvoorbeeld, in het onderstaande kan enigerlei van de beschreven uitvoeringsvormen gebruikt worden in elke combinatie.

De huidige uitvinding heeft betrekking op het gebruik van nanodeeltjes voor de bepaling van de interactie tussen een eerste en een tweede molecule, meer bepaald de voorziening van methoden en middelen om de nauwkeurigheid van de detectie van dergelijke interacties te verhogen. Onderhavige uitvinders hebben inderdaad vastgesteld
5 dat de nauwkeurigheid van de detectie sterk afhankelijk is van de coating van de nanodeeltjes.

Doorgaans kan de binding van een ligand aan een specifieke receptor of bindingsplaats gekarakteriseerd worden door de dissociatie-evenwichtsconstante (K_d). Volgens de wet der massawerking is de K_d van de receptor of de ligandverbinding van de receptor of
10 bindingsplaats afhankelijk van zowel de associatie (k_{on}) als de dissociatie (k_{off}) snelheidsconstanten en bepaald als de ratio van k_{off} tot k_{on} .

$$K_d = k_{off}/k_{on}$$

Standaard methoden voor de analyse van de K_d parameter (saturatiebinding) gaan er normalerwijze van uit dat de concentratie van vrij ligand constant is tijdens het experiment
15 en dat de vrije ligandconcentratie niet aanzienlijk verschilt van de totaal toegevoegde ligandconcentratie. Teneinde aan deze restrictie te voldoen, dient de concentratie van de receptor of bindingsplaats eerder laag te zijn, in vergelijking met de K_d waarde. Hoewel, in sommige experimentele situaties, waar de receptoren of bindingsplaats aanwezig zijn in hoge concentraties en een hoge affiniteit hebben voor het ligand, is dit uitgangspunt niet
20 correct en de vrije ligandconcentratie raakt uitgeput door binding met de receptoren of bindingsplaatsen. Dit staat bekend als "depletie van het ligand" of liganduitputting (ligand depletion). Depletie van het ligand belemmert gegevensanalyse aanzienlijk en kan leiden tot de afleiding van onjuiste waarden voor de bindingsparameters k_{off} , k_{on} en K_d .

Om deze reden, bij gebruik van bio-geconjugeerde metalen nanodeeltjes-suspensies voor
25 de bepaling van ligand-receptor interacties, en meer bepaald een K_d en/of k_{on} waarde, zou depletie van het ligand vermeden moeten worden. In de praktijk betekent dit dat minder dan 10% van het ligand zich zou moeten binden aan de receptoren of bindingsplaatsen. Ofschoon depletie van het ligand reeds beperkt kan worden door reductie van de concentratie van nanodeeltjes die de receptor bevatten, is er een minimum hoeveelheid
30 van nanodeeltjes vereist voor een betrouwbare detectie, de ratio van oppervlak in verhouding tot volume van nanomaterialen is heel hoog in vergelijking met bulkmaterialen (bijvoorbeeld SPR sensoren of wells in een microplaat) en maakt de presentatie van een groot aantal bindingsplaatsen per nanodeeltje mogelijk. Om deze reden is de reductie van de concentratie van nanodeeltjes vaak niet voldoende om depletie van het ligand op een
35 afdoende manier te beperken, aangezien de signaal-ruis verhouding tevens afneemt. De uitvinders hebben een methode gevonden om interacties tussen molecules te bepalen zonder de concentratie van nanodeeltjes te reduceren, die een aanvaardbare signaal-ruis

verhouding handhaaft en de effecten van depletie van het ligand vermindert en zodoende de bepaling van nauwkeurigere bindingsparameters mogelijk maakt.

Om deze reden, in een eerste aspect, biedt de huidige uitvinding een methode voor het bestuderen van potentiële interacties tussen een eerste molecule en een tweede molecule met verbeterde nauwkeurigheid, in het bijzonder voor de afleiding van correcte bindingsparameters. De methoden van de uitvinding omvatten het gebruik van nanodeeltjes die geconjugerd worden met de eerste molecule en dan in contact gebracht worden met de tweede molecule, waarbij de interactie tussen de eerste en de tweede molecule bepaald wordt door de monitoring van een verandering in de optische eigenschappen. Meer in het bijzonder omvatten de methoden het gebruik van nanodeeltjes, waarbij de hoeveelheid van de eerste molecule gehecht aan de nanodeeltjes minder is dan 70% van de hoeveelheid vereist voor de volledige bedekking van bovengenoemde nanodeeltjes met de eerste molecule. Met de huidige methoden kan de hoeveelheid van de eerste molecule gehecht aan de nanodeeltjes gecontroleerd worden zodat deze minder bedraagt dan 70% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking. In bepaalde uitvoeringsvormen omvatten de methoden volgens de huidige uitvinding de volgende stappen:

- a) nanodeeltjes te voorzien die één of meerdere metalen bevatten;
- b) de bovengenoemde nanodeeltjes te voorzien van één of meerdere functionele groepen, of de eerste molecule te koppelen met een molecule die een metaalbindende functionaliteit bevat;
- c) de bovengenoemde eerste molecule te conjugeren met bovengenoemde nanodeeltjes, waarbij de hoeveelheid van de bovengenoemde eerste molecule gehecht aan bovengenoemde nanodeeltjes minder is dan 70% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van bovengenoemde nanodeeltjes met bovengenoemde eerste molecule;
- d) bovengenoemde nanodeeltjes te incuberen met bovengenoemde tweede molecule;
- e) de monitoring van stap d) door bovengenoemde nanodeeltjes te belichten met ten minste één excitatielichtbron en de monitoring van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes; en
- f) de detectie van een verandering van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes waarin bovengenoemde verandering een resultaat is van de aanwezigheid van een interactie tussen bovengenoemde eerste molecule en bovengenoemde tweede molecule.

In bepaalde uitvoeringsvormen, zijn de eerste en tweede molecule een element van een specifiek bekend of beoogd bindingspaar of -koppel. Daarom kan de tweede molecule (of potentieel analoog ligand) verwijzen naar een molecule die potentieel een interactie aangaat met de eerste molecule. Normalerweise zijn zowel de eerste molecule als de
5 tweede molecule detectiebestanddelen die elementen zijn van een bindend koppel zoals antigeen-antilichaam, receptor-ligand, enzyme-ligand, suiker-lectine, receptor-receptor bindingsagent, en andere. In deze uitvoeringsvormen kunnen de methoden volgens de huidige uitvinding dienen voor de detectie van de interactie tussen de twee elementen van het bindingspaar. Relevante detectiebestanddelen omvatten, maar zijn niet beperkt tot,
10 biomoleculen, waarbij de term "biomolecule" verwijst naar iedere relevante organische of biochemische molecule, groep of soort, bv., die zich specifiek kan binden aan een relevant analyt. Voorbeelden van biomoleculen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, peptiden, proteïnen, aminozuren en nucleïnezuren, kleine organische en anorganische moleculen, liganden, enz. In bepaalde uitvoeringsvormen is de eerste molecule een
15 proteïne.

In bepaalde uitvoeringsvormen, wordt er naar de interactie, gemeten tussen de eerste en tweede molecule, verwezen als "binding". De term "binding" verwijst naar twee moleculen die zich met elkaar associëren in een niet-covalente of covalente relatie.

De nanodeeltjes kunnen van iedere geschikte vorm en samenstelling zijn en kunnen
20 bestaan uit, maar zijn niet beperkt tot, nanostaafjes, nanobollen, nanopyramiden, nanodraden, nanoprisma's, nanokubussen, nanotetrapoden, enz. Iemand met deskundigheid in het vak zal begrijpen dat ook andere nanodeeltjes nuttig kunnen zijn in de huidige uitvinding.

In bepaalde uitvoeringsvormen zijn de nanodeeltjes nanostaafjes. In verdere
25 uitvoeringsvormen hebben de nanostaafjes een aspectratio (d.i. lengte gedeeld door breedte) variërend tussen 1,1 en 10, meer bepaald tussen 1,5 en 5. In bepaalde uitvoeringsvormen hebben de nanostaafjes een breedte of diameter tussen 2 en 20 nm, meer bepaald tussen 5 en 18 nm, bijvoorbeeld ongeveer 15 nm. In bepaalde uitvoeringsvormen hebben de nanostaafjes een lengte tussen 4 en 60 nm, meer bepaald
30 tussen 40 en 50 nm, bijvoorbeeld ongeveer 48 nm.

De nanodeeltjes omvatten of bestaan uit één of meerdere metalen. In bepaalde uitvoeringsvormen omvatten de nanodeeltjes die in de context van de huidige uitvinding gebruikt worden één of meerdere metalen, geselecteerd uit Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au en/of Ac.
35 In een uitvoeringsvorm omvatten de nanodeeltjes een metaal, geselecteerd uit de groep bestaande uit Au, Ag, Cu, Ta, Pt, Pd, en Rh. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt het bovengenoemde metaal geselecteerd uit goud, zilver en koper.

De nanodeeltjes voorzien in stap a) van de methoden volgens de uitvinding zijn normalerwijze voorzien als een colloïde.

De oplosmiddelen die geschikt zijn om de nanodeeltjes te suspenderen kunnen afhankelijk zijn van de aard van het oppervlak van het nanodeeltje. Bijvoorbeeld, de
5 nanodeeltjes kunnen gecoat zijn met een hydrofobe of hydrofiele coating. Indien de nanodeeltjes voorzien zijn van een hydrofobe coating, kan het oplosmiddel bestaan uit één of meerdere oplosmiddelen, geselecteerd uit toluen, hexaan, heptaan, pentaan, cyclohexaan, cyclopentaan, chloroform, enz. Indien de nanodeeltjes voorzien zijn van een hydrofiele coating, kan het oplosmiddel bestaan uit één of meerdere oplosmiddelen,
10 geselecteerd uit water, ethanol, butanol, isopropanol, aceton, enz. In bepaalde uitvoeringsvormen zijn de deeltjes gesuspenderd in een waterig medium.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvat de colloïde de nanodeeltjes in een zodanige concentratie dat de colloïde een absorptie heeft met λ_{\max} tussen 0,3 en 4, meer bepaald tussen 0,7 en 1,2, waarin λ_{\max} de maximale absorptie van de nanodeeltjes tussen 350
15 en 1000 nm is.

In de methoden van de huidige uitvinding zijn de metalen nanodeeltjes optioneel voorzien van één of meerdere functionele groepen (waarnaar verwezen wordt als stap (b) hierboven), bij voorkeur geselecteerd uit amine, azide, alkynyl, carboxyl, hydroxyl en carbonyl. De functionele groepen kunnen gebruikt worden om de eerste molecule aan de
20 nanodeeltjes te conjugeren (zoals voorzien in stap c) hierboven) van de onderhavige methode, en dit zal hieronder verder besproken worden.

De nanodeeltjes, gebruikt in de methoden van de huidige uitvinding, worden geconjugerd aan een eerste molecule. Er werd vastgesteld dat de conjugatiedensiteit van cruciaal belang is om de vereiste nauwkeurigheid te verzekeren voor de optische detectie van de
25 interactie tussen de eerste en de tweede molecule, meer bepaald in de bepaling van associatie/dissociatie kinetiek. Om deze reden vereisen de methoden van de huidige uitvinding controle over de bindingsdensiteit van de eerste molecule aan de nanodeeltjes, door de eerste molecule aan de nanodeeltjes te conjugeren op zodanige wijze dat de nanodeeltjes niet volledig bedekt zijn met de eerste molecule. Daarom wordt in een
30 volgende stap (overeenstemmend met de hierboven beschreven stap c)) van de methoden van de huidige uitvinding, de eerste molecule geconjugerd aan de nanodeeltjes (voorzien in stap b)), waarbij de hoeveelheid van de eerste molecule geconjugerd aan de nanodeeltjes minder is dan 70% van de hoeveelheid vereist voor de volledige bedekking van bovengenoemde nanodeeltjes met bovengenoemde eerste
35 molecule. In bepaalde uitvoeringsvormen is de hoeveelheid van de eerste molecule geconjugerd aan de nanodeeltjes meer dan 10% van de hoeveelheid vereist voor

volledige bedekking. Dit biedt de mogelijkheid om nanodeeltjes te gebruiken in hoeveelheden die toereikend zijn voor betrouwbare detectie van interacties tussen de eerste en tweede molecule, terwijl depletie van het ligand kan vermeden, of tenminste gereduceerd, worden. In bepaalde uitvoeringsvormen is de hoeveelheid van de eerste 5 molecule geconjugeerd aan de nanodeeltjes meer dan 15% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking. In bepaalde uitvoeringsvormen is de hoeveelheid van de eerste molecule geconjugeerd aan de nanodeeltjes meer dan 20% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking.

De term "volledige bedekking", zoals hierin gebruikt, verwijst naar de maximale 10 hoeveelheid van de eerste molecule die kan geconjugeerd of gehecht worden aan een nanodeeltje als een enkelvoudige laag rond bovengenoemd nanodeeltje. Volledige bedekking kan bekomen worden door de nanodeeltjes aan een grote overmaat van de eerste molecule bloot te stellen, in condities die geschikt zijn voor het coaten van de nanodeeltjes. In bepaalde uitvoeringsvormen is de hoeveelheid van de eerste molecule, 15 geconjugeerd aan de nanodeeltjes, minder dan 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30 of 25 % van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking. In bepaalde uitvoeringsvormen ligt de hoeveelheid van de eerste molecule, geconjugeerd aan de nanodeeltjes, tussen 10% en 70%, bij voorkeur tussen 20% en 70%, liever tussen 20% en 60%, zelfs nog liever tussen 30 en 50% van de hoeveelheid vereist voor volledige 20 bedekking. De optimale hoeveelheid van de eerste molecule kan bepaald worden via titratie-experimenten en kan afhankelijk zijn van de karakteristieken van de nanodeeltjes, zoals afmetingen en vorm, en de eerste en/of tweede molecule. In bepaalde uitvoeringsvormen ligt de hoeveelheid van de eerste molecule, geconjugeerd aan de nanodeeltjes, tussen 30 en 50%, bij voorkeur tussen 40 en 50%, van de hoeveelheid 25 vereist voor volledige bedekking, waarin de nanodeeltjes nanostaafjes zijn met een lengte tussen 40 en 60 nm en een diameter tussen 10 en 20 nm.

De eerste molecule is normalerwijze geabsorbeerd op/gehecht aan/gekoppeld aan/gelinkt aan/ gebonden aan het oppervlak van het nanodeeltje, waar hierin doorgaans naar 30 verwezen wordt als "geconjugeerd aan" of "geconjugeerd met", door de nanodeeltjes te incuberen in een oplossing die de eerste molecule bevat onder condities die de hechting van de eerste molecule aan het oppervlak van de nanodeeltjes toelaten. Specifiek kan de eerste molecule geconjugeerd worden aan de nanodeeltjes via verscheidene methoden, bijvoorbeeld:

- 35 1) door de nanodeeltjes die voorzien zijn van één of meerdere functionele groepen te incuberen met bovengenoemde eerste molecule, waarin bovengenoemde één of meerdere functionele groepen geschikt zijn om de eerste molecule covalent te binden;

II) door de eerste molecule te koppelen aan een linkermolecule die een metaalbindende functionaliteit heeft, gevolgd door conjugatie van de eerste molecule aan de nanodeeltjes via de linkermolecule. Elk van deze methoden kan gebruikt worden in een strategie om het aantal bindingsplaatsen die per nanodeeltje voorgesteld worden te reduceren.

5 Daarom vereist de stap van functionalisatie van de nanodeeltjes (overeenstemmend met de hierboven beschreven stap b)) van de huidige methode in bepaalde uitvoeringsvormen het voorzien van het oppervlak van nanodeeltjes (voorzien in stap a)) van één of meerdere functionele groepen die geschikt zijn om de eerste molecule covalent te binden. In bepaalde uitvoeringsvormen worden bovengenoemde functionele groepen
10 geselecteerd uit carboxyl, amine, azide, alkynyl, carbonyl of hydroxyl.

Methoden voor de functionalisatie van nanodeeltjes zijn wel bekend aan deskundige personen en omvatten mogelijk, bijvoorbeeld, de hechting van een linkermolecule aan het oppervlak van het nanodeeltje, waarin bovengenoemde linkermolecule een eerste portie gelinkt aan het nanodeeltje (bv. via een metaalbindende functionaliteit) bevat en ook een
15 tweede portie die een functionele groep is die in staat is om een covalente binding met de eerste molecule te vormen.

Er is een variëteit aan linkermoleculen bekend aan personen met deskundigheid in het vak en doorgaans omvat dit bi-functionele moleculen. Over het algemeen omvatten linkermoleculen een spacergroep die aan één einde eindigt met een metaalbindende
20 functionaliteit en aan het andere einde met een functionele groep die in staat is om de eerste molecule covalent te binden.

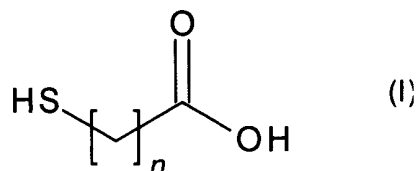
Relevante spacergroepen kunnen bestaan uit alifatische en onverzadigde koolwaterstofketens, spacers die hetero-atomen bevatten zoals zuurstof (ethers zoals polyethyleen glycol) of stikstof (polyaminen), peptiden, koolhydraten, cyclische of
25 acyclische systemen die mogelijk hetero-atomen bevatten. De spacergroep is bij voorkeur zo kort mogelijk, omdat er vastgesteld is de optische detectie van de interactie van een biomolecule met een tweede molecule verbetert met een gereduceerde afstand van de interactie tot het oppervlak van het nanodeeltje. Hoewel, een spacergroep die is te kort is kan ontoereikend zijn om de nanodeeltjes in suspensie te stabiliseren. Voor optimale
30 resultaten dient de spacergroep bij voorkeur een koolwaterstofketen met 6 to 18 en bij voorkeur 6 to 16 koolstofatomen, bijvoorbeeld 11 koolstofatomen, te bevatten.

Potentiële functionele groepen die in staat zijn om de eerste molecule covalent te binden omvatten nucleofiele functionele groepen (aminen, alcohols, thiolen, aziden, hydraziden), elektrofile functionele groepen (alkynen, carboxyl, aldehyden, esters, vinyl-ketonen,
35 epoxiden, isocyanaten, maleimiden), functionele groepen die in staat zijn tot cycloadditie reactie, die disulfide verbindingen, of bindingen aan metalen, vormen. Specifieke voorbeelden zijn onder meer primaire en secundaire aminen, hydroxamzuren, N-

hydroxysuccinimidyl esters, N- hydroxysuccinimidyl carbonaten, oxycarbonylimidazolen, nitrophenylesters, trifluoroethyl esters, glycidyl ethers, vinylsulfonen, en maleimiden.

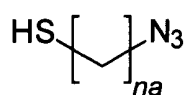
Specifieke linkermolecules die gebruik kunnen vinden in onderhavige bifunctionele molecules omvatten verbindingen zoals mercaptocarbonsuren zoals 11-
 5 mercaptoundecaanzuur, 11-[2-(2-azide-ethoxy)-ethoxy]-undecaan-1-thiol, azidobenzoyl hydrazide, N-[4-(p-azidosalicylamine)butyl]-3-[2'-pyridyldithio]propionamide), bis-sulfosuccinimidyl suberaat, dimethyladipimidaat, disuccinimidyltartraat, INI- - maleimidobutyryloxysuccinimide ester, N-hydroxy sulfosuccinimidyl-4- azidobenzoaat, N-succinimidyl [4-azidophenyl]-1,3'-dithiopropionaat, N-succinimidyl [4-
 10 iodoacetyl]aminobenzoaat, glutaraldehyde, en succinimidyl 4- [N-maleimidomethyl]cyclohexaan-1-carboxylaate, 3-(2-pyridyldithio)propionzuur N-hydroxysuccinimide ester (SPDP), 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexaan-1- carbonzuur N-hydroxysuccinimide ester (SMCC), en dergelijke.

15 In bepaalde uitvoeringsvormen omvatten één of meerdere functionele groepen voorzien op het oppervlak van het nanodeeltje carboxylgroepen. Carboxylgroepen zijn in het bijzonder nuttig voor het binden van proteïnen, omdat een geactiveerde carboxylgroep kan reageren met een amine-groep van een proteïne, waardoor een amide-binding gevormd wordt. Dienovereenkomstig worden in bepaalde uitvoeringsvormen de
 20 nanodeeltjes gecoat met één of meerdere (linker)molecules die een carboxylgroep en een metaalbindende functionaliteit omvatten. In bepaalde uitvoeringsvormen is de metaalbindende functionaliteit een sulfhydryl. Sulfhydryl-groepen binden sterk aan een metalen oppervlak, in het bijzonder aan goudoppervlakken. In verdere uitvoeringsvormen zijn de nanodeeltjes tenminste gedeeltelijk gecoat met een mercaptocarbonsuur. De
 25 sulfhydryl-groep van het mercaptocarbonsuur kan een (coördinatie-) binding vormen met een metaalatom van het oppervlak van het nanodeeltje, terwijl de carboxyl-groep kan gebruikt worden om molecules zoals proteïnen te binden. In bepaalde uitvoeringsvormen is het mercaptocarbonsuur een molecule van formule (I):

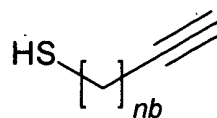


30 waarin n een geheel getal is van 6 tot 16. In bepaalde uitvoeringsvormen is het mercaptocarbonsuur een 11-mercaptoundecaanzuur.

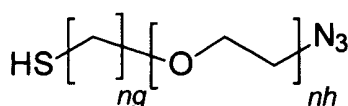
In bepaalde uitvoeringsvormen laten één of meerdere functionele groepen, voorzien op de nanodeeltjes, een koppelingsmechanisme, zoals gebruikt in Click Chemistry, toe. Bijvoorbeeld, de functionele groepen kunnen een azide of een alkyne omvatten, en daarbij een azide alkyne Huisgen cycloadditie toelaten, gebruik makend van een Cu-katalysator op kamertemperatuur, zoals gekend door personen met deskundigheid in het vak. Dienovereenkomstig zijn de nanodeeltjes in bepaalde uitvoeringsvormen tenminste gedeeltelijk gecoat met een (linker)molecule van formule (IIa), (IIb), (IIIa) en/of (IIIb):



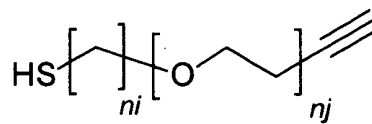
(IIa)



(IIIa)



(IIb)



(IIIb)

waarin na , nb , ng en ni onafhankelijk een geheel getal van 6 tot 16 zijn en nh en nj onafhankelijk een geheel getal van 1 tot 5 zijn.

Een azide functionele groep biedt verder de mogelijkheid van Staudinger ligatie. Staudinger ligatie vereist normalerwijze reactie tussen een azide-groep met een fosfine- of een fosfaat-groep. Dienovereenkomstig zijn de nanodeeltjes in bepaalde uitvoeringsvormen tenminste gedeeltelijk gecoat met een molecule van formule (IIa) of (IIb) zoals hierboven beschreven, waarin na en ng onafhankelijk een geheel getal van 6 tot 16 zijn.

In bepaalde uitvoeringsvormen is het mogelijk dat de eerste molecule als zodanig geen functionele groep die geschikt is de functionele groepen voorzien op de nanodeeltjes covalent te binden, bevat. Om deze reden kunnen de methoden volgens de huidige uitvinding een verdere stap vergen omvattende het voorzien van ten minste één functionele groep op de eerste molecule, voorafgaand aan de conjugatie van de eerste molecule aan de nanodeeltjes.

Indien de eerste molecule geconjugerd is aan de nanodeeltjes via de functionele groepen zoals hierboven beschreven, bepaalt de hoeveelheid van functionele groepen, voorzien op het oppervlak van het nanodeeltje, de maximale hoeveelheid van de eerste

molecule die aan de nanodeeltjes kan geconjugeerd worden. Dus, door de hoeveelheid van functionele groepen te beperken, is het mogelijk te verzekeren dat minder dan volledige bedekking van de nanodeeltjes door de eerste molecule verkregen wordt, zoals vereist in de methoden van de huidige uitvinding. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt dit 5 verzekerd door het nanodeeltje in contact te brengen met verschillende linkermoleculen, de ene draagt de reactieve functionele groep, terwijl de andere de reactieve functionele groep niet draagt, zodat het nanodeeltje gecoat is met een mengsel van reactieve en niet-reactieve linkers. Daarom, in bepaalde uitvoeringsvormen worden de nanodeeltjes, gebruikt in de methoden van de huidige uitvinding, op zodanige wijze gegenereerd dat zij 10 omvatten:

- één of meerdere linkermoleculen die een functionele groep en een metaalbindende functionaliteit omvatten; en
- één of meerdere moleculen die bovengenoemde metaalbindende functionaliteit omvatten en bovengenoemde functionele groep niet omvatten.

15 Naar deze één of meerdere moleculen wordt hierin ook verwezen als "niet-linkermoleculen".

De metaalbindende functionaliteit verzekert dat de linker- en niet-linkermoleculen kunnen gehecht worden aan het oppervlak van het metalen nanodeeltje, terwijl de functionele groep van de linker verzekert dat de eerste molecule covalent kan gebonden worden aan 20 de nanodeeltjes. Aangezien de niet-linkermoleculen de functionele groep niet omvatten, verzekert de hechting van een toereikende hoeveelheid van deze moleculen aan het oppervlak van het nanodeeltje dat de hoeveelheid van proteïnen geconjugeerd aan de nanodeeltjes minder is dan 70% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van bovengenoemde nanodeeltjes met die proteïne.

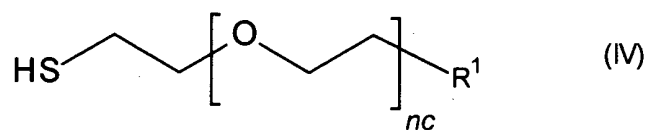
25 Een dergelijke coating kan verkregen worden door de nanodeeltjes bloot te stellen met een mengsel van de linker- en niet-linkermoleculen. Alternatief kan de coating verkregen worden door de nanodeeltjes volledig of bijna volledig te coaten met linkermoleculen, en de coating gedeeltelijk te wisselen met niet-linkermoleculen, of vice versa. Om deze reden wordt de selectie van de linker die niet-functionele groepen omvat idealiter zodanig 30 geselecteerd dat a) deze gedeeltelijk kan gewisseld worden met een linker met een reactieve functionele groep en b) deze niet interfereert met latere reacties.

Voorbeelden van geschikte linkermoleculen zijn hierboven beschreven. De één of meerdere niet-linkermoleculen zijn bij voorkeur structureel gelijkaardig aan de linkermolecule. In bepaalde uitvoeringsvormen zijn de niet-linkermoleculen identiek aan de 35 linkermolecule, behalve dat zij de functionele groep niet omvatten. Dit resulteert normalerwijze in een gelijkaardige affiniteit en uitwisselingskarakteristieken van de linker-

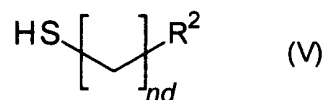
en non-linkermoleculen op het oppervlak van het nanodeeltje. In bepaalde uitvoeringsvormen hebben de niet-linkermoleculen een gereduceerde lengte in vergelijking met de linkermolecule. Dit reduceert sterische hindering door de niet-linkermoleculen na reactie van de functionele groep van de linkermoleculen met de eerste
 5 molecule. Hoewel, in bepaalde uitvoeringsvormen heeft/hebben de niet-linkermolecule(s) een lengte gelijkaardig aan of langer dan de linkermolecule. Dit kan de stabiliteit van de coating bevorderen.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvatten de niet-linkermolecule(s) één of meerdere functionele groepen die andere karakteristieken van het nanomateriaal, zoals
 10 oplosbaarheid en/of stabiliteit verbeteren. In bepaalde uitvoeringsvormen verbetert de aanwezigheid van de niet-linkermoleculen de stabiliteit van de nanodeeltjes-suspensies. Bijvoorbeeld, indien de niet-linkermoleculen sulfaat-, hydroxyl- of polyethyleneglycol-(PEG) elementen omvatten, kan de stabiliteit van de nanodeeltjes-colloïden in waterige media verbeterd worden.

15 In bepaalde uitvoeringsvormen wordt de functionele groep van de linkermolecule(s) geselecteerd uit carboxyl, azide, alkynyl, amine, carbonyl en hydroxyl. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt de functionele groep geselecteerd uit carboxyl, azide en alkynyl. In bepaalde uitvoeringsvormen is de functionele groep een carboxyl. In bepaalde uitvoeringsvormen is bovengenoemde metaalbindende functionaliteit een sulfhydryl. In
 20 bepaalde uitvoeringsvormen omvatten de één of meerdere linkermoleculen een mercaptocarbonsuur van formule (I) hierboven zoals 11-mercaptoundecaanzuur, en de één of meerdere niet-linkermolecule(s) is/zijn een samenstelling van formule (IV) en/of (V):



25



waarin R^1 en R^2 onafhankelijk geselecteerd worden uit sulfaat, hydroxyl, waterstof of methoxy;

30 waarin nc een zodanig getal is dat het moleculaire gewicht van de verbinding (IV) tussen 100 Da en 10kDa ligt, meer bepaald tussen 100 Da en 1kDa; en

nd een geheel getal van 6 tot 16 is.

In specifieke uitvoeringsvormen is nc een geheel getal van 1 tot 10. Normalerweise wordt er voor de gemengde enkelvoudige lagen een relatief kortere linkermolecule gekozen,

maar indien de linker voldoende flexibel is (bv. PEG), kunnen langere linkers gebruikt worden.

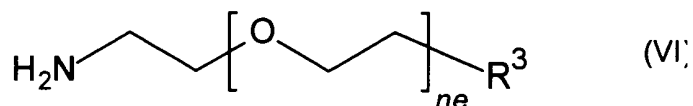
Minder dan volledige bedekking kan ook verkregen worden door enkel een bepaalde fractie van de functionele groepen, voorzien op het oppervlak van het nanodeeltje, te laten reageren met de eerste molecule. De vereiste hoeveelheid van de eerste molecule om de gewenste bedekking bereiken kan gevonden worden door middel van een titratie-experiment (zie verder). Hoewel, de ongereageerde functionele groepen die nog aanwezig zijn op het oppervlak van het nanodeeltje kunnen niet-specifieke bindingen en een gereduceerde stabiliteit van het nanodeeltje-conjugaat veroorzaken, bijvoorbeeld tijdens zuivering en ten aanzien van buffers. Dienovereenkomstig worden de ongereageerde functionele groepen, aanwezig op de nanodeeltjes, in bepaalde uitvoeringsvormen in reactie gebracht met (een overmaat van) een blokkeerreagens na conjugatie van de nanodeeltjes met de eerste molecule. Het blokkeerreagens reageert met de resterende ongereageerde functionele groepen, aanwezig op de nanodeeltjes, waardoor niet-specifieke bindingen vermeden worden.

Alternatief kan minder dan volledige bedekking ook verkregen worden door een bepaalde fractie van de functionele groepen, voorzien op de nanodeeltjes, te blokkeren met een blokkeerreagens, waarna de niet-geblokkeerde functionele groepen in reactie gebracht worden met (een overmaat van) de eerste molecule. Teneinde de optimale hoeveelheid van het blokkeerreagens, vereist voor het blokkeren van een bepaald deel van de functionele groepen voorzien op de nanodeeltjes, te bepalen, kan een concentratie-titratie uitgevoerd worden.

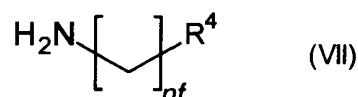
Het blokkeerreagens wordt normalerwijze zodanig gekozen dat deze geen interactie aangaat met de stoffen die getest zullen worden met het geconjugeerd nanomateriaal. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt het blokkeerreagens verder zodanig gekozen dat deze bijdraagt aan een goede oplosbaarheid van de geconjugeerde nanodeeltjes in één of meerdere oplosmiddelen, bijvoorbeeld door lading, hydrofilie of sterische hindering toe te voegen. De oplosbaarheid van de geconjugeerde nanodeeltjes in polaire oplosmiddelen kan verhoogd worden door blokkeerreagensen te voorzien die één of meerdere ethyleenglycol-groepen bevatten, en/of blokkeerreagensen die één of meerdere polaire functionele groepen zoals een sulfaat, hydroxyl of methoxy bevatten.

Indien de functionele groep een carboxyl is, dan is het blokkeerreagens een carboxyl blokkeerreagens. Het carboxyl blokkeerreagens kan een amine-groep bevatten zodat deze reageert met de resterende geactiveerde carboxylgroepen. In bepaalde

uitvoeringsvormen, is het (carboxyl) blokkeerreagens een verbinding van formule (VI) of (VII)



5



waarin R^3 en R^4 onafhankelijk geselecteerd worden uit sulfaat, hydroxyl, waterstof en methoxy;

ne is een zodanig getal dat het moleculair gewicht van samenstelling (VI) tussen 89 Da en 10 kDa ligt, bij voorkeur tussen 1 kDa en 10 kDa, bijvoorbeeld 1 kDa; en

nf is een zodanig getal dat het moleculair gewicht van samenstelling (VII) tussen 30 Da en 500 Da ligt. In bepaalde uitvoeringsvormen, is nf is een geheel getal van 1 tot 16, meer bepaald van 1 tot 8.

15 Zoals hierboven beschreven, kan de keuze van blokkeerreagens afhankelijk zijn van verscheidene factoren, zoals de stoffen die zullen getest worden met het proteïne-geconjugeerd nanomateriaal. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt het carboxyl blokkeerreagens geselecteerd uit Bovien Serum Albumine (BSA), Ovalbumin, en een amine polyethyleen glycol van formule (VI) zoals hierboven beschreven. Deze

20 blokkeerreagensen zijn bijzonder nuttig indien de eerste molecule een Humaan Serum Albumine (HSA) is. In bepaalde uitvoeringsvormen kunnen elk van de functionele groepen, voorzien op de nanodeeltjes, geactiveerd worden voorafgaand aan de reactie met de eerste molecule. Indien de functionele groep een carboxyl is, kan het carboxyl geactiveerd worden door middel van één of meerdere carboxyl-activerende groepen.

25 Nuttige carboxyl-activerende groepen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, carbodiimide reagensen. In bepaalde uitvoeringsvormen omvat de activering van de carboxylgroepen de toevoeging van een N-hydroxysuccinimide (NHS) zoals sulfo-NHS, tezamen met een koppelingsreagens zoals ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) of dicyclohexylcarbodiimide (DCC), bij voorkeur EDC. In bepaalde uitvoeringsvormen omvat

30 de activering de toevoeging van sulfo-NHS tezamen met EDC. Hiernaar wordt in dit document ook verwezen als "sulfo-NHS/EDC koppeling".

Alternatieve carboxyl-activerende groepen omvatten fosfonium reagensen zoals benzotriazoloxo-tris-(dimethylamine) fosfonium hexafluorofosfaat (BOP) en dergelijke,

uronium of carbonium reagensen zoals O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N', N'-tetramethyluronium hexafluorofosfaat (HBTU), N-hydroxy-succinimide (NHS), benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidinophosphonium hexafluorofosfaat (PyBOP) en dergelijke; l-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquonoline (EEDQ); l-methyl-2-chloropyridinium iodide (Muikaiyama's
5 reagens) en dergelijke.

Indien de functionele groep een azide is, zijn potentiële blokkeerreagensen molecules die een fosfine- of alkyne-groep bevatten. Indien de functionele groep een alkyne of fosfine is, zijn potentiële blokkeerreagensen molecules die een azide-groep bevatten. Voorbeelden van dergelijke molecules zijn gemodificeerde proteïnen die geen sterke interactie aangaan
10 met de tweede molecule.

Een alternatieve methode voor de koppeling van de eerste molecule aan de nanodeeltjes is door de eerste molecule aan een linkermolecule die een metaalbindende functionaliteit heeft te koppelen in stap b), gevolgd door de conjugatie van de eerste molecule aan de
15 nanodeeltjes via de linkermolecule in stap c) (methode II waar hierboven naar verwezen wordt). Het gebruik van een linker met een metaalbindende functionaliteit elimineert de behoefte om nanodeeltjes te voorzien van functionele groepen voor de binding van de eerste molecule. De eerste molecule wordt dan geconjugeerd aan de nanodeeltjes via de linkermolecule, meer bepaald via de metaalbindende functionaliteit van de linkermolecule.
20 Dit wordt bekomen door de nanodeeltjes te incuberen met (een overmaat van) de eerste molecule met de linkermolecule hieraan gehecht. In bepaalde uitvoeringsvormen omvat de linkermolecule een carboxylgroep en een metaalbindende functionaliteit. De carboxylgroep laat de binding van de linkermolecule to amine-functies, aanwezig op de proteïnen, toe. In bepaalde uitvoeringsvormen is de linkermolecule een
25 mercaptocarbonsuur, bijvoorbeeld mercaptoundecaanzuur.

In bepaalde uitvoeringsvormen worden de metalen nanodeeltjes, bv. gouden nanodeeltjes gecoat met een thiol-PEG van formule (IV) zoals hierboven beschreven, voorafgaand aan de incubatie met (een overmaat van) de eerste molecule met de linkermolecule hieraan gehecht. De thiol-PEG molecules worden dan tenminste gedeeltelijk gewisseld voor de
30 eerste molecule, via de linkermolecule. In bepaalde uitvoeringsvormen is het gebruik van nanodeeltjes gecoat met neutrale thiol-PEG molecules zoals methoxyl-PEG-thiol bijzonder nuttig om de agglutinatatie van de nanodeeltjes tijdens de conjugatie met de eerste molecule te vermijden; aangezien het gebruik van de EDC/Sulfo-NHS koppelingsmethode op carboxyl-gefunctionaliseerde nanomaterialen die negatief geladen zijn voor sommige
35 proteïnen die sterk positief geladen zijn een uitdaging kan vormen omwille van agglutinatatie van de nanodeeltjes.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvat de stap van het conjugeren van bovengenoemde eerste molecule aan bovengenoemde nanodeeltjes de stap van het bepalen van de hoeveelheid van de eerste molecule vereist voor de gewenste bedekking van de nanodeeltjes. In verdere uitvoeringsvormen, omvat stap c) van de huidige methode:

- 5 c1) optioneel, het selecteren van een geschikte pH en ionensterkte voor conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanodeeltjes via een buffertest;
- c2) het bepalen van de hoeveelheid van bovengenoemde eerste molecule nodig voor conjugatie van bovengenoemde eerste molecule aan bovengenoemde
- 10 nanodeeltjes;
- c3) conjugatie van bovengenoemde eerste molecule aan bovengenoemde nanodeeltjes, gebaseerd op de informatie, bekomen in stap c2) en optioneel c1).

Stap c2) wordt normalerwijze uitgevoerd door een concentratie-titratie, waarin de

15 nanodeeltjes gemengd worden met verschillende hoeveelheden proteïne en geanalyseerd worden. De titratie kan uitgevoerd worden aan de pH en ionensterkte, geselecteerd in stap c1). De titratie kan gemonitord worden via de meting van de absorbantie van de nanodeeltjes, bij voorkeur op twee of meer golflengten.

In bepaalde uitvoeringsvormen omvat stap c2) de toevoeging van verschillende

20 hoeveelheden van de eerste molecule aan een vaste hoeveelheid nanodeeltjes en de optekening van absorbantiespectra. Vervolgens kan de ratio $OD(\lambda_{max} + 80)/OD(\lambda_{max})$ (ΔRU) grafisch weergegeven worden versus de hoeveelheid van de toegevoegde eerste molecule. De conjugatie van de eerste molecule aan de nanodeeltjes leidt tot een verschil in de brekingsindex rond de nanodeeltjes en daarbij tot een roodverschuiving van de

25 λ_{max} , die gedetecteerd kan worden door het aflezen van een absorbantiespectrum. Door de hoeveelheid van de eerste molecule geconjugeerd aan de nanodeeltjes te verhogen, verhoogt ook de roodverschuiving. Na het bereiken van de maximum hoeveelheid van de eerste molecule die geconjugeerd kan worden aan de nanodeeltjes verandert het spectrum niet meer, wat resulteert in een plateau in de weergave van

30 $OD(\lambda_{max} + 80)/OD(\lambda_{max})$ (ΔRU) versus de hoeveelheid van de eerste molecule. De laagste hoeveelheid van proteïne op het plateau is de minimum hoeveelheid van de eerste molecule, nodig om het oppervlak van het nanodeeltje volledig te bedekken met de eerste molecule (of tenminste het LSPR-gevoelige deel van het nanomateriaal). Teneinde

35 een lager aantal bindingsplaatsen dan wat overeenstemt met een volledige bedekking van de nanodeeltjes met de eerste molecule te bekomen, kan een lagere hoeveelheid van de eerste molecule dan de maximale hoeveelheid gebruikt worden voor conjugatie. De

optimale hoeveelheid van de eerste molecule, te gebruiken voor conjugatie, is een compromis tussen twee neigingen, teneinde optimale sensitiviteit te verzekeren. Gewoonlijk is de ideale hoeveelheid van te gebruiken proteïne de hoeveelheid die overeenstemt met 30 – 60 % van het plateau.

- 5 Indien de nanodeeltjes voorzien zijn als een colloïde, dient de colloïde bij voorkeur gezuiverd te worden na conjugatie van de eerste molecule aan de nanodeeltjes, in het bijzonder wanneer de conjugatie van de eerste molecule aan de nanodeeltjes gebeurt door de nanodeeltjes te incuberen in een oplossing die een overmaat van de eerste molecule bevat. De overmaat van eerste molecules die niet gebonden zijn aan de
- 10 nanodeeltjes dienen bij voorkeur verwijderd te worden na conjugatie. Dit kan gebeuren door middel van één of meerdere cycli van precipitatie en hersuspensie van de nanodeeltjes, zoals gekend door een deskundig persoon.

Nadat de nanodeeltjes doelmatig gecoat zijn met de eerste molecule, worden de

15 nanodeeltjes, in een volgende stap (stap d) van de huidige methoden, geïncubeerd met de tweede molecule. Normalerweise wordt de tweede molecule voorzien in een (relatief) gezuiverde vorm in een vloeibare samenstelling, die een waterige samenstelling en/of een buffer kan zijn. In bepaalde uitvoeringsvormen kan de tweede molecule aanwezig zijn in een biologisch monster.

- 20 Incubatie van de nanodeeltjes met de tweede molecule laat interactie van de tweede molecule met de eerste molecule, die aan de nanodeeltjes geconjugerd is, toe. De nabijheid van de tweede molecule bij de nanodeeltjes verandert het diëlektrisch medium dat de nanodeeltjes omringt, wat normalerweise leidt tot veranderingen van bepaalde optische eigenschappen van het nanodeeltje, zoals de absorptie. Om deze reden kan
- 25 het meten van één of meerdere van deze eigenschappen informatie verstrekken over de interacties tussen de eerste en tweede molecule.

Dienovereenkomstig omvat een verdere stap (stap (e) waarnaar hierboven verwezen wordt) van de hierin uiteengezette methoden de monitoring van de interactie tussen de

30 eerste en tweede molecule wanneer zij in contact gebracht zijn (in stap d) door de nanodeeltjes te belichten met ten minste één excitatielichtbron en door één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes te monitoren. De lichtbron straalt normalerweise licht of straling uit op één of meerdere golflengtes tussen 220 en 1000 nm. In bepaalde uitvoeringsvormen wordt er een excitatielichtbron gebruikt die licht

35 of straling uitstraalt met een sterkte tussen ongeveer 1 nanowatt en 100 watt. In meer bijzondere uitvoeringsvormen is de excitatielichtbron een (xenon) flash lamp of een laser.

De monitoring van de optische parameters wordt gebruikt om een verandering hierin te detecteren, bv. een verandering in absorptie op een bepaalde golflengte. Elke geschikte optische parameter kan in deze stap beoordeeld of gemonitord worden, waarbij de representatieve parameters kunnen bestaan uit, maar niet beperkt zijn tot: absorptie, 5 brekingsindex, absorptie, verstrooiing, fluorescentie, luminescentie en dergelijke. De optische parameter kan gemonitord worden met elk geschikt apparaat en protocol, waarbij geschikte protocollen wel bekend zijn aan personen die deskundig zijn in het vak. De aanwezigheid of afwezigheid van een verandering in de optische parameter wordt dan gebruikt om te bepalen of de eerste molecule al dan niet een interactie aangaat met een 10 tweede molecule, die in bepaalde uitvoeringsvormen gebruikt wordt om een aanwijzing te geven van de aanwezigheid van een relevant analyt (tweede molecule) in een monster.

Dienovereenkomstig wordt in een verdere stap (stap (f) waarnaar hierboven verwezen wordt) van de methoden van de huidige uitvinding, een verandering van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes gedetecteerd. Deze 15 verandering is een resultaat van de aanwezigheid van een interactie tussen de eerste molecule en de tweede molecule. Waar er interactie is tussen de eerste en de tweede molecule zal dit inderdaad gedetecteerd worden, aangezien de optische eigenschappen van het nanodeeltje zullen veranderen. Waar er geen interactie is tussen de eerste en de tweede molecule zal er geen verandering in optische eigenschappen gedetecteerd 20 worden.

De hierin beschreven methoden omvatten de stap van het detecteren van een signaal, meer bepaald een verandering in signaal op één of meerdere golflengten. De termen “monitoren”, “bepalen”, “meten”, “beoordelen”, “detecteren” en “evalueren” worden onderling uitwisselbaar gebruikt en verwijzen naar elke vorm van meting, en omvatten de 25 detectie van geen enkele verandering. Dergelijke metingen kunnen zowel kwantitatieve als kwalitatieve bepalingen omvatten, zowel relatief als absoluut en omvatten tevens de bepaling van de hoeveelheid van een aanwezige stof, alsook de bepaling of deze al dan niet aanwezig is.

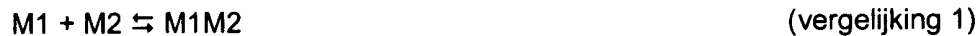
Om deze reden, zoals heirin gebruikt, betekent de term “detecteren” het vaststellen van 30 een signaal (of een verandering daarin), zowel kwalitatief als kwantitatief.

In bepaalde uitvoeringsvormen worden de één of meerdere optische eigenschappen van de nanodeeltjes gemeten op twee of meerdere golflengten tussen 220 en 1000 nm, bij voorkeur tussen 350 en 1000 nm. Meting op twee of meerdere golflengten laat toe nauwkeurigere gegevens te bekomen. In bepaalde uitvoeringsvormen zijn deze 35 golflengten discrete golflengten binnen dat bereik.

De methoden van de huidige uitvinding omvatten normalerwijze verder de stap van het analyseren van het gedetecteerde signaal of verandering in signaal en het bepalen van

een bepaalde eigenschap van de eerste of tweede molecule of van hun interactie op basis daarvan.

In bepaalde uitvoeringsvormen, omvat de stap van het bepalen van een verandering in één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanodeeltjes het bepalen van de dissociatieconstante (K_d) of de bindings- of associatieconstante (K_a) voor het associatie-dissociatie evenwicht tussen de eerste en tweede molecule. Het associatie-dissociatie evenwicht kan voorgesteld worden door vergelijking 1:



waarin M1M2 een associatie of complex van M1 en M2 voorstelt.

10 De reactie is gekarakteriseerd door de associatie-snelheidsconstante k_{on} en de dissociatie-snelheidsconstante k_{off} . In evenwicht wordt de voorwaarts bindende transitie $M1 + M2 \rightarrow M1M2$ in evenwicht gebracht door de terugwaarts ontbindende transitie $M1M2 \rightarrow M1 + M2$. Uitgaande van een eerste-orde reactie is dit,

$$k_{on}[M1][M2] = k_{off}[M1M2] \quad (\text{vergelijking 2})$$

15 waarbij [M1], [M2] en [RL] respectievelijk de concentratie van ongebonden vrije M1, de concentratie van ongebonden vrije M2 en de concentratie van M1M2 complexen voorstellen. De associatieconstante K_a en de dissociatieconstante K_d worden gedefinieerd door:

$$K_a = 1/K_d = k_{on}/k_{off} = [M1M2]/([M1][M2]) \quad (\text{vergelijking 3})$$

20 Dienovereenkomstig, indien de concentraties van M1, M2 en M1M2 in evenwicht gekend zijn, kunnen K_a en K_d berekend worden. Alternatief, kunnen K_a en K_d berekend worden uit een bindende isotherm (zie verder).

Meer informatie, zoals de associatie-energie, kan bekomen worden op basis van de associatie- of dissociatieconstante.

25

In een verder aspect voorziet de huidige uitvinding in het gebruik van de onderhavige methode van bepaling van een interactie tussen een eerste en een tweede molecule voor de bereiding van bindende isothermen voor de binding van bovengenoemde tweede molecule aan bovengenoemde eerste molecule, waarbij de bindingsaffiniteit, de bindingsconstante K_a of de dissociatieconstante K_d van bovengenoemde tweede molecule voor bovengenoemde eerste molecule beoordeeld wordt op basis van bovengenoemde bindende isotherm.

Een bindende isotherm kan geconstrueerd worden op basis van de gedetecteerde veranderingen in de optische eigenschappen, zoals de brekingsindex of de absorptantie en de hoeveelheid (of concentratie) van tweede molecule, toegevoegd aan de nanodeeltjes.

De methoden van de huidige uitvinding zijn tevens van belang in de context van screeningsmethoden. Daarom voorziet de huidige uitvinding, in bepaalde uitvoeringsvormen, in screeningsmethoden waarin de detectie uitgevoerd wordt volgens de huidige uitvinding. In verdere uitvoeringsvormen zijn de methoden "hoge throughput" 5 screeningsmethoden, meer bepaald methoden die ten minste gedeeltelijk uitgevoerd worden in een apparaat voor "hoge throughput" screening.

De term "screening" verwijst naar het bepalen de aanwezigheid van iets relevant, bv. een analyt, een gebeurtenis enz. Als zodanig kunnen de methoden volgens de huidige uitvinding gebruikt worden om een monster te screenen op de aanwezigheid of 10 afwezigheid van één of meerdere targetanalyten in het monster. Als zodanig voorziet de uitvinding in methoden voor de detectie van de aanwezigheid van één of meerdere targetanalyten in een monster. Daarnaast kunnen de onderhavige methoden ook gebruikt worden om te screenen op verbindingen die de interactie van een bepaald specifiek bindend elementenpaar moduleren. De term moduleren omvat zowel het verminderen (bv. 15 onderdrukken) en het verhogen van de interactie tussen de twee moleculen. Bijvoorbeeld, waar de colloïde een eerste element van een bindingspaar vertoont en de colloïde wordt in contact gebracht met het tweede element in de aanwezigheid van een kandidaat-agens, kan het effect van de kandidaat-agens op de interactie van de bindende elementenparen geëvalueerd of beoordeeld worden.

20

In nog een verder aspect heeft de huidige uitvinding betrekking op het instrumentarium voor de uitvoering van de methoden van de huidige uitvinding. Meer bepaald, het instrumentarium omvat nanodeeltjes waaraan een eerste molecule werd geconjugeerd. Meer bepaald, de nanodeeltjes zijn geconjugeerd op zodanige wijze dat er geen volledige 25 bedekking van de nanodeeltjes met de eerste molecule is. In bepaalde uitvoeringsvormen, is de bedekking minder dan 70%, minder dan 60%, meer bepaald tussen 30 en 50%.

De nanodeeltjes van de huidige uitvinding kunnen bekomen worden op de hierboven beschreven wijze, door deze te conjugeren met minder dan 70% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van de nanodeeltjes met de eerste molecule.

30 De uitvinding voorziet verder kits voor de uitvoering van de methoden van de huidige uitvinding. Meer in het bijzonder bevatten kits voor de uitvoering van de methoden van de huidige uitvinding

- een medium omvattende een veelheid aan metalen nanodeeltjes;
- instructies voor het gebruik van bovengenoemde nanodeeltjes in de methoden 35 volgens de huidige uitvinding;
- optioneel, bovengenoemde eerste molecule; en

- optioneel, bovengenoemde tweede molecule.

In bepaalde uitvoeringsvormen zijn bovengenoemde nanodeeltjes voorzien van functionele groepen, bij voorkeur geselecteerd uit carboxyl, amine, azide, carbonyl en hydroxyl.

- 5 De kits van de huidige uitvinding bevatten optioneel ook oplosmiddelen, buffers en/of stabilisatoren. De kits bevatten optioneel ook één of meerdere linker- en/of niet-linkermoleculen zoals hierin beschreven.

In bepaalde uitvoeringsvormen zijn de nanodeeltjes gouden nanostaafjes. Vele methoden
10 voor de productie van gouden nanostaafjes zijn gekend door deskundige personen. Normalerweise vereisen deze methoden het gebruik van kiemen van gouden nanodeeltjes en cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) als een coördinerende molecule, en resulteren ze in nanodeeltjes die volledig gecoat zijn met CTAB. Hoewel, in de methoden van de huidige uitvinding zijn deeltjes die volledig gecoat zijn met CTAB mogelijk niet
15 geschikt voor conjugatie aan de eerste molecule. Om deze reden kan een uitwisseling van de CTAB coating met een coating van verschillende moleculen, zoals mercaptocarbonsuren, vereist zijn. Hoewel, een dergelijke uitwisseling vereist normalerwijze lange reactietijden en/of verscheidene fase-omzettingen tussen de polaire en niet-polaire fase. De uitvinders hebben geoptimaliseerde coatingsmethoden gevonden,
20 die in het bijzonder geschikt zijn voor het bekomen van nanodeeltjes geconjugerd aan een eerste molecule. Deze methoden zijn van algemeen belang voor de coating van nanodeeltjes, maar kunnen ook gebruikt worden in de methoden van de huidige uitvinding. Dus, in een verder aspect voorziet de huidige uitvinding in methoden voor het coaten van een metalen nanodeeltje, met inbegrip van het gebruik van metalen
25 nanodeeltjes met een CTAB-coating teneinde nanodeeltjes met een mercaptocarbonsuurcoating te bekomen. In bepaalde uitvoeringsvormen omvatten de methoden van de uitvinding de volgende stappen:

- i) het voorzien van een vloeibare samenstelling omvattende metalen nanodeeltjes die ten minste gedeeltelijk gecoat zijn met CTAB. Normalerwijze
30 zijn de metalen nanodeeltjes voorzien in deze stap volledig gecoat met één of meerdere moleculen, waarin de coating CTAB bevat. De coating kan verder andere moleculen, zoals benzyldimethylammoniumchloride, bevatten.
- ii) het toevoegen van een thiol-polyethyleen glycol aan bovengenoemde samenstelling, waardoor een vloeibare samenstelling, die metalen
35 nanodeeltjes gecoat met een thiol-polyethyleen glycol bevat, verkregen wordt.

- iii) de zuivering van bovengenoemde samenstelling, bekomen in stap ii) door bovengenoemde nanodeeltjes te scheiden van vrije thiol-polyethyleen glycol en vrije CTAB.
- iv) het toevoegen van een mercaptocarbonsuur aan bovengenoemde samenstelling, bekomen in obtained in stap iii, waardoor een vloeibare samenstelling, die metalen nanodeeltjes gecoat met een mercaptocarbonsuur bevat.

In tegenstelling tot de gekende methoden, die in sommige stappen hydrofobe oplosmiddelen vereisen, kunnen all stappen van de methode voor het coaten van een metalen nanodeeltje volgens de huidige uitvinding uitgevoerd worden in een waterige fase. Dit vermindert potentiële gezondheids- en veiligheidsrisico's aanzienlijk en vergemakkelijkt het opschalen van de productie van nanodeeltjes. Verder leidt het ook tot verlaagde kosten met betrekking tot chemische producten en afvalbeheer. Dienovereenkomstig is, in bepaalde uitvoeringsvormen, de vloeibare samenstelling in stappen i), ii), iii) en iv) een waterige samenstelling.

In bepaalde uitvoeringsvormen is mercaptocarbonsuur, toegevoegd in stap iv) een samenstelling van de hierboven beschreven formule (I).

In bepaalde uitvoeringsvormen is de thiol-polyethyleen glycol, toegevoegd in stap ii) een verbinding van formule (IV) zoals hierboven beschreven, waarin n een zodanig getal is dat het moleculair gewicht van samenstelling (IV) tussen 100 Da en 10kDa ligt, bij voorkeur tussen 1kDa en 10kDa, bijvoorbeeld 5kDa; en R^1 is C_{1-4} alkoxy, bij voorkeur methoxy of ethoxy, waarin bovengenoemde C_{1-4} alkyl optioneel kan vervangen worden door één of meerdere groepen zoals hydroxyl.

De nanodeeltjes, gecoat met een mercaptocarbonsuur, bekomen in stap iv) zoals hierboven beschreven, kunnen gebruikt worden om hieraan een molecule te conjugeren. Dienovereenkomstig voorziet de huidige uitvinding verder in een methode voor de conjugatie van een molecule aan een metalen nanodeeltje, onder meer bestaande uit:

- i) het voorzien van een vloeibare samenstelling omvattende metalen nanodeeltjes die ten minste gedeeltelijk gecoat zijn met CTAB.
- ii) het toevoegen van een thiol-polyethyleen glycol aan bovengenoemde samenstelling, waardoor een vloeibare samenstelling, die metalen nanodeeltjes gecoat met een thiol-polyethyleen glycol bevat, verkregen wordt.
- iii) de zuivering van bovengenoemde samenstelling, bekomen in stap ii) door bovengenoemde nanodeeltjes te scheiden van vrije thiol-polyethyleen glycol en vrije CTAB.

- iv) het toevoegen van een mercaptocarbonsuur aan bovengenoemde samenstelling, bekomen in stap iii), waardoor een vloeibare samenstelling, die metalen nanodeeltjes gecoat met een mercaptocarbonsuur, bevat.
- v) bovengenoemde metalen deeltjes, bekomen in stap iv) in contact te brengen met bovengenoemde molecule.

In een verder aspect voorziet de huidige uitvinding in een methode voor de conjugatie van een molecule aan een nanodeeltje, onder meer bestaande uit:

- a) het voorzien van nanodeeltjes die één of meerdere metalen bevatten;
- b) bovengenoemde nanodeeltjes te voorzien van één of meerdere functionele groepen, of de eerste molecule te koppelen aan een molecule die een metaalbindende functionaliteit bevat;
- c) bovengenoemde eerste molecule te conjugeren aan bovengenoemde nanodeeltjes, waarbij de hoeveelheid van bovengenoemde eerste molecule gehecht aan bovengenoemde nanodeeltjes minder is dan 70% van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van bovengenoemde nanodeeltjes met bovengenoemde eerste molecule;

De volgende voorbeelden worden gegeven ter illustratie van huidige uitvinding en zijn geenszins bedoeld, en mogen in geen geval zodanig geïnterpreteerd worden, als een beperking van de reikwijdte van huidige uitvinding.

VOORBEELDEN

25 A) Bereiding van nanostaafjes coated by 11-mercaptoundecanoic acid

a1) Bereiding van met CTAB gecoate nanostaafjes

De methode gebruikt voor de bereiding van de gouden nanostaafjes is gelijkaardig aan de methode zoals beschreven door Yu en Irudayaraj (*Anal. Chem.* **2007**, *79*, 572-579). Samengevat werd er een kiemplossing bereid door toevoeging van 0.5mM waterstof tetrachloroauraat (HAuCl_4) to 0,1M CTAB, waarna een 0.01M NaBH_4 werd toegevoegd.

Daarna werd er een groeioplossing bereid door toevoeging van 42mM AgNO_3 en daarna 1mM HAuCl_4 aan de 0.1M CTAB oplossing. Onmiddellijk na de bereiding van de groeioplossing wordt er een oplossing met ascorbinezuur toegevoegd aan de groeioplossing. Na verandering van kleur wordt de kiemplossing toegevoegd, waardoor met CTAB gecoate gouden nanostaafjes gegenereerd worden.

a2) Verwijdering van overmaats CTAB

Na één week werd overmaats CTAB verwijderd van de nanostaafjes-suspensie door de suspensie te centrifugeren aan 10000g gedurende 30 minuten. Vervolgens werd het supernatans (die het merendeel van het overmaats CTAB bevat) verwijderd en de
5 geprecipiteerde nanostaafjes in het sediment werden gehersuspendeerd in (dubbel gedistilleerd) water.

a3) Uitwisseling van CTAB met mPEG-SH

Na verwijdering van overmaats CTAB, werd de CTAB coating van de nanostaafjes uitgewisseld met een sulfhydryl-gefunctionaliseerd methoxy polyethyleen glycol (mPEG-
10 SH, verkrijgbaar bij Nanocs als "PEG3-0021") coating. Eerst werd er een 10g/L oplossing van mPEG-SH in (dubbel gedistilleerd) water bereid. Aan deze oplossing werd eenzelfde volume van gezuiverde nanostaafjes-suspensie toegevoegd onder agitatie (roeren). Daarna werd het mengsel onderworpen aan ultrasone trillingen gedurende 5 minuten, gevolgd door agitatie gedurende 12 uur op kamertemperatuur.

15 a4) Verwijdering van overmaats mPEG-SH

De suspensie verkregen in stap a3) werd gecentrifugeerd aan 8000g gedurende 30 minuten op 25°C. Na centrifugatie werd het supernatans verwijderd was en de geprecipiteerde nanostaafjes werden gehersuspendeerd in een (1x concentraat) tris/boraat/EDTA (TBE) buffer. De centrifugatie- en hersuspensiecyclus werd driemaal
20 herhaald. Na de laatste centrifugatiestap werden de nanostaafjes gehersuspendeerd in een (1x concentraat) TBE buffer.

a5) Uitwisseling van de mPEG-SH coating met MUDA

Voor de uitwisseling van de mPEG-SH coating van de nanostaafjes met een mercaptoundecaanzuur (MUDA) coating, werd er een 60g/L oplossing van MUDA in
25 ethanol bereid. Deze oplossing werd toegevoegd aan de nanodeeltjes-suspensie, verkregen in stap a4) resulterend in een concentratie van ongeveer 1,2 g/l MUDA concentratie. Vervolgens werd de suspensie onderworpen aan ultrasoon trillingen gedurende 5 minuten, gevolgd door agitatie gedurende twee uur. Daarna werd de suspensie gecentrifugeerd aan 5000g gedurende 30 minuten aan 25°C, gevolgd door de
30 verwijdering van het supernatans en hersuspensie van de geprecipiteerde nanostaafjes in 25mL TBE buffer. Daarna werd er een 60g/L MUDA oplossing in ethanol toegevoegd aan de nanodeeltjes-suspensie (resulterend in een uiteindelijke MUDA-concentratie van 1,2 g/l), gevolgd door agitatie gedurende 12 uur.

a6) Verwijdering van overmaats MUDA

35 De nanodeeltjes-suspensie, verkregen in stap a5) werd gecentrifugeerd aan 5000g gedurende 30 minuten aan 25°C, gevolgd door de verwijdering van het supernatans en hersuspensie van de geprecipiteerde nanostaafjes in de TBE buffer. De cyclus van

centrifugatie en hersuspensie werd tweemaal herhaald. Na de laatste centrifugatiestap werd het sediment opnieuw gesuspendeerd in een 10mM MES buffer, omvattende 0,002% (per volume) Tween (polysorbaat). De suspensie werd vervolgens gedialyseerd tegen 10mM MES buffer, omvattende 0,002% (per volume) Tween gedurende één uur (3L 5 buffer per 25mL nanodeeltjes- suspensie).

Teneinde nanostaafjes te bekomen die gecoat zijn met een mengsel van MUDA en een andere molecule, kan de hierboven beschreven methode gebruikt worden, met het verschil dat in stap a5) gebruik gemaakt wordt van een oplossing die MUDA en die andere 10 molecule bevat.

B) Conjugatie van nanostaafjes met HSA

De hoeveelheid HSA vereist om een volledige bedekking van nanodeeltjes te bekomen werd bepaald door middel van een concentratie-titratie. Er werd een suspensie voorzien 15 die gecarboxyleerde (d.w.z. MUDA-gecoate) gouden nanostaafjes, zoals beschreven in voorbeeld A), bevat. De carboxylgroepen werden geactiveerd met EDC en sulfo-NHS, en de nanostaafjes-suspensie werd gemengd met toenemende hoeveelheden HSA in een bereik van 0 tot 200 µg proteïne per mL nanostaafjes-suspensie.

Absorbantiespectra van deze stalen werden opgetekend en ΔRU , dit is de verandering in 20 de ratio $(OD(\lambda_{max}+80)) / (OD\lambda_{max})$, d.i. de ratio van de optische densiteit aan $\lambda_{max}+80$ nm $(OD(\lambda_{max}+80))$ en de optische densiteit aan de piekwaarde $(OD\lambda_{max})$ werd grafisch weergegeven ten opzichte van de hoeveelheid van HSA per mL nanodeeltjes-suspensie. De ratio van deze optische densiteiten verstrekt informatie over de hoeveelheid van geconjugerd HSA. Afbeelding 1A geeft de grafieken van ΔRU vs. de HSA hoeveelheid 25 weer en toont dat de toegenomen hoeveelheden van toegevoegd HSA resulteren in een verhoogde verandering van ΔRU , wat kan verstaan worden als een toegenomen hoeveelheid geconjugerd HSA die de deeltjes omringt. De hechting van proteïne aan het nanomateriaal leidt inderdaad tot een verschil in de brekingsindex rond het nanomateriaal en daardoor tot een roodverschuiving van de λ_{max} die gedetecteerd kan worden door een 30 absorbantiespectrum af te lezen. Het effect van proteïne-conjugatie op de optische densiteit (OD) van een suspensie van gouden nanostaafjes wordt weergegeven in Afbeelding 1B. Hogere hoeveelheden van geconjugerde proteïne leiden tot toenemende roodverschuivingen van het spectrum d.w.z. verschuivingen naar hogere golflengten. Afbeelding 1A toont dat na het bereiken van de maximum hoeveelheid (100%) proteïne 35 die gehecht kan worden aan het nanomateriaal, het spectrum niet meer verandert, wat resulteert in een plateau in de weergave van ΔRU versus de hoeveelheid proteïne.

De laagste hoeveelheid proteïne op het plateau is de minimum hoeveelheid proteïne, vereist voor de volledige bedekking van het nanomateriaal met de relevante proteïne.

In een bijzondere uitvoeringsvorm van de huidige uitvinding is de optimale hoeveelheid van de te gebruiken proteïne de hoeveelheid die overeenstemt met 30 – 60 % van het plateau. In het onderhavige voorbeeld stemt dit overeen met 9 – 25 µg/mL proteïnen, zoals weergegeven in Afbeelding 1.

In dit bereik wordt een voldoende lage hoeveelheid proteïne aan de staafjes gehecht, teneinde depletie van het ligand te vermijden, en wordt een voldoende hoge hoeveelheid proteïne aan de staafjes gehecht teneinde een aanzienlijke roodverschuiving van λ_{\max} te verstrekken na binding van een bindingspartner.

C) Effect van bindingsplaats-densiteit op de bepaling van K_d

Teneinde het effect van het aantal bindingsplaatsen, voorzien op de nanodeeltjes, op de gemeten bindingseigenschappen, zoals de dissociatie constante (K_d), te bestuderen werd een gecarboxyleerde nanostaafjes-suspensie, zoals gebruikt in voorbeeld B) verdeeld in twee groepen. De twee groepen werden geconjugeerd met HSA door de carboxylgroepen met EDC/sulfo-NHS te activeren en de suspensie te mengen met respectievelijk 600 µg/mL HSA (monster 1) en 18,75 µg/mL HSA (monster 2). De ongereageerde carboxylgroepen, aanwezig op het oppervlak van de nanostaafjes, werden geblokkeerd door toevoeging van BSA. In overeenstemming met de resultaten van Voorbeeld A), werd er een volledige bedekking van de nanostaafjes met HSA bekomen in monster 1, terwijl er enkel een gedeeltelijke bedekking bekomen werd in monster 2.

De twee oplossingen werden in contact gebracht met Anti-Humaan Serum Albumine monoklonaal antilichaam (ab18081, verkrijgbaar bij abcam®) in identieke condities. Na een incubatietijd van 30 minuten werden de absorptiespectra van de suspensies opgetekend.

Afbeelding 2 toont het effect van de toevoeging van verschillende hoeveelheden van het antilichaam op de optische eigenschappen van de twee suspensies in evenwicht. In alle gevallen resulteerde de toegenomen toevoeging van antilichaam in een verhoogde verandering in de ratio van $OD(\lambda_{\max}+80) / OD\lambda_{\max}$, indicatief voor toegenomen hoeveelheden HSA molecules die zich binden met het antilichaam.

Op basis van de absorbantiegegevens kunnen dosisresponscurves geconstrueerd worden, aan de hand waarvan de dissociatieconstante K_d voor het HSA-antilichaam associatie-dissociatie evenwicht werd berekend. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 1. Met volledige bedekking (monster 1), wijken de K_d berekend uit de experimenten aanzienlijk af

van de correcte waarde, zoals bepaald voor monster 2. Deze afwijking kan geweten worden aan de depletie van het ligand.

Tabel 1 – Resultaten van K_d bepaling met verschillende bindingsplaats-densiteit

Monster	[HSA] ($\mu\text{g/mL}$)	K_d (nM)
1	600	99,39
2	18,75	6,413

5 Gelijkaardige resultaten worden bekomen bij gebruik van andere blokkeermiddelen. Tabel 2 toont de K_d -waarden die bekomen werden bij gebruik van methoxy-PEG-amine (mPEG-NH₂), BSA en ovalbumine. De incubatietijd was 60 minuten voor ieder blokkeermiddel. De resultaten, weergegeven in Tabel 2, geven aan dat de bekomen waarden voor K_d gelijk zijn aan de foutmarge.

10

Tabel 2 – Resultaten van K_d bepaling met verschillende blokkeermiddelen

Blokkeermiddel	Hoeveelheid gebruikt blokkeermiddel ($\mu\text{g/mL}$)	K_d (nM)
mPEG- NH ₂	16700	2,5 \pm 1,6
BSA	200	8,44 \pm 5,7
Ovalbumine	200	5,22 \pm 3,3

Een gelijkaardige groep van gouden nanostaafjes werd opgedeeld in drie groepen. De groepen werden geconjugeerd met HSA door de suspensie te mengen met respectievelijk
 15 600 $\mu\text{g/mL}$ HSA (monster 1), 37,5 $\mu\text{g/mL}$ HSA (monster 2) en 18,75 $\mu\text{g/mL}$ HSA (monster 3). De ongereageerde carboxylgroepen, aanwezig op het oppervlak van de nanostaafjes, werden geblokkeerd door toevoeging van BSA. In overeenstemming met de resultaten van Voorbeeld B), werd er een volledige bedekking van de nanostaafjes met HSA
 20 bekomen in monster 1, terwijl er enkel een gedeeltelijke bedekking bekomen werd in monster 2 en 3.

De drie oplossingen werden in contact gebracht met Anti-Humaan Serum Albumine monoklonaal antilichaam (ab18081, verkrijgbaar bij abcam®) in identieke condities. Na een incubatietijd van 60 minuten, werden de absorptiespectra van de suspensies

opgetekend, aan de hand waarvan de dissociatie constante K_d voor het HSA-antilichaam associatie-dissociatie evenwicht werd berekend. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3. Met volledige bedekking (monster 1), wijken de K_d berekend uit de experimenten opnieuw aanzienlijk af van de correcte waarde zoals bepaald voor monster 2 en 3. Deze 5 afwijking kan ook hier geweten worden aan de depletie van het ligand.

Tabel 3 – Resultaten van K_d bepaling met verschillende bindingsplaats-densiteit

Monster	[HSA] ($\mu\text{g/mL}$)	K_d (nM)
1	600	$252,4 \pm 47,1$
2	37,5	$5,5 \pm 1,25$
3	18,75	$3,8 \pm 1$

D) MUDA-functionaliseren van een proteïne en mPEG-SH uitwisseling

10 De relevante eerste molecuule in dit voorbeeld is BSA. BSA werd covalent gemodificeerd op de primaire amine met een thiol-linker, meer bepaald MUDA. Voor deze reactie werd de carboxyl-groep van MUDA geactiveerd met EDC en sulfo-NHS.

Vervolgens werd een overmaat van de gemodificeerde BSA (BSA_MUDA) toegevoegd aan een suspensie van gezuiverde mPEG-SH-gecoate nanostaafjes, zoals bekomen in stap 15 a4) van het hierboven beschreven voorbeeld A). Dit resulteert in een (gedeeltelijke) uitwisseling van mPEG-SH door BSA_MUDA op het oppervlak van de nanodeeltjes. De uitwisseling verloopt traag en neemt een paar uren tot verscheidene dagen in beslag.

Afbeelding 3 toont een concentratie-titratie van mPEG-SH-gecoate nanostaafjes met BSA_MUDA. Toevoeging van grotere hoeveelheden BSA_MUDA leidt normalerwijze tot 20 een toegenomen uitwisseling van mPEG-SH met BSA_MUDA, wat wordt aangegeven door een toegenomen ΔRU . De meting van dezelfde monsters na 120 minuten en na 3 dagen toont dat langere uitwisselingstijden leiden tot een verhoogde uitwisseling.

E) Conjugatie via Click chemistry of Staudinger ligatie

25 e1) Click chemistry

Afbeelding 4 toont een conjugatie tussen een eerste molecuule (1) en een nanodeeltje (2) volgens een bepaalde uitvoeringsvorm van de huidige uitvinding. De eerste molecuule (1) is een proteïne en het nanodeeltje (2) is een gouden nanostaafje, voorzien van azide functionele groepen. In een eerste stap (A), wordt de proteïne (1) voorzien van een

alkyne-groep door een amine-groep van de proteïne in reactie te brengen met het succinimidyl-groep van samenstelling (3). In een tweede stap (B), wordt de gefunctionaliseerde proteïne (4) geconjugeerd aan het nanodeeltje (2) via een azide alkyne Huisgen cycloadditie reactie, waardoor een nanodeeltje-conjugaat (5) ontstaat.

5 e2) Staudinger ligatie

Afbeelding 5 toont een conjugatie tussen een eerste molecule (1) en een nanodeeltje (2) volgens een bepaalde uitvoeringsvorm van de huidige uitvinding. De eerste molecule (1) is een proteïne en het nanodeeltje (2) is een gouden nanostaafje, voorzien van azide functionele groepen. In een eerste stap (A), wordt de proteïne (1) voorzien van een triarylfosfine-groep (dat een ester-groep gesitueerd op de fosfor bevat) door een amine-
10 groep van de proteïne in reactie te brengen met de succinimidyl-groep van samenstelling (6). In een tweede stap (B), wordt de gefunctionaliseerde proteïne (7) geconjugeerd aan het nanodeeltje (2) via een Staudinger reactie, waardoor een nanodeeltje-conjugaat (8) verkregen wordt.

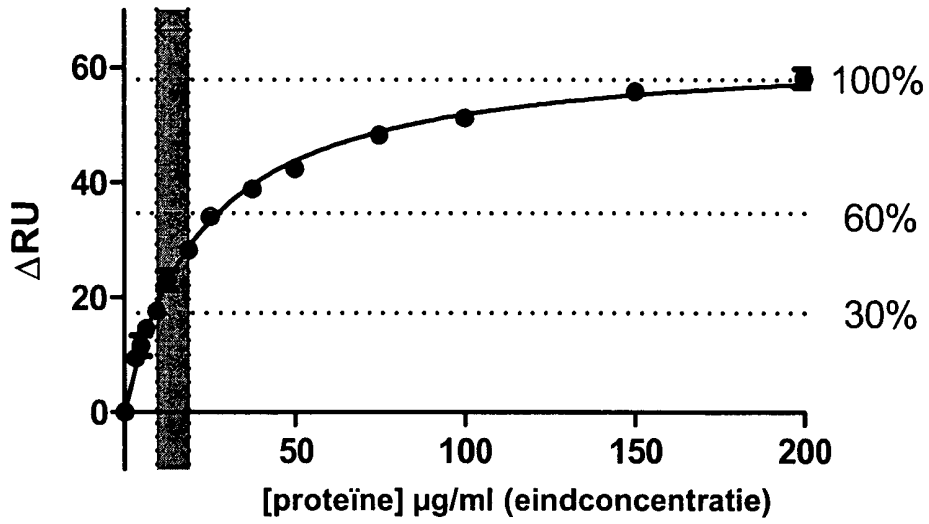
CONCLUSIES

1. Een methode voor het bepalen van een interactie tussen een eerste en een tweede molecule, omvattende:
 - 5 a) het voorzien van nanostaafjes die één of meerdere metalen bevatten, en een aspectratio hebben variërend tussen 1.5 en 5;
 - b) bovengenoemde nanostaafjes te voorzien van één of meerdere functionele groepen, of bovengenoemde eerste molecule te koppelen aan een molecule die een metaalbindende functionaliteit bevat;
 - 10 c) bovengenoemde eerste molecule te conjugeren met bovengenoemde nanostaafjes, waarbij de hoeveelheid van bovengenoemde eerste molecule gehecht aan bovengenoemde nanostaafjes tussen 30% en 70% is van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van bovengenoemde nanostaafjes met bovengenoemde eerste molecule;
 - 15 d) bovengenoemde nanostaafjes te incuberen met bovengenoemde tweede molecule;
 - e) de monitoring van stap d) door bovengenoemde nanostaafjes te belichten met ten minste één excitatielichtbron en de monitoring van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanostaafjes; en
 - 20 f) de detectie van een verandering van één of meerdere optische eigenschappen van bovengenoemde nanostaafjes waarin bovengenoemde verandering een resultaat is van de aanwezigheid van een interactie tussen bovengenoemde eerste molecule en bovengenoemde tweede molecule.
- 25 2. De methode volgens conclusie 1, waarin bovengenoemde nanostaafjes goud, zilver of koper bevatten.
3. De methode volgens conclusie 1 of 2, waarin stap f) het bepalen van een associatie-dissociatie evenwicht tussen bovengenoemde eerste en tweede molecule omvat.
- 30 4. De methode volgens één der bovenstaande conclusies van 1 tot 3, waarin stap f) het meten van bovengenoemde één of meerdere optische eigenschappen op twee of meerdere golflengten, variërend tussen 350 en 1000 nm, omvat.

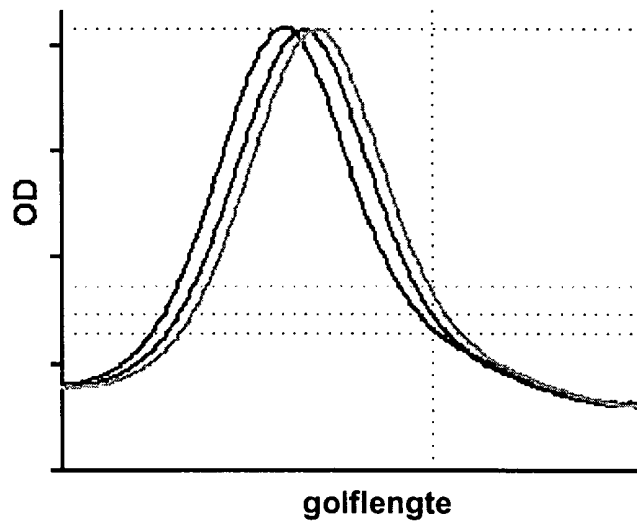
5. De methode volgens conclusie 4, waarin stap f) het meten van de absorptie van de nanostaafjes op twee of meerdere golflengten, variërend tussen 350 en 1000 nm, omvat.
6. De methode volgens één der bovenstaande conclusies van 1 tot 5, waarin stap b) de voorziening van nanostaafjes omvat, met aan hun oppervlak gehecht:
- één of meerdere molecules die een metaalbindende functionaliteit bevatten en een functionele groep geselecteerd uit carboxyl, amino, azide, alkynyl, carbonyl en hydroxyl; and
 - één of meerdere molecules die bovengenoemde metaalbindende functionaliteit bevatten en bovengenoemde functionele groep geselecteerd uit carboxyl, amine, azide, alkynyl, carbonyl en hydroxyl niet bevatten.
7. De methode volgens één der bovenstaande conclusies van 1 tot 6, waarin stap c) onder meer omvat:
- c1) optioneel, de selectie van een geschikte pH en een ionensterkte voor conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanostaafjes via een buffertest;
 - c2) de bepaling van de hoeveelheid van bovengenoemde eerste molecule, vereist voor de conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanostaafjes;
 - c3) conjugatie van bovengenoemde eerste molecule met bovengenoemde nanostaafjes, gebaseerd op de informatie verkregen in stap c2) en optioneel c1).
8. De methode volgens conclusie 7, waarin stap c2) een concentratie-titratie van bovengenoemde nanostaafjes met bovengenoemde eerste molecule omvat, optioneel aan de pH en ionensterkte, geselecteerd in stap c1).
9. De methode volgens één der bovenstaande conclusies van 1 tot 8, waarin bovengenoemde stap b) de koppeling van bovengenoemde eerste molecule aan een linkermolecule met een metaalbindende functionaliteit omvat, en stap c) een conjugatie omvat van bovengenoemde eerste molecule aan het bovengenoemde nanostaafjes, via bovengenoemde linkermolecule.

10. De methode volgens conclusie 9, waarin bovengenoemde linkermolecule een mercaptocarbonsuur is.
11. De methode volgens één der bovenstaande conclusies van 1 tot 10, waarin
5 bovengenoemde eerste molecule een proteïne is en het oppervlak van bovengenoemde nanostaafjes voorzien is van carboxylgroepen.
12. De methode volgens conclusie 11, verder omvattende het in reactie brengen van
10 carboxylgroepen op het oppervlak van bovengenoemde nanostaafjes met een carboxyl-blokkeerreagens.
13. De methode volgens één der conclusies 1 tot 12, waarin de hoeveelheid van
bovengenoemde eerste molecule gehecht aan bovengenoemde nanostaafjes
tussen 30% en 50% is van de hoeveelheid vereist voor volledige bedekking van
15 bovengenoemde nanostaafjes met bovengenoemde eerste molecule.
14. Een methode voor het coaten van een metalen nanodeeltje met een verbinding, omvattende:
- 20 i) het voorzien van een vloeibare samenstelling die metalen nanodeeltjes bevat die ten minste gedeeltelijk gecoat zijn met cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB);
 - ii) het toevoegen van een thiol-polyethyleen glycol aan bovengenoemde samenstelling waardoor een vloeibare samenstelling verkregen wordt die metalen nanodeeltjes, gecoat met thiol-polyethyleen glycol bevat;
 - 25 iii) zuivering van bovengenoemde samenstelling verkregen in stap ii), door bovengenoemde nanodeeltjes te scheiden van vrije thiol-polyethyleen glycol en vrije CTAB;
 - iv) het toevoegen van een mercaptocarbonsuur aan bovengenoemde samenstelling, verkregen in stap iii), waardoor een vloeibare samenstelling
30 bekomen wordt die metalen nanodeeltjes, gecoat met mercaptocarbonsuur, bevat, en
 - v) bovengenoemde deeltjes, bekomen in stap iv), in contact te brengen met de bovengenoemde verbinding.

15. De methode volgens conclusie 14, waarin bovengenoemde vloeibare samenstelling in stappen i), ii), iii) en iv) een waterige samenstelling is.

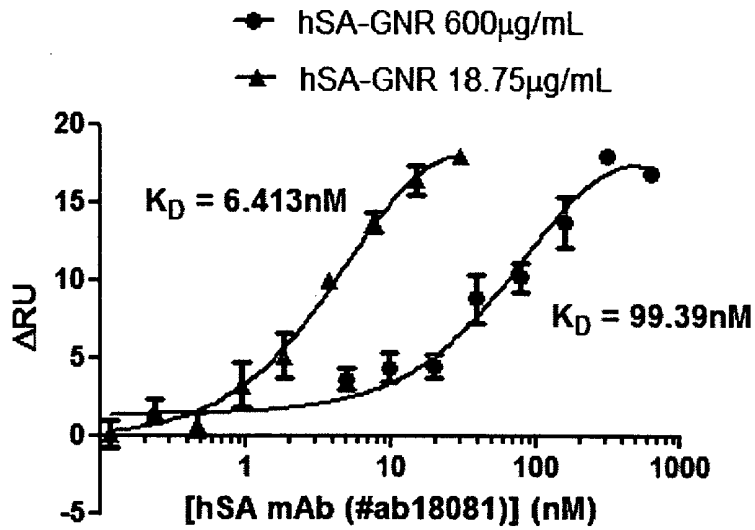


Afbeelding 1A

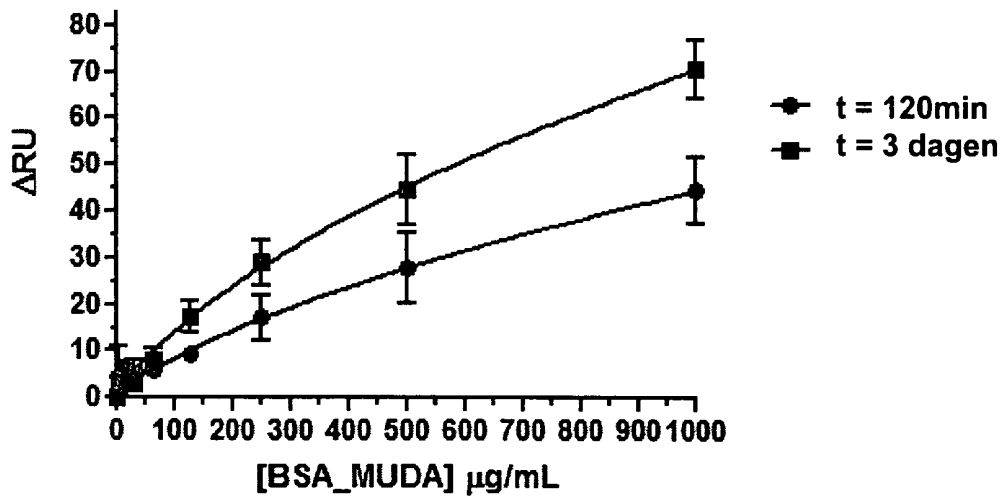


Afbeelding 1B

40



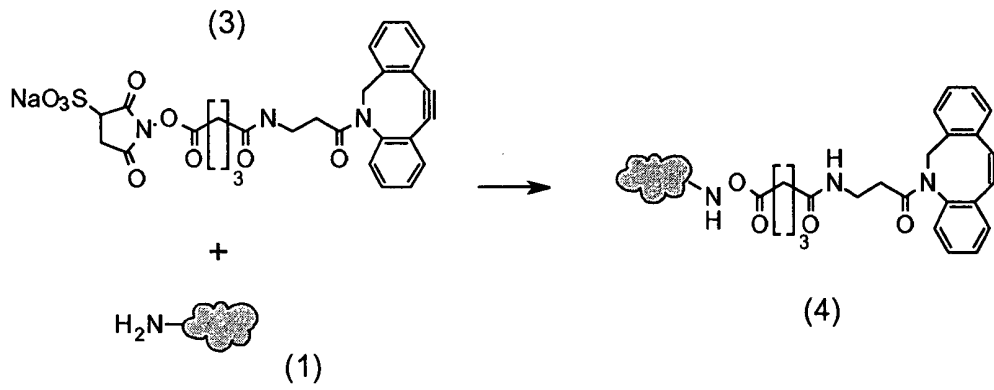
Afbeelding 2



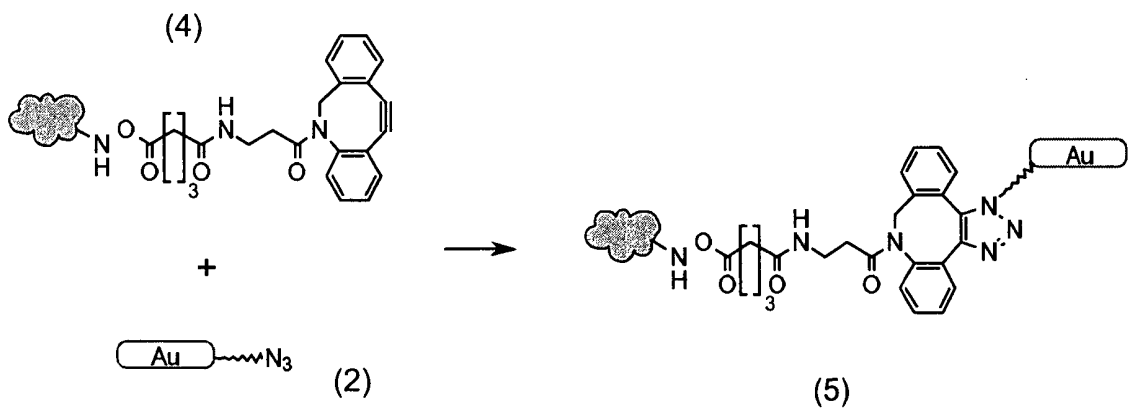
Afbeelding 3

4-1

A



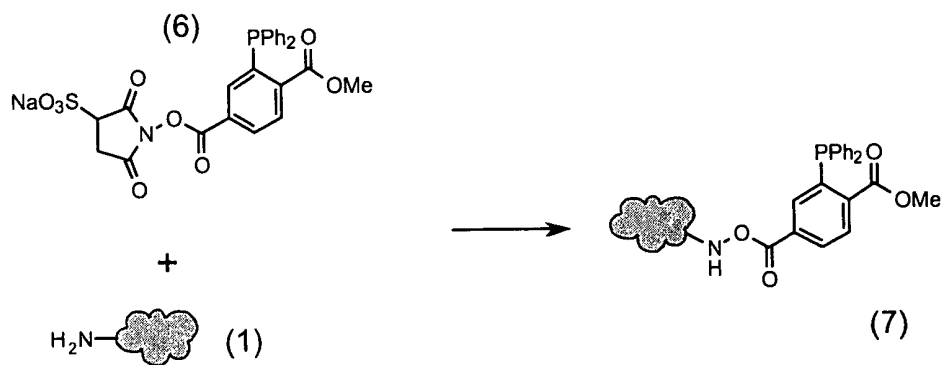
B



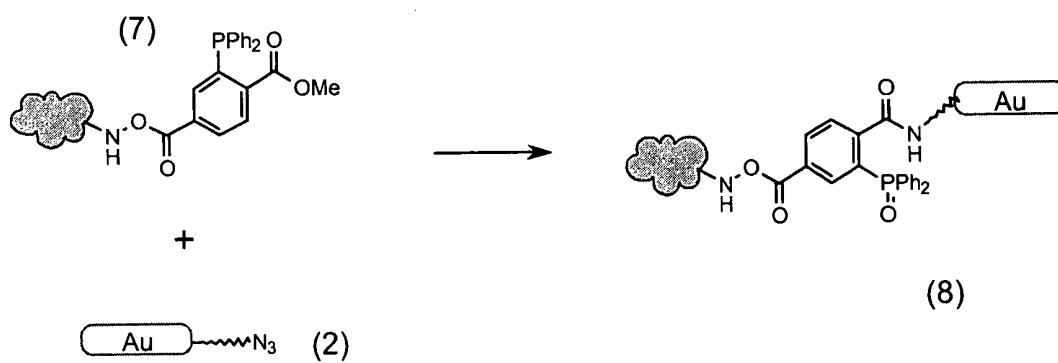
Afbeelding 4

42

A



B



Afbeelding 5

UITTREKSEL**METHODE VOOR HET METEN VAN INTERACTIE TUSSEN MOLECULES**

- 5 De huidige uitvinding heeft betrekking op de methoden voor de meting van de interactie tussen een eerste en een tweede molecule, bijvoorbeeld een proteïne en een antilichaam, door conjugatie van één van deze moleculen met nanodeeltjes, en het meten van de interactie tussen de eerste en tweede molecule via veranderingen in de optische eigenschappen van de nanodeeltjes. De huidige uitvinding heeft verder betrekking op de
- 10 methoden voor het coaten van nanodeeltjes.

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN

VERSLAG BETREFFENDE HET ONDERZOEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE OPGESTELD KRACHTENS ARTIKEL 21 § 9 VAN DE BELGISCHE WET OP DE UITVINDINGSOCTROOIEN VAN 28 MAART 1984

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE
	PHDI-014-BE
Belgische nationale aanvraag nr.	Datum van indiening
2013/00102	15-02-2013
	Ingeroepen voorrangsdatum
	16-02-2012
Aanvrager (Naam)	
PharmaDiagnostics NV	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr.
22-04-2013	SN 59897
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale octrooi classificatie (CIB), of tezelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB	
B82Y15/00	B82Y30/00
	G01N33/543
II. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
IPC	B82Y G01N
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. <input type="checkbox"/> MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. <input type="checkbox"/> GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 201300102

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. B82Y15/00 B82Y30/00 G01N33/543
ADD.

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
B82Y G01N

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

EPO-Internal

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	YU C ET AL: "Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, deel 79, nr. 2, 15 januari 2007 (2007-01-15), bladzijden 572-579, XP002471309, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC061730D	1-4, 9-11,13
Y	* Experimental section * * bladzijde 575 * * figuur 1 * ----- -/--	5-8,12, 14,15

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

D in de octrooiaanvraag vermeld

E eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

L om andere redenen vermelde literatuur

O niet-schriftelijke stand van de techniek

P tussen de voorrangdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

T na de indieningsdatum of de voorrangdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

X de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

Y de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

& lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

7 juni 2013

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Michalitsch, Richard

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 201300102

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	LAN SUN ET AL: "Surface-Enhanced Raman Scattering Based Nonfluorescent Probe for Multiplex DNA Detection", ANALYTICAL CHEMISTRY, deel 79, nr. 11, 1 juni 2007 (2007-06-01), bladzijden 3981-3988, XP055065184, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac070078z	1-4,13
Y	* Experimental section * * bladzijde 3982 - bladzijde 3983 * * figuren 2,7 *	5-12,14, 15
X	----- WO 2010/029175 A1 (MODPRO AB [SE]; LIEDBERG BO [SE]; AILI DANIEL [SE]; BALTZER LARS [SE];) 18 maart 2010 (2010-03-18)	1,2,13
Y	* bladzijde 1, regel 22 - bladzijde 4, regel 25 * * bladzijde 5, regels 13-27 * * bladzijde 6, regel 10 - bladzijde 7, regel 20 * * figuren 1-8 * * Section: Materials and Method * * bladzijde 34 *	3-12,14, 15
X	----- CHUNGANG WANG ET AL: "Gold Nanorod Probes for the Detection of Multiple Pathogens", SMALL, deel 4, nr. 12, 1 december 2008 (2008-12-01), bladzijden 2204-2208, XP055065181, ISSN: 1613-6810, DOI: 10.1002/smll.200800309	1-4,13
Y	* bladzijde 2205; figuren 1,2 *	5-12,14, 15
X	----- SANDEEP P. RAVINDRANATH ET AL: "Biofunctionalized Magnetic Nanoparticle Integrated Mid-Infrared Pathogen Sensor for Food Matrixes", ANALYTICAL CHEMISTRY, deel 81, nr. 8, 15 april 2009 (2009-04-15) , bladzijden 2840-2846, XP055065175, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac802158y	1-4,13
Y	* samenvatting * * figuren 3,4 * * section: Materials and Methods *	5-12,14, 15
	----- -/--	

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 201300102

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	<p>JIVI CHEN ET AL: "Ultrasensitive protein detection in blood serum using gold nanoparticle probes by single molecule spectroscopy", JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, deel 14, nr. 4, 1 januari 2009 (2009-01-01), bladzijde 040501, XP055065221, ISSN: 1083-3668, DOI: 10.1117/1.3183789</p>	1,13
Y	<p>* het gehele document *</p>	3-12,14, 15
A	<p>----- CHEN Y ET AL: "Atomic force bio-analytics of polymerization and aggregation of phycoerythrin-conjugated immunoglobulin G molecules", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, deel 41, nr. 12, 1 november 2004 (2004-11-01), bladzijden 1247-1252, XP004598481, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2004.05.012 * het gehele document * -----</p>	1-15

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
 RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
 VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**
 Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
 de stand van de techniek

BE 201300102

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 2010029175	A1	18-03-2010	
		EP 2338053 A1	29-06-2011
		US 2012202218 A1	09-08-2012
		WO 2010029175 A1	18-03-2010



SCHRIFTELIJKE OPINIE

Dossier Nummer SN59897	Indieningsdatum (dag/maand/jaar) 15.02.2013	Voorrangsdatum (dag/maand/jaar) 16.02.2012	Aanvraagnummer BE201300102
Classificatie (IPC) INV. B82Y15/00 B82Y30/00 G01N33/543			
Aanvrager PharmaDiagnostics NV			

Deze schriftelijke opinie bevat een toelichting en de corresponderende pagina's met betrekking tot de volgende onderdelen:

- Onderdeel I Basis van schriftelijke opinie
- Onderdeel II Voorrang
- Onderdeel III Formulering van een opinie inzake nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk
- Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding
- Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring
- Onderdeel VI Bepaalde geciteerde documenten
- Onderdeel VII Gebreken in de aanvraag
- Onderdeel VIII Opmerkingen betreffende de aanvraag

Form BE237A (Dekblad) (Januari 2007)	De Examinator Michalitsch, Richard
--------------------------------------	---------------------------------------

SCHRIFTELIJKE OPINIE

Aanvraagnummer

BE201300102

Onderdeel I Basis van de opinie

1. Deze opinie is opgesteld op basis van de conclusies ingediend voor aanvang van het onderzoek.
2. Met betrekking tot **nucleotide en/of aminozuur sequenties** die, in voorkomend geval, genoemd worden in de aanvraag, is deze opinie opgesteld op basis van de volgende elementen:
 - a. Aard van het element:
 - een lijst van de sequentie(s)
 - tabel(len) met betrekking tot de lijst van de sequentie(s)
 - b. Type drager:
 - op papier
 - in elektronische vorm
 - c. Moment van indiening of levering:
 - opgenomen in de aanvraag zoals ingediend
 - samen met de aanvraag elektronisch ingediend
 - later geleverd
3. Bovendien, wanneer er mer dan één versie of kopie van een sequentielijst of van één of meerdere tabellen die er betrekking op hebben, werd ingediend, zijn de benodigde verklaringen ingediend, dat de informatie, die later of bij wijze van aanvullende kopieën werd geleverd naar gelang het geval, identiek is aan diegene die oorspronkelijk werd geleverd en niet verder gaat dan de openbaarmaking in de internationale aanvraag zoals oorspronkelijk ingediend.
4. Aanvullende opmerkingen:

SCHRIFTELIJKE OPINIE

Aanvraagnummer
BE201300102

Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring

1. Verklaring

Nieuwheid	Ja: Conclusies 5-8, 12, 14, 15 Nee: Conclusies 1-4, 9-11, 13
Inventiviteit	Ja: Conclusies Nee: Conclusies 1-15
Industriële toepasbaarheid	Ja: Conclusies 1-15 Nee: Conclusies

2. Citaten en explicaties:

Zie apart blad

Re Item V.

Novelty and Inventive Step

1. Independent claims.

Claims 1, 13 and 14 are independent claims, of which claim 13, i.e. a kit claim, is the broadest.

2. Claim 13 is directed towards a kit comprising (i) a medium comprising a plurality of metal nanoparticles, (ii) instructions for use of said nanoparticles, (iii) optionally, a first molecule; and (iv) optionally, a second molecule.

With the present wording the claim has to be construed as a medium comprising metal nanoparticles. The other features do not restrict the claim in any way. The instructions for use represent a non-technical feature that has no influence on the technical scope of the claim, and the optional molecules are understood as "purely optional" and thus the above argument - no restriction of the scope - also holds for the molecules. The claim only defines a medium with metal nanoparticles. The applicants will certainly not contest the fact that such media and such nanoparticle-solutions or suspensions are known (without even analysing any prior art). **Thus claim 13 is not novel.**

3. Independent method claim 1 (and claims 2-12).

3.1. Claim 1 defines a method of determining an interaction between molecules the method comprising

- providing metal nanoparticles NPs
- coating the NPs with functional groups, or coupling a first molecule to a molecule comprising a metal binding functionality;
- conjugating that first molecule to the nanoparticles with a predetermined coverage level,
- incubating said nanoparticles with a second (target) molecule;
- and detecting an optical change that occurs in response to an interaction between those molecules.

3.2. Relevant prior art. Reference is made to the following documents:

- D1 YU C ET AL: "Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods",
ANAL CHEM. vol. 79, no. 2, 2007-01-15, pages 572-579.
- D2 LAN SUN ET AL: "Surface-Enhanced Raman Scattering Based
Nonfluorescent Probe for Multiplex DNA Detection",
ANAL. CHEM.,
vol. 79, no. 11, 2007-06-01, pages 3981-3988.
- D3 WO 2010/029175 A1 (MODPRO AB [SE]; LIEDBERG BO [SE]; AILI
DANIEL [SE]; BALTZER LARS [SE];) 18 March 2010 (2010-03-18)

3.3. Documents D1 and D2 represent highly relevant pieces of prior art for the subject matter of claim 1. In fact, the method as claimed appears to be known from D1 and/or D2.

- D1, for example, discloses (fig.1) a metal based nanoparticle, which is actually a gold nanorod coated by a mixed layer of CTAB and mercaptoundecanoic acid (MUA). The acid correlates with the step of providing the NP surface with a functional group, which is the carboxy group of the MUA. That carboxy-group provides an anchoring point for the first molecule, which in D1 is a protein based recognition molecule (IgG, immunoglobuline G), whose NH functions react with the carboxylated surface. The recognition group then reacts upon incubation with a target molecule thereby producing a change in the optical properties of the functionalized nanorod as a whole (cf. D1, p.575, figures). The target binding event results in a clearly distinguishable spectra signal in the UV-vis spectrum.

The relative coverage of the nanoparticle with the first molecule as defined in feature c) of claim 1 is very vague and strongly depends on the effective size of the molecule and the size of the nanoparticle used, as well as their size ratio. Taking figure 1 of D1 as a reference the figure a priori suggests a surface coverage with the first (i.e. the receptor molecule) well below 50%, but clearly above 10%. Taking furthermore the size of the IG protein into consideration, which is in the range of 10-15 nm diameter (without functionalization, cf. D7, AFM data), the coverage essentially depends on the size of the nanorods used.

In summary, it is the opinion of the ISA that the feature does not provide novelty to the independent claim and thus claim 1 does not comply with the requirements of novelty.

- The same objection holds for claims 2-5 and 10-12, which add nothing novel to the claim they depend on.

- Related arguments hold with regard to D2, which also anticipates the subject matter of the claims mentioned.

- For claims 6-9 novelty is recognized, but what the method step actually define is a variety of options for linking a receptor compound to a nanoparticle (or nanorod). The underlying chemistry only serves the purpose of covalently bonding the receptor to the particle, and naturally countless synthetic strategies can be used for this purpose. However, the choice of a specific strategy does not require an inventive ability and therefore no inventive step is recognized for the claims.

- A related line of argumentation holds with regard to claims 14 and 15. Clearly the claims are novel over the available prior art, but it is not apparent what from a method point of view is inventive with respect to the use of a thiolated PEG. What is known about such layers is essentially that they prevent the unspecific adsorption of proteins onto their surface so it would appear obvious to use such layers when it comes to the detection of protein type analytes. Therefore claims 14 and 15 are considered to lack an inventive step.
