

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 990**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 07763259 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1981994**

54 Título: **Ensayos con nanoetiquetas SERS**

30 Prioridad:

08.02.2006 US 771766 P

24.07.2006 US 832917 P

20.12.2006 US 870963 P

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

12.09.2014

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**NATAN, MICHAEL;
PENN, SHARRON GAYNOR;
CROMER, REMY;
SHA, MICHAEL;
XU, HONGXIA y
DOERING, WILLIAM E.**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 493 990 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayos con nanoetiquetas SERS

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención se dirige hacia un método y sistema para el uso de nanoetiquetas de superficie potenciada para dispersión Raman (nanoetiquetas SERS) para crear una variedad de plataformas de ensayo.

10 **Antecedente de la invención**

[0002] Las partículas, y las partículas magnéticas en particular, se utilizan ampliamente en ensayos diagnósticos como especies de captura o de detección en fase sólida. Los ensayos basados en micropartículas se pueden dividir en dos categorías principales: ensayos homogéneos (sin separación) y ensayos heterogéneos.

15

[0003] En un formato de ensayo homogéneo (sin separación) los reactivos de unión se mezclan y se miden sin ninguna etapa posterior de lavado antes de la detección. Las ventajas de un sistema de ese tipo son la cinética rápida en fase disolución, un formato de ensayo simple, instrumentación más sencilla así como costes menores debidos a menor número de etapas de ensayo, volúmenes inferiores y menos residuos. Los inmunoensayos en fase homogénea no necesitan la separación física entre analitos libres y ligados y, por tanto, pueden ser más rápidos y fáciles de llevar a cabo que los inmunoensayos heterogéneos. Los sistemas de inmunoensayos homogéneos utilizan muestras de tamaño más pequeño, un volumen inferior de reactivos y tiempos de incubación más cortos, lo que proporciona un ciclo de trabajo más rápido. Las desventajas de este tipo de ensayos pueden ser un intervalo dinámico y sensibilidad limitados. Puesto que no hay separación de analito libre antes de la detección de la señal, la sensibilidad puede verse también afectada. Análogamente, las interferencias podrían ocasionar una intensa señal de fondo debida a la interacción entre la muestra y la captura de los reactivos de detección. Los ensayos homogéneos son el formato de ensayo preferido en plataformas de cribado de alto rendimiento tales como ensayos basados en AlphaScreen, SPA, polarización con fluorescencia y citometría de flujo, así como en ensayos diagnósticos tales como los ensayos de aglutinación de partículas usando nefelometría o turbidimetría como métodos de detección.

30

[0004] Los inmunoensayos heterogéneos que requieren la separación de analito libre y detector no unido pueden ser en algunos casos más versátiles que los ensayos homogéneos. Las etapas de lavado o de separación física eliminan la mayoría de sustancias interferentes y, por lo general, no interfieren con la etapa de detección/cuantificación. Los ensayos heterogéneos por etapas son posibles porque permiten un tamaño de muestra más grande, que a su vez mejora la sensibilidad y proporciona un intervalo dinámico mayor que las curvas de ensayo con patrones convencionales. Las desventajas de los inmunoensayos heterogéneos es que necesitan mucha mano de obra, requieren tiempo y normalmente necesitan analizadores de uso exclusivo. Además, los sistemas heterogéneos automatizados necesitan diseños más complicados o varios instrumentos para realizar las etapas de lavado y separación. Muchos analizadores clínicos utilizan micropartículas magnéticas en ensayos diagnósticos heterogéneos para unir selectivamente, y posteriormente separar, el analito de interés de su matriz circundante mediante un campo magnético (*The Immunoassay Handbook* (2001) Nature Publ, Londres). Entre los analizadores basados en este formato se encuentran los instrumentos ACS 180 e Immuno I de Bayer Diagnostics, el instrumento Access de Beckman Coulter y el instrumento Elecsys de Roche Diagnostics.

45

[0005] De manera tradicional, solamente se ha utilizado un biomarcador para diagnosticar una enfermedad en ensayos homogéneos tales como los descritos anteriormente: por ejemplo, al antígeno prostático específico (PSA) es el marcador de elección para el cáncer de próstata, incluso aunque tiene poca especificidad (Lu-Yao y col. (2003) *J Natl Cancer Inst.* 95:1792-1797). Con la llegada de la proteómica, se cree que los ensayos diagnósticos que impliquen varios biomarcadores aumentarán la precisión, especificidad y discernimiento entre diferentes enfermedades que muestran síntomas similares. El cribado con varios marcadores, como ya se realiza en el campo genómico, proporciona mejor información de diagnóstico y pronóstico que el cribado con un solo marcador. Véase, por ejemplo, Genomic Health's Oncotype Dx Breast Cancer Assay (2005) (www.genomichealth.com).

55

[0006] Los ensayos diseñados para acortar el tiempo entre el muestreo y el diagnóstico son también importantes en escenarios de urgencias o de punto de atención al paciente. Por ejemplo, Biosite Inc. ofrece un inmunoensayo de flujo tangencial para el diagnóstico y evaluación rápidos de la gravedad de una insuficiencia cardiaca y la estratificación según el riesgo en síndromes coronarios agudos (Biosite Website (2005) <http://www.biosite.com/products/cardiac.aspx>.) Por tanto, se necesitan tecnologías de ensayo más sencillas, más precisas y más rápidas para implementar clínicamente los muchos biomarcadores recientemente identificados en la investigación proteómica. La capacidad de cuantificar tres o más proteínas simultáneamente en un bioensayo rápido sin lavado y sin preparación de la muestra mejoraría de forma importante el estado de la técnica en lo que respecta al diagnóstico o pronóstico de una enfermedad, así como en el seguimiento del progreso de una enfermedad.

60

[0007] La presente invención está dirigida a superar uno o más problemas de los descritos anteriormente.

El documento W02004007767 describe perlas de polímero activo SERS y un procedimiento para su producción para su uso en la detección de moléculas diana, así como métodos para detectar moléculas diana.

El documento W02005113817 proporciona sondas de aptámero, sondas conjugadas de nanopartícula-aptámero, matrices de aptámeros, métodos para detectar analitos diana en una muestra que comprenden detectar la unión de un analito diana a las sondas del aptámero, métodos de detección, y kits.

El documento US6514767 enseña nanopartículas metálicas asociadas a un analito activo en espectroscopía y rodeado por un encapsulante que se describe como útil para etiquetas ópticas sensibles que se pueden detectar mediante espectroscopía de superficie mejorada.

10 Sumario de la invención

[0008] La presente invención proporciona varios métodos y sistemas para el uso de nanoetiquetas de superficie potenciada para dispersión Raman (nanoetiquetas SERS) para crear una variedad de plataformas de ensayo homogéneo, heterogéneo o secuencial. En determinadas realizaciones, las nanoetiquetas SERS se utilizan junto con partículas magnéticas. También se describen las plataformas de ensayo multiplexadas. En determinadas realizaciones, los ensayos son útiles para proteómica clínica. También se describen plataformas de ensayo adecuadas para su uso en una matriz biológica, por ejemplo, sangre completa o suero. Los formatos de ensayo descritos en el presente documento se pueden utilizar para detectar cualquier analito de interés entre los que se incluyen pero no se limitan a la detección de células, virus, bacterias, proteínas, ADN, ARN o moléculas pequeñas en cualquier tipo de muestra biológica (del reino animal o vegetal) o ambiental, entre las que se incluyen pero no se limitan sangre completa o suero, muestras desconocidas, orina, heces, aire, agua potable, fagos, cualquier organismo, aglomerados celulares de células, por ejemplo, homogenizados de tejido canceroso.

[0009] La descripción detallada siguiente incluye las siguientes subsecciones:

25 A. Una descripción general de las nanoetiquetas SERS para ensayos biológicos.
 B. Realizaciones de inmunoensayos de tipo sándwich con anticuerpos de captura asociados a la pared interna de un vial de ensayo.
 C. Realizaciones de inmunoensayos de tipo sándwich heterogéneos u homogéneos con partículas de captura magnética.
 30 D. Hibridación de SERS/perlas magnéticas para soportar un ensayo de ADN de tipo SERS magnético.
 E. Ensayo competitivo SERS/perlas magnéticas.
 F. Ensayos de detección de secuencia.

[0010] El uso de partículas para captura magnética en algunos ensayos descritos más adelante permitirá la integración sencilla con los analizadores clínicos existentes. El uso de nanoetiquetas SERS (tal como se describe más adelante) permitirá el uso de un formato de ensayo sin lavado y multiplexado. Es importante resaltar que hay una tendencia emergente de amplio calado en industria hacia la miniaturización, de forma típica mediante el uso de tecnologías de microfluidos y nanofluidos, que también afecta el campo diagnóstico permitiendo la reducción de muestras de volúmenes y reactivos así como reduciendo el tiempo de reacción implicado en cada experimento. De esta forma, la miniaturización puede disminuir el coste total por experimento. Sin embargo, para conseguir los beneficios de la miniaturización, se deben superar nuevos desafíos como la necesidad de procedimientos precisos y exactos de manipulación de líquidos. El método de ensayo y la plataforma descrita en el presente documento no necesita, en muchos casos, la manipulación de líquidos, evitando de esta manera los ensayos con microfluidos y nanofluidos. Los métodos de ensayo y las plataformas de la presente invención gestionarán y sondearán cualquier tamaño de muestra correctamente por igual.

Breve descripción de los dibujos

[0011] La Fig. 1 es un diagrama esquemático de una nanoetiqueta SERS adecuada para implementar las realizaciones seleccionadas de la presente invención;

[0012] La Fig. 2 es un gráfico de comparación entre los espectros SERS de nanoetiquetas SERS que tienen cinco moléculas indicadoras diferentes;

55 **[0013]** La Fig. 3 es una ilustración esquemática de un ensayo secuencial;

[0014] La Fig. 4 es una representación gráfica de una curva dosis-respuesta de IL-4;

[0015] La Fig. 5 es una ilustración esquemática y fotográfica de un ensayo homogéneo;

60 **[0016]** La Fig. 6 es una representación gráfica de una curva dosis-respuesta en presencia de un exceso de nanoetiquetas;

[0017] La Fig. 7 es una representación gráfica del espectro de etiquetas BPE unidas a superficie;

- [0018]** La Fig. 8 es una representación gráfica de una curva dosis-respuesta de IL-4 en un ensayo homogéneo;
- [0019]** La Fig. 9A-C son diferentes representaciones gráficas de espectros Raman obtenidos en presencia de fluidos biológicos;
- [0020]** La Fig. 10 es una representación gráfica de un espectro Raman realizado sobre fluidos biológicos;
- [0021]** La Fig. 11 es una ilustración esquemática de un ensayo;
- [0022]** Fig. 12 es una representación gráfica de una dosis respuesta para un ensayo de IL-4 "sin lavado";
- [0023]** La Fig. 13 es una representación gráfica del ensayo de la Fig. 12 con un tiempo de incubación reducido y una detección limitada de partículas;
- [0024]** La Fig. 14 es una representación gráfica del ensayo de la Fig. 12 con un tiempo de incubación reducido y una detección limitada de partículas;
- [0025]** La Fig. 15 es una representación gráfica de un en ensayo optimizado de curva dosis-respuesta para IL-4
- [0026]** La Fig. 16 es una representación gráfica de un espectro Raman realizado sobre fluidos biológicos;
- [0027]** La Fig. 17 es una representación gráfica de resultados de cribado de tampón y marca de identificación.
- [0028]** La Fig. 18 es una representación gráfica de resultados de cribado de tampón y marca de identificación.
- [0029]** La Fig. 19 es una representación gráfica de una curva dosis-respuesta de CRP con marcas de detección DPY;
- [0030]** La Fig. 20 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo multiplexado
- [0031]** La Fig. 21 es una curva dosis-respuesta para CRP;
- [0032]** La Fig. 22 es un diagrama esquemático de un ensayo de hibridación con perlas magnéticas SERS;
- [0033]** La Fig. 23 es una representación gráfica de la detección de ADN; y
- [0034]** La Fig. 24 es una representación gráfica de los resultados de una valoración magnética multiplexada de ADN con SERS.
- [0035]** Las Figs. 25A y 25B son ilustraciones esquemáticas de dos formatos de ensayo competitivo.
- [0036]** La Fig. 26 es un diagrama esquemático de un ensayo de detección de una secuencia de nucleótidos.
- [0037]** La Fig. 27 es una sonda representativa adecuada para su uso en un ensayo de detección de una secuencia de nucleótidos.
- [0038]** La Fig. 28 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo de detección de una secuencia de nucleótidos.
- [0039]** La Fig. 29 es una representación de sondas representativas adecuadas para su uso en un ensayo de detección de una secuencia de nucleótidos.
- [0040]** La Fig. 30 es una representación gráfica de un ensayo de titulación que utiliza las sondas de la Fig. 29;
- [0041]** La Fig. 31 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo para amplicones de PCR seleccionados.
- [0042]** La Fig. 32 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo tras realizar diluciones en serie;
- [0043]** La Fig. 33 es un diagrama esquemático de un ensayo de detección de una secuencia de nucleótidos.
- [0044]** La Fig. 34 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo de la Fig. 33;

[0045] La Fig. 35 es una ilustración esquemática de un ensayo que muestra un corte de nucleótido;

[0046] La Fig. 36 es una ilustración esquemática de un ensayo que muestra RCA.

5 [0047] La Fig. 37 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo de la Fig. 36;

Descripción detallada de la invención

[0048] A. Descripción general de las nanoetiquetas SERS para ensayos biológicos.

10

[0049] Una plataforma de ensayo multiplexado homogéneo está diseñado de forma típica alrededor de un sistema de dos partículas. Una partícula de captura está conjugada con un anticuerpo para capturar el antígeno de interés desde la muestra biológica. La partícula de detección puede ser una nanopartícula de nanoetiqueta SERS tal como se describe a continuación también conjugada con un anticuerpo de unión con afinidad de enlace por el antígeno de interés. La nanoetiqueta SERS incluye una molécula notificadora de Raman tal como se describe a continuación. En presencia del antígeno de interés, tanto la partícula de captura como la partícula de detección están unidas para formar un inmunocomplejo de dos partículas activo en SERS. Las nanoetiquetas SERS ofrecen al menos tres ventajas intrínsecas como etiquetas de detección. (1) Se pueden excitar en el IR cercano, y de este modo, ser compatibles con las medidas de la sangre completa. (2) Las nanoetiquetas SERS resisten el fotoblanqueado lo que permite una mayor potencia del láser y mayores tiempos de adquisición de datos, dando como resultado medidas más sensibles. (3) Existe un número importante de etiquetas, lo que permite ensayos fuertemente multiplexados.

15

20

[0050] Las nanoetiquetas SERS son etiquetas de detección óptica novedosas de tipo nanopartícula que se basan en la dispersión Raman con superficie potenciada (SERS) (Mulvaney y col. (2003) *Langmuir* 19:4784-4790; Natan, Patente de los Estados Unidos nº 6.514.767). Raman scattering (Long (2002) *The Raman Effect; A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester; *Modern Techniques in Raman Spectroscopy* (1996) John Wiley & Sons Ltd, Chichester; *Analytical Applications of Raman Spectroscopy* (1999) Blackwell Science Ltd, Maiden, MA.) SERS es una espectroscopía óptica basada en láser que, para moléculas, genera un aspecto de vibración de tipo huella dactilar con rasgos que son mucho más estrechos que la fluorescencia típica. La dispersión Raman se puede excitar usando luz monocromática en el rojo lejano o el infrarrojo cercano, energías fotónicas que son demasiado bajas para excitar la fluorescencia en muestras biológicas. Puesto que los espectros Raman cubren de forma típica energías de vibración de $300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, podría ser posible medir una docena (o más) de etiquetas de manera simultánea todas con la misma fuente de luz. Sin embargo, los espectros Raman normales son muy débiles, por lo que tienen una utilidad limitada en química bioanalítica. En SERS, las características de rugosidad de las moléculas muy cercana a la escala nanométrica de las superficies de metales nobles (oro, plata, cobre) dan lugar a aumentos de millones a billones [lo que se conoce como factor de potenciación (EF)] (Moskovits (1985) *Rev. Mod. Phys.* 57:783-826; Otto y col. (1992) *J. Phys. Cond. Mat.* 4:1143- 1212; Campion y Kambhampati (1998) *Chem. Soc. Rev.* 27:241-249; Tian y col. (2002) *J. Phys. Chem. B* 106:9463-9483; búsqueda en línea en CAS, abril de 2004). De manera más importante, los SERS también se pueden utilizar para detectar moléculas adsorbidas sobre nanopartículas metálicas individuales (Emory y col. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120:8009-8010; Moyer y col. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122:5409-5410), y se ha utilizado para demostrar la detección de moléculas individuales (Nie y Emory (1997) *Science* 275:1102-1106; Kneipp y col., (1997) *J. Phys. Rev. Lett.* 78:1667-1670; Michaels y col., (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121:9932-9939; Xu y col., (1999) *J. Phys. Rev. Lett.* 83:4357-4360; Goulet y col., (2003) *Anal. Chem.* 75:1918-1923).

45

[0051] En la Fig. 1 se muestra una nanoetiqueta SERS 10 típica. La nanoetiqueta SERS 10 ilustrada incluye un núcleo metálico 12 de la nanopartícula y una carcasa 14 de SiO_2 (vidrio). Se pueden utilizar otros materiales incluyendo pero sin limitación varios tipos de polímeros como encapsulante o carcasa de manera consistente con la presente invención. Los detalles relativos al uso, fabricación y propiedades de una nanoetiqueta SERS típica se incluyen en la patente de los EE.UU. con nº 6.514.767, titulada "Surface Enhanced Spectroscopy-Active Composite Nanoparticles", que se incorpora al presente documento por referencia. Aunque la invención se describe en términos de nanoetiquetas SERS preparadas a partir de núcleos individuales 12 de nanopartículas, se debe entender que los clústeres o agregados de núcleos de nanopartículas se pueden utilizar en la preparación de nanoetiquetas SERS. Los métodos para la preparación de los clústeres de agregados de metales coloidales son conocidos de los expertos en la materia. También se contempla el uso de partículas de tipo sándwich que se describen en la patente de los Estados Unidos nº 6.861.263; dicha patente se incorpora al presente documento por referencia.

55

[0052] El núcleo 12 de la nanopartícula puede ser cualquier material conocido en la técnica por potenciar la técnica Raman. Los núcleos 12 de las nanopartículas pueden ser isotropos o anisotropos. Las nanopartículas anisotropas pueden tener una longitud y una anchura. En algunas realizaciones, la longitud de una nanopartícula anisótropa es la dimensión paralela a la apertura en la que se produjo la nanopartícula. En el caso de nanopartículas anisotropas, en algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro (anchura) de 350 nm o menos. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de 250 nm o menos y, en algunas realizaciones, un diámetro de 100 nm o menos. En

60

algunas realizaciones, la anchura está comprendida entre 15 nm y 300 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene una longitud de aproximadamente 10-350 nm.

[0053] Las nanopartículas adecuadas para ser el núcleo de una nanoetiqueta SERS incluyen metales coloidales, nanobarras huecas o rellenas, nanopartículas paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas, hidrogeles (coloides o barras), y similares. Las nanopartículas utilizadas en la presente invención pueden existir como nanopartículas individuales, o como clústeres o agregados de nanopartículas.

[0054] La persona normalmente experta en la materia apreciará que las nanopartículas pueden existir en variedad de formas, incluyendo pero sin limitación esferoides, varillas, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanoresortes, nanoanillos, nanopartículas en forma de varilla, nanopartículas en forma de flecha, nanopartículas en forma de lágrima, nanopartículas en forma tetraoide, nanopartículas en forma de prisma y una pluralidad de otras formas geométricas y no geométricas. Otra clase de nanopartículas que se ha descrito incluyen las que tienen un área superficial interna. Estas incluyen las partículas huecas y las partículas porosas o semiporosas. Adicionalmente, se entiende que los métodos para preparar partículas de las dichas formas, y en algunos casos para preparar partículas activas en SERS de estas formas, se ha descrito en la bibliografía. Aunque se reconoce la forma de la partícula y la relación de aspecto puede afectar las características físicas, ópticas y electrónicas de las nanopartículas, la forma específica, la relación de aspecto, o la presencia o ausencia de área superficial interna no impide calificar la partícula como una nanopartícula.

[0055] Una nanopartícula incluye también una nanopartícula donde el metal incluye un componente adicional, tal como una partícula de tipo núcleo-carcasa. Por ejemplo, se pueden utilizar partículas con núcleo Ag/carcasa Au, como las descritas en J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 7961, o partículas de núcleo Au/carcasa Ag, o cualquier combinación de núcleo-carcasa que incluya metales activos en SERS. Otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas de tipo núcleo-carcasa incluidas en la presente invención, tales como coloides de sílice/alúmina funcionalizados con nanopartículas de Au o Ag, coloides de TiO₂ funcionalizados con Au o Ag, nanopartículas de Au tapadas con nanopartículas de Au (véase. por ejemplo, Mucic, y col., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 12674), coloides de nanopartículas de TiO₂ tapadas con nanopartículas de Au, partículas que tienen un núcleo de Si con una carcasa metálica ("nanocarcasa") tal como coloides de SiO₂ tapados con plata o coloides de SiO₂ tapados con oro. (Véase, por ejemplo, Jackson, y col., 2004 Proc Natl Acad Sci USA. 101(52):17930-5; Talley, y col., *Nano Letters* (2005)). Las nanopartículas huecas, tales como las nanoesferas huecas y los nanocristales huecos, también se pueden utilizar en las nanoetiquetas SERS.

[0056] Cada nanoetiqueta SERS está codificada con un único indicador 16, que comprende una molécula orgánica o inorgánica en la interfase entre el núcleo de la nanopartícula y la carcasa de vidrio u otro encapsulante adecuado. Este enfoque relativo a las etiquetas de detección aprovecha los puntos fuertes de la dispersión Raman como una herramienta de espectroscopía molecular de alta resolución y las mejoras asociadas con SERS superando los inconvenientes que aparecen cuando se preparan sustratos SERS independientes, tales como una difícil reproducibilidad y una falta de selectividad. Las nanoetiquetas SERS muestran espectros intensos (factores de potenciación que superan 10⁶) para longitudes de onda de excitación de 633 y 785 nm que son excelentes para evitar la fluorescencia del fondo intrínseca de muestras biológicas tales como sangre completa, y en matrices como vidrio y plástico. El revestimiento de vidrio, que es esencialmente inactivo en SERS, estabiliza las partículas contra la agregación, evita que el indicador se difunda hacia el exterior, evita la adsorción competitiva de especies no deseadas, y proporciona una superficie muy bien establecida con las que se pueden conjugar las biomoléculas para el desarrollo del bioensayo (Aslam y Dent (1998) *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences*. Grove's Dictionaries Inc, Nueva York, NY).

[0057] Están disponibles múltiples etiquetas únicas. La Fig. 2 muestra un gráfico 18 de los espectros de cinco etiquetas SERS únicas con rasgos claramente diferenciados, que se pueden utilizar en un ensayo multiplexado. En un ensayo multiplexado, se adquiere un solo espectro, y será necesario separar cuantitativamente dicho espectro en sus componentes. Para realizar la desconvolución y la cuantificación de los componentes individuales, se puede utilizar un paquete informático comercial mejorado para llevar a cabo un análisis lineal por mínimos cuadrados usando como patrón espectros únicos adquiridos de cada etiqueta.

[0058] B. Inmunoensayos de tipo sándwich con anticuerpos de captura en la pared interna de un vial de ensayo.

[0059] Algunas implementaciones de inmunoensayos heterogéneos y homogéneos presentan la derivatización de una pared interna del vial de ensayo con un anticuerpo de captura. Un ensayo con sangre completa o suero puede ser factible con este formato y el exceso de etiquetas "no unidas" se eliminan antes de adquirir el espectro Raman. Se ha demostrado que, con este formato, las etiquetas SERS se pueden leer en presencia de plasma puro o sangre completa, y dicha eliminación del exceso de etiqueta no es necesario si el sistema de detección proporciona una profundidad de campo lo suficientemente estrecha.

[0060] En el Ejemplo 1 siguiente se han preparado ensayos representativos en pared de tubo de ensayo de acuerdo con el método. Otros métodos son igualmente adecuados para preparar o llevar a cabo el ensayo.

[0061] Un ensayo representativo secuencial en pared de tubo de ensayo (heterogéneo) se ilustra esquemáticamente en la Fig. 3. El anticuerpo de captura 30 está unido covalentemente a la parte inferior del recipiente y el anticuerpo de detección 32 está unido covalentemente a la nanoetiqueta SERS 34.

[0062] En el ensayo secuencial, la muestra se añade al vial y se incuba durante 2,5 horas. El analito no unido se elimina por lavado antes de incubación con las nanoetiquetas SERS durante dos horas más. Los espectros Raman, enfocados en la parte inferior del vial, se adquieren antes de la eliminación de las nanoetiquetas SERS no unidas y después de lavar el exceso de nanoetiquetas.

[0063] Este formato de ensayo se utiliza para cribar anticuerpos y seleccionar parejas de anticuerpos. Después de una serie de experimentos de mezclado y emparejamiento, se seleccionó un anticuerpo monoclonal dirigido contra EL-2 como anticuerpo de captura, y se conjugó al vial derivatizado. Como anticuerpo de detección, se seleccionó un anticuerpo policlonal.

[0064] Los gráficos 40 y 42 de la Fig. 4. ilustran la curva patrón obtenida en el formato de ensayo secuencial anteriormente descrito. Los datos adquiridos en 20 lecturas de la muestra de blanco (lavado después de cada etapa, sin analito) proporcionaron un límite de detección de 100 pg/ml.

[0065] Se adquirieron los espectros Raman de cada dosis de IL-4. Los espectros Raman mostrados en la Fig. 4 se redujeron matemáticamente a un número denominado unidad Raman relativa (URR) mediante un método clásico de mínimos cuadrados. Este número, proporcional a la intensidad del pico, se normaliza respecto a un espectro de referencia guardado de la misma nanoetiqueta SERS.

[0066] Un formato de ensayo homogéneo alternativo se ilustra de forma esquemática en la Fig. 5. El conjugado de detección 50 se introduce en el vial antes de añadir la muestra (analito). Después de una hora de incubación, el vial se lee 1) en presencia de etiquetas no unidas, 2) después de la eliminación del sobrenadante (etiquetas no unidas) y de nuevo 3) después de lavar los viales (eliminación de las etiquetas no unidas específicamente).

[0067] El diagrama 60 de la Fig. 6 ilustra la curva dosis-respuesta del ensayo homogéneo de la Fig. 5 antes de eliminar el exceso de etiquetas no unidas. En comparación con el ensayo con lavado secuencial, se observó una señal más alta para IL-4 junto con un intervalo dinámico inferior, lo que indica una contribución de las etiquetas no unidas en disolución. Esta interferencia debida a "etiqueta libre" se atribuye a la profunda intensidad de campo del lector Raman.

[0068] Para demostrar que este elevado fondo se debe a etiquetas libres en disolución, un cubreobjetos de vidrio revestido de polilisina se cargó con etiquetas BPE en submonocapa. Se añadió al cubreobjetos una suspensión de una etiqueta diferente (DPY). Se recogieron los espectros Raman en diferentes intervalos de tiempo, enfocando sobre la superficie del portaobjetos con un objetivo de 50x (profundidad de recogida de ~2 micrómetros; Renishaw Raman Microscope).

[0069] El gráfico 70 de la Fig. 7 ilustra los espectros Raman de la superficie de un cubreobjetos preparado como se ha descrito anteriormente después de 2 minutos (traza 72) y 10 minutos (traza 74) así como el espectro de la suspensión de DPY por encima de la superficie de vidrio (espectro agregado 76 después de 11 minutos). El "espectro a 2 mm de la superficie" es prácticamente un espectro de BPE con poca contribución de las etiquetas DPY. Como se esperaba, la contribución espectral de DPY aumenta con el tiempo a medida que las etiquetas empiezan a unirse a la superficie mediante interacciones iónicas. Los espectros adquiridos de la disolución por encima de la superficie solo revelan la presencia de etiquetas DPY. Esto demuestra que las etiquetas unidas a la superficie se pueden discriminar de las etiquetas en disolución cuando se utiliza un objetivo con una profundidad de campo estrecha. La profundidad de adquisición del lector Raman utilizado para la recogida de datos de la Fig. 4 (realmente 1000 veces más profundo que el 50x) no permite la discriminación entre las etiquetas de la superficie y en disolución, lo que requiere por tanto la eliminación del sobrenadante (y el lavado) antes de adquirir los espectros Raman.

[0070] Cuando el exceso de etiqueta se elimina por lavado, la señal del fondo se reduce de manera importante, como se muestra en el Gráfico 80 de la Fig. 8. Análogamente, se observó que la señal global de los "viales lavados" variaba ampliamente, indicando que el "tampón de lavado" no estaba optimizado. No se realizó esfuerzo alguno para optimizar el tampón de lavado.

[0071] Antes de investigar el efecto de una matriz biológica sobre el rendimiento del ensayo, se demostró que las nanoetiquetas SERS se podían leer en presencia de plasma o sangre. Las Figs. 9A, 9B y 9C describen el efecto de agua y BSA al 1% en PBS (Fig. 9A), plasma completo (Fig. 9B) y una mezcla de plasma y sangre completa (Fig. 9C) sobre la adquisición de una imagen espectral de nanoetiquetas SERS unidas a la pared inferior de viales de vidrio revestidos con polilisina. Debe entenderse en primer lugar que tanto el plasma puro como la sangre completa no tienen

una intensidad de dispersión Raman significativa entre las longitudes de onda de 700 a 1800, salvo una reducción discreta de la intensidad de la dispersión al aumentar el número de onda. Esto se podría atribuir a la absorción de energía de la muestra que da como resultado una reducción de la energía para la excitación de nanoetiquetas. Alternativamente, la matriz biológica podría lavar algunas nanoetiquetas SERS de la superficie el vial.

5

[0072] También se investigó el efecto del plasma y la sangre humanos sobre el rendimiento del ensayo. Concentraciones de plasma o sangre del 30% del volumen total del ensayo afectan negativamente el comportamiento de ensayo proporcionando una intensa señal de fondo con poca o ninguna recuperación del pico enriquecido -tanto antes como después del lavado. El Gráfico 100 de la Fig. 10, sin embargo, muestra la capacidad del ensayo para recuperar el pico enriquecido de IL-4 (50 nm) en sangre completa al 16% o plasma al 16%.

10

Ejemplo 1:

[0073] Método representativo para la preparación de un ensayo que presenta la captura de etiquetas de detección en la pared interna de un vial de ensayo.

15

[0074] Materiales y reactivos

- Las lecturas se realizaron en un dispositivo de detección de espectro Raman comercialmente disponible.
- Dynabeads M-270 Ácido carboxílico, 2,8 μm , n° Pd 143.05, Dynal Biotech (Oslo, Noruega).
- 20 • Las perlas magnéticas modificadas con silicio BcMag, lum, número de catálogo FF-IOI eran de BioClone Inc. (San Diego, CA).
- El anticuerpo monoclonal dirigido contra IL-4 humana (MAB 604) y el anticuerpo policlonal de cabra (AF 204Na) se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN).
- Los anticuerpos contra CRP humanos, clones 265-10032 y 265-10036 se obtuvieron de OEM Concepts
- 25 (Toms River, NJ).
- El anticuerpo de detección se unió covalentemente a nanoetiquetas SERS usando un protocolo normalizado desarrollado en Nanoplex REF.
- APTMS, EDC y el anhídrido succínico se obtuvieron de Sigma.
- (3-Glicidoxipropil)-Trimetoxisilano. United Chemical Technologies.
- 30 • La albúmina de suero bovino era de Pierce.
- Los viales de vidrio, 12x32mm n° de pieza CTV-1002 son de ChromTech, Inc. (MN).

[0075] Tampones

- MES 50 mM, pH 4,5
- 35 • PBS
- Tampón de almacenamiento en partículas magnéticas: PBS al 0,1 % en BSA
- Tampón de ensayo para ensayos en viales: 1% BSA, 0,5% PEG, 0,05% Tween 20, PBS
- Tampón de ensayo para ensayos en perlas magnéticas: 5% BSA, 0,5% PEG, 0,05% Tween 20, PBS
- 40 • Tampones de lavado: 1 % BSA, 0,25% Tween 20, PBS

40

[0076] Métodos y protocolos

[0077] Procedimiento general para la conjugación de anticuerpo a Dynabeads

1. Lavar las 1mg Dynabeads M-270 Ácido carboxílico con 200 μl de MES (dos veces).
- 45 2. Resuspender con 100 μl MES en un tubo Eppendorf (500 μl).
3. Añadir 30 μl de anticuerpo (1mg/ml).
4. Añadir 100 μl de MES al tubo.
5. Mezclar bien e incubar con una rotación con inclinación lenta a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Inmediatamente antes de su uso, disolver EDC en MES 100 mM, pH 5 hasta una concentración de 100
- 50 mg/ml.
7. Añadir 10 μl de disolución de EDC (1 mg) a la suspensión Dynabeads/ligando. Mezclar bien.
8. Incubar durante 2 horas a TA con una rotación con inclinación lenta.
9. Bloquear con 200 μl de etanolamina 50 nM, PBS (3 mg/ml).
10. Incubar durante 0,5 horas a TA con una rotación con inclinación lenta.
- 55 11. Lavar 1x con 300 μl de BSA al 1% en PBS.
12. Bloquear durante toda la noche con BSA al 1% en PBS a 4°C.
13. Lavar 2x con 0,1 de BSA, 0,05 de Tween en PBS.
14. Almacenar el conjugado a 1 mg/ml con BSA al 1% en PBS.

[0078] DERIVATIZACIÓN EN VIAL DE VIDRIO: APTMS

1. Añadir 80 μl de disolución de APTMS al 2%/agua al 2% en EtOH al vial. Solo el volumen suficiente para cubrir la superficie del fondo-vol máx = 80 μl .
2. Hacer reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminar la disolución.

60

4. Añadir EtOH, 500µl y colocar en una placa caliente durante 30 minutos (seleccionar el nivel más bajo).
5. Lavar y enjuagar una vez con EtOH.
6. Lavar 3 veces con agua DI.
7. Almacenar en 200µl de agua.

5

[0079] DERIVATIZACIÓN CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO DE VIALES DERIVATIZADOS CON APTMS

1. Intercambiar el agua de las partículas revestidas con APTMS por tampón borato.
2. Preparar una disolución de anhídrido succínico (40 mg/ml) en DMSO.
3. Añadir 100µl de 40µl de disolución de anhídrido succínico en 1 ml de borato. Incubar a TA durante 30 minutos.
4. Repetir la etapa 3.
5. Lavar 3 veces con agua DI.
6. Almacenar en agua DI a 1 mg/ml.

10

[0080] CONJUGACIÓN DEL ANTICUERPO A ETIQUETAS TIOLADAS-SERS

1. Preparar una disolución de sulfo-SMCC a 1 mg/ml en agua.
2. Añadir 100 µl de sulfo-SMCC por 50 µg de anticuerpo.
3. Vortizar la mezcla y dejar reaccionar durante 30-45 minutos.
4. Purificar la disolución de anticuerpo activada con maleimida usando una columna desaladora con microrevolución Sephadex G25 (Amersham) según las directrices del fabricante.
5. Añadir 100 µl de PBS de etiquetas tioladas (4×10^{11} partículas en 1 ml de agua) para dar una disolución 1 mM en PBS.
6. Añadir la proteína purificada activada con maleimida a la disolución. Mezclar bien y dejar reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Las partículas se pueden agitar suavemente, o vortizar ocasionalmente para facilitar la reacción.
7. Preparar una disolución de 10 mg/ml de MESA en agua. Añadir 50 µL a las etiquetas y dejar reaccionar durante 20-30 minutos.
8. Añadir 25 µl de una disolución de BSA al 5% a las etiquetas, y centrifugar para purificar. Rotar a -1500 RCF (3800 RPM en una microcentrífuga Jouan 14) durante 12 minutos.
9. Resuspender las partículas en 1 ml de 0,1x PBS + 25 µL de BSA al 5%. Centrifugar de nuevo Repetir una o dos veces más (para un total de 3 o 4 etapas de centrifugación).
10. Resuspender las partículas a la concentración deseada en el tampón deseado que contiene BSA al 0,1%.

15

20

25

30

[0081] CONJUGACIÓN DEL ANTICUERPO A APTMS Y CARBOXI-APTMS VIALES REVESTIDOS

1. Tomar 10µl de disolución madre de anticuerpo y diluir en 1ml PBS - La conjugación al vial se realizará a 10µg/ml.
2. Añadir 100µl a los viales.
3. Incubar durante 30 minutos.
4. Preparar una disolución de EDC (1M, 200 mg/ml DMSO).
5. Añadir 1µl de disolución de EDC a los viales que contienen Abs.
6. Almacenar a 4°C durante toda la noche.
7. Añadir 100µl (PBS, BSA 1%) - Bloqueo.
8. Agitar en un agitador orbital durante 1 hora.
9. Lavar con 3x200µl de BSA al 0,1% en PBS.

35

40

45

[0082] PROCEDIMIENTO DE ENSAYO SECUENCIAL DE IL-4 - ENSAYO EN VIAL

1. Diluir la IL-4 con una disolución de BSA al 0,1% en PBS - disolución madre de IL-4 a 100 ng/ml.
2. Añadir 100µl a los viales relevantes.
3. Incubar en un agitador de placas durante 2,5 horas a TA.
4. Aspirar las disoluciones.
5. Lavar 3x200µl con BSA al 0,05 en PBS, 0,25% de Tween.
6. Diluir 10x el conjugado IL4-SERS a las concentraciones adecuadas.
7. Añadir 100µl a los viales relevantes.
8. Incubar durante 2 horas en un agitador de placas.
9. Aspirar y leer en un lector Ocean Optics.

50

55

[0083] PROCEDIMIENTO DE ENSAYO HOMOGÉNEO DE IL-4 - VIAL

1. Diluir 10x el conjugado IL4-SERS a las concentraciones adecuadas con BSA al 0,1% en PBS.
2. Añadir 100µl a los viales relevantes.
3. Añadir 100µl de muestra - tampón de reacción, plasma o sangre.
4. Diluir la IL-4 en BSA al 0,1% en PBS.
5. Añadir 100µl a los viales relevantes.
6. Incubar en un agitador de placas durante 1 hora a TA.
7. Eliminar la disolución.
8. Leer el espectro en un lector Ocean Optics.

60

9. De forma opcional: Lavar 3x200µl con BSA al 0,05 en PBS, 0,25% de Tween.
10. Leer el espectro en un lector Ocean Optics.

[0084] C. Inmunoensayos en sándwich usando partículas de captura magnética

5
[0085] Algunas realizaciones de los inmunoensayos heterogéneos y homogéneos consistentes con la presente invención presentan el uso de partículas de captura magnética. Las propiedades combinadas de las partículas de captura magnética junto con las partículas de detección con nanoetiquetas SERS dan como resultado una plataforma bioanalítica que evita el uso de robótica, preparaciones y separaciones analíticas extensas o complejas, permitiendo al mismo tiempo medidas de proteínas simples, cuantitativas, rápidas (en tiempo real) y multiplexadas. La Fig. 11 ilustra de forma esquemática un formato de ensayo. Un anticuerpo de captura 100 está unido covalentemente a una partícula magnética 102 y el anticuerpo de detección 104 está unido covalentemente a la nanoetiqueta SERS 106. Tanto la partícula de captura como la partícula de detección se han introducido en un recipiente, por ejemplo un tubo de polipropileno (prediluidas con el tampón de dilución adecuado) seguido por la muestra. Un antígeno asociado con una sustancia química, proteína, o sustancia de interés 108 ocasiona la formación de un inmunocomplejo de dos partículas por unión de las partículas de captura y de detección. Después de la incubación, por ejemplo un mezclador rotatorio sin fin, el tubo se coloca en un concentrador de partículas magnéticas para extraer el inmunocomplejo de dos partículas junto con las partículas magnéticas libres del fondo del tubo. A continuación, el tubo se coloca en el lector SERS y el láser se enfoca en las partículas magnéticas antes de registrar el espectro Raman de las moléculas indicadoras asociadas a las nanoetiquetas SERS. De acuerdo con ello, un aspecto de la presente invención se implementa con partículas magnéticas no para separar y lavar en etapas discretas, sino para concentrar los analitos capturados y las partículas de detección complejadas en ubicaciones específicas dentro del recipiente de reacción aún en presencia de la matriz de muestra y del exceso de las partículas de detección. Un ensayo implementado con partículas magnéticas y nanoetiquetas SERS puede ser especialmente útil para detectar proteínas en sangre completa o suero. Los ejemplos que demuestran variaciones de la preparación y el uso de este ensayo en plataforma bioanalítica se describen en las siguientes secciones.

[0086] Se han preparado ensayos representativos con partículas de captura magnética de acuerdo con el método detallado en el Ejemplo 2 siguiente. Otros métodos son igualmente adecuados para preparar o llevar a cabo un ensayo consistente con este aspecto de la presente invención.

[0087] De acuerdo con el método del Ejemplo 2, tanto las partículas de captura como las partículas de detección se cargan en un tubo de polipropileno (prediluidas con el tampón de dilución adecuado) seguido por la muestra. Después de la incubación en un mezclador rotatorio sin fin, el tubo se coloca en un concentrador de partículas magnéticas para extraer las partículas magnéticas libres del fondo del tubo. A continuación, el tubo se coloca en el lector SERS y el láser se enfoca en las partículas magnéticas antes de registrar el espectro Raman.

[0088] Se ha preparado un inmunoensayo sin lavado (homogéneo) de tipo sándwich para la proteína C reactiva usando una partícula magnética derivatizada con el anticuerpo de captura y un anticuerpo detector conjugado a nanoetiquetas SERS como el indicador tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados indican que el complejo de dos partículas se puede analizar en presencia de matrices biológicas, sin lavado, y usando sistemas de detección de bajo coste.

[0089] Los resultados de un ensayo de IL-4 basado en perlas revestidas de vidrio magnético se ilustran mediante la curva dosis-respuesta 120 de la Fig. 12. Estos resultados preliminares con IL-4 se obtuvieron con una elevada concentración de partículas y con un tiempo de incubación relativamente prolongado de 1 hora. Preferiblemente, la sensibilidad del ensayo de IL-4 se puede optimizar dando como resultado una reducción del tiempo de incubación a 30 minutos o sustancialmente menos. Como se muestra en el Gráfico 130 de la Fig. 13, una reducción en el tiempo de incubación a 30 minutos y una reducción de 10 veces en la detección de partículas no afectó negativamente al comportamiento del ensayo, salvo en lo que respecta a la amplitud de la señal y la variación esperada en el intervalo dinámico de la prueba. Una reducción adicional de dos veces en la detección de partículas da como resultado un intervalo de sensibilidad para el ensayo de un femtogramo por ml como se muestra en el Gráfico 140 de la Fig. 14. En el ejemplo de la Fig. 14, la señal no específica disminuye al disminuir el número de partículas pero de acuerdo con ello, la intensidad global de la señal también se reduce. Sin embargo, estos resultados muestran que la sensibilidad del ensayo en la proximidad de 100 femtogramos es factible.

[0090] En ensayo anteriormente descrito en una etapa y 30 minutos de duración sin lavado compara la sensibilidad (~100 fg/ml) de los ensayos comercialmente disponibles usando los mismos anticuerpos pero que necesitan múltiples etapas que requieren un día completo incluyendo múltiples etapas de lavado y un volumen de muestra de 200 µl.

[0091] Numerosos factores pueden afectar la sensibilidad del ensayo, entre los que se incluyen pero sin limitación:

- Revestimiento biocompatible sobre la superficie de las partículas de captura y detección,
- Cantidad de anticuerpo conjugado a la partícula,
- Composición del tampón de ensayo,

- Concentración de las partículas de captura y detección, y
- Sensibilidad del lector

Algunos de estos factores, y la optimización de estos factores, se describen detalladamente a continuación.

5 **[0092]** Revestimiento biocompatible:

[0093] La reducción de la interacción no específica entre partículas se puede conseguir con una elección razonada de revestimientos biocompatibles que se selecciona habitualmente entre polímeros naturales o sintéticos de diferentes longitudes, cargas y polaridades.

10

[0094] Concentración de anticuerpo en las nanoetiquetas SERS

[0095] Se preparó un conjunto de conjugados de anticuerpo con nanoetiquetas SERS usando 10 y menos de 100 veces de anticuerpo durante el procedimiento de conjugación. Los conjugados resultantes se ensayaron y se comparan con los concentrados sin la concentración reducida. Ninguno de los conjugados mostró actividad, muy probablemente porque debido a la reducción global de la concentración de detección del anticuerpo en el sistema. Sin embargo, la cantidad mínima de anticuerpo adecuada para preparar un ensayo eficaz no se ha determinado aún.

15

[0096] Composición del tampón de ensayo:

[0097] La composición del tampón y los aditivos del tampón pueden tener un efecto importante sobre el rendimiento del ensayo. Se han investigado varias calidades de bloqueantes del ensayo. Un tampón de ensayo preferido para el ensayo CRP contiene BSA al 5%, PEG al 0,05%, Tween 20 al 0,05% en PBS. Para un ensayo de IL-4, es adecuada una disolución de BSA al 1% en PBS.

20

25 **[0098]** Concentración de las partículas de captura y detección:

[0099] Se han llevado a cabo experimentos de matriz multidimensional que investigaron principalmente el efecto de la concentración de las partículas de captura y detección sobre el rendimiento del ensayo. El Gráfico 150 de la Fig. 15 ilustra la mejor curva dosis-respuesta obtenida durante este procedimiento de optimización. A resaltar que la concentración de reactivo se ha reducido adicionalmente comparada con el experimento descrito en la Fig. 14 y que el intervalo dinámico del ensayo se ha reducido de acuerdo con ello. El resultado del ensayo de la Fig. 15 es un buen ejemplo de "ensayo sin lavado" comparado con los productos comercialmente disponibles y muestra que una sensibilidad de 10 femtogramos/ml es factible.

30

[0100] La sensibilidad del ensayo se puede definir como el límite de detección calculada a partir del valor medio más dos desviaciones estándar de 18 réplicas de un calibrador cero (blanco). Alternativamente, se pueden analizar 6 "calibradores cero" en paralelo con el control adecuado de tiempo. La siguiente Tabla 1 proporciona la señal no específica (obtenida a partir de múltiples medidas de 6 réplicas de un "blanco" o "calibrador cero". Se determinó un coeficiente de varianza (cv) de ~31%, que es consistente con la variabilidad promedio de la señal no específica observada de forma regular en ciclos de experimentos independientes.

35

40

[0101] Tabla 1: Intensidad relativa (en unidades arbitrarias) de 6 réplicas de una muestra "blanco" (mínimo de 3 mediciones para cada muestra).

Réplica	1	2	3	4	5	6
Medida 1	98	284	361	254	303	304
Medida 2	95	249	267	295	294	307
Medida 3	128	267	360	251	311	338
Medida 4	121				315	340
Medida 5					309	

45

Promedio 266
Desv. est. 81
CV 0,31

[0102] Este coeficiente de varianza relativamente elevado mostrado en la Tabla 1 indica que es deseable un mayor control suficiente de la interacción no específica entre las dos partículas, aunque la reducción de sus cantidades aparentemente minimiza la señal global debida a la unión no específica.

50

[0103] Suponiendo que este cv se aplicara a todos los análisis, se puede determinar un límite de detección inferior a 500 femtogramos/ml para la mayoría de las curvas dosis-respuesta. Aquí, se estimó el límite de detección para el valor promedio más 3 desviaciones estándar del calibrador cero (blanco) ya que se utilizaron 6 réplicas en lugar de 18 para realizar la determinación.

[0104] Como se describe más detalladamente a continuación, se puede llevar a cabo un ensayo de IL-4 en presencia de una matriz biológica (por ejemplo, se puede recuperar un enriquecimiento en IL-4 de nivel intermedio del 15% al 30% de sangre completa o suero) sin optimización adicional. Como se ilustra en el Gráfico 160 de la Fig. 16, las etiquetas SERS que forman complejos inmunes con partículas de captura magnética se pueden detectar tanto en suero como en sangre completa. El resultado "15% en suero - sin enriquecimiento" dio como resultado la misma señal que 500 fg de IL-4, proporcionando una concentración de aproximadamente 10 pg/ml de IL-4 en la muestra de suero (~500 fg en 50µl de suero). La recuperación de la IL-4 enriquecida a (5 pg/ml) es muy baja, y la concentración creciente de la muestra se redujo drásticamente en la señal específica y no específica. La mejor recuperación (~32%) se obtuvo con la muestra "15% en suero".

[0105] Los ensayos preparados con partículas de captura magnética y partículas de detección con nanoetiquetas SERS están especialmente bien adecuados para la realización de estudios multiplexados. Para analizar una curva dosis-respuesta multiplexada para la combinación de IL-4 y CRP, se deben preparar etiquetas de detección únicas para cada analito. Además, los 2 ensayos deben funcionar en el mismo tampón (condiciones de ensayo armonizadas). Se preparó un ensayo de ejemplo con una primera nanoetiqueta SERS de BPE. DPY se seleccionó como segunda etiqueta y se conjugaron anticuerpos de detección tanto para IL-4 como para CRP para ambas etiquetas. Además, se deben identificar las condiciones de tampón armonizadas necesarias, ya que el tampón de ensayo preferido para CRP es PBS que contiene BSA al 5%, PEG al 0,05%, Tween 20 al 0,05%, mientras que para IL-4, el tampón preferido es BSA al 1% en PBS.

[0106] El Gráfico 170 de la Fig. 17 resume los resultados de la etiqueta de detección y de cribado de tampón para la parte de IL-4 de un ensayo multiplexado y confirma que BPE y BSA al 1% son las condiciones de elección para este ensayo. La diferencia en la intensidad de la señal entre 50 pg/ml y ausencia de IL-4 es la mayor para la etiqueta BPE en BSA al 1%. El conjugado de etiqueta DPY no proporcionó una señal positiva suficiente en BSA al 5% (PBS que contenía BSA al 5%, PEG al 0,05%, Tween 20 al 0,05%).

[0107] El Gráfico 180 de la Fig. 18 resume los resultados de la etiqueta de detección y de cribado de tampón para la parte de CRP de un ensayo multiplexado, tanto la etiqueta de detección como el tampón de ensayo funcionaron razonablemente bien, siendo las mejores condiciones la etiqueta BPE en BSA al 5%. Un ensayo multiplexado adecuado puede estar basado en la etiqueta BPE para IL-4 y BSA al 1% como la elección preferida para el tampón. De acuerdo con ello, la etiqueta DPY se puede seleccionar para CRP. Como se muestra en el Gráfico 190 de la Fig. 19, la parte CRP del ensayo sigue estando operativa en estas condiciones alejadas de las ideales. El Gráfico 200 de la Fig. 20 muestra las intensidades de la señal de los controles positivos y negativos (monoplexado) tanto de CRP como de IL-4, seguido del experimento multiplexado (doble negativo y doble positivo). Se observó una reducción en la intensidad de la señal n 3 de 4 señales del ensayo en el ensayo múltiple. Solamente la intensidad de la señal de IL-4 (0) siguió siendo similar a la mostrada en el ensayo monoplexado. Sin embargo, la recuperación de una lectura positiva siguió siendo la misma para el ensayo CRP (diferencia de ~400 unidades en el ensayo tanto monoplexado como multiplexado), aunque quedó fuertemente suprimida en el caso de IL-4. Esto indica interferencia intraensayo. Por ejemplo, la presencia de un exceso de complejos basados en CRP podría evitar una lectura precisa de un número más pequeño de complejos específicos de IL-4. Es necesario realizar investigaciones adicionales para comprender y resolver el motivo subyacente a la supresión de la señal y la baja recuperación del enriquecimiento en IL-4.

Ejemplo 2:

[0108] El siguiente ejemplo de ensayos preparados con partículas de captura magnética se proporcionan solamente a fines ilustrativos y no están previstos que limiten el alcance de la invención. El solicitante ha realizado experimentos sobre un ensayo tal como el representado en la Fig. 11.

[0109] *1. Conjugación de anticuerpo a nanoetiquetas SERS tioladas*

[0110] Una disolución de sulfo-SMCC (100 µL, 1 mg/ml en agua) se añadió a una disolución de anticuerpo (50 µg, 50µl) en PBS. Después de 30 minutos, el anticuerpo activado con maleimida se purificó usando una columna desaladora Sephadex G258 de microgiro (Amersham). El conjugado purificado se añadió a continuación a nanoetiquetas SERS tioladas (4×10^{10} partículas en 100µl de PBS). Después de 2 horas a temperatura ambiente, la reacción se inactivó durante 30 min con una disolución de MESA (50µl, 10 mg/ml) seguido por una disolución de BSA al 5% (25µl). Los conjugados de la etiqueta se lavaron, se purificaron por centrifugación, y se volvieron a suspender en BSA al 0,1% a la concentración deseada en el tampón deseado

[0111] *2. Carboxilación de perlas revestidas con vidrio magnético*

[0112] Perlas revestidas con vidrio magnético de Bioclone (4 mg) se lavaron dos veces con etanol (1 ml) antes de su tratamiento con una disolución de APTMS (3-aminopropiltrimetoxisilano) al 2% en etanol (1 ml) durante 30 min a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron con extracción magnética y se trataron con etanol (500µl) en una placa

caliente (50C) durante 30 minutos. Tras lavado con etanol y agua (3 veces), las partículas magnéticas se almacenaron en agua a 4 mg/ml. La carboxilación se realizó en tampón borato por tratamiento con una disolución de anhídrido succínico en DMSO (20µl, 40mg/ml) en DMSO durante 30 min. Las perlas carboxiladas se lavaron y almacenaron en agua.

5

[0113] 3. Procedimiento general para conjugación de anticuerpo a perlas revestidas con vidrio magnético carboxiladas y Dynabeads

[0114] Perlas revestidas con vidrio magnético carboxiladas o Dynabeads M-270 ácido carboxílico (1 mg) en PBS (100 µl) se trataron con anticuerpo (30µl, 1 mg/ml) durante 30 minutos antes de añadir una disolución de EDC (10 µl, 1 mg). La mezcla se incubó con una rotación lenta con inclinación a temperatura ambiente durante 2 horas antes de bloquear durante 0,5 con etanolamina en PBS (200µl, 3 mg/ml). A continuación, el conjugado se lavó y se volvió a bloquear durante la noche con una disolución de BSA al 1% en PBS y se almacenó en el mismo tampón a 4C.

15 **[0115]** 4. Ensayo homogéneo basado en perlas magnéticas para la proteína C reactiva (CRP)

[0116] Un tubo Eppendorf (polipropileno, 500µl) se cargó secuencialmente con los siguientes reactivos

- 20 A. 10 µl de conjugado de perlas de vidrio magnéticas con anti-DRP (10 ug de perlas)
 B. 100 µl de tampón (PBS, BSA al 1%)
 C. 100 µl de conjugado anti-CRP-SERS en PBS, BSA al 1%
 C. 100 µl de disolución de analito (PBS, BSA al 1%)

[0117] La mezcla se incubó a temperatura ambiente por mezcla suave durante 30 min en un mezclador rotatorio. Las partículas magnéticas se arrastraron al fondo del tubo con un concentrador de partículas magnéticas. Los tubos se colocaron en el lector Raman y se ajustó a la posición del fondo del tubo (es decir, las perlas magnéticas) en el plano focal del sistema de detección óptico. Tras un tiempo de lectura, los datos adquiridos se redujeron con un programa informático patentado que permite la determinación de la concentración de analito.

[0118] Los datos se recogieron usando partículas magnéticas de vidrio revestido de 1 µm de Dynal, y nanoetiquetas SERS bis(4-piridil)etileno (BPE) SERS para detectar CRP en el tampón. Los espectros Raman se recogieron en un instrumento Inspector Raman de Delta Nu Corporation. El sistema Inspector Raman utiliza una excitación laser de 40 mW y 785 nm laser, óptica de espacio libre, es portátil y se puede conectar a un ordenador portátil. Los datos se analizaron con un programa informático que realizaba un ajuste de mínimos cuadrados del espectro para cuantificar componentes en mezclas complejas. El Gráfico 210 de la Fig. 21 muestra una curva dosis-respuesta para CRP, una diana biológicamente relevante para diagnóstico de enfermedades inflamatorias y cardiovasculares. Este ensayo es, por tanto, un ensayo homogéneo de una sola etapa sin procedimiento de lavado realizado en aproximadamente 25 minutos. La observación de que la respuesta de SERS a 1 µg/ml de CRP era inferior que la respuesta a 100 ng/ml se atribuye a la prozona o "efecto gancho", donde el exceso de analito satura los sitios tanto del anticuerpo de captura como del anticuerpo de detección, prohibiendo de este modo la formación del sándwich inmune.

40

[0119] La dosis-respuesta en tampón anteriormente descrito se repitió varias veces con buena reproducibilidad del ensayo según la desviación estándar dada con un coeficiente de variación (cv) inferior al 15% por lectura del mismo tubo realizada por triplicado. El blanco se leyó 20 veces para obtener un cv del 20% y un límite de detección intraensayo de 200 pg/ml. El límite de detección es más de 500 veces inferior a la concentración media fisiológica normal de CRP humana (100 mg/ml).

[0120] Las nanoetiquetas SERS se pueden leer en un fondo de matriz biológica, como plasma o sangre. La Fig. 9C muestra el espectro de SERS de una mezcla 70:30 de sangre completa y plasma en un vial de vidrio. Es importante resaltar que tanto el plasma neto como la sangre completa no muestran una intensidad de dispersión Raman significativa para números de onda comprendidos entre 700 y 1800. La traza superior 90 de la Fig. 9A muestra el mismo espectro cuando las nanoetiquetas SERS se añaden al mismo cóctel biológico. Esto ilustra la factibilidad de leer las nanoetiquetas SERS con relaciones adecuadas entre señal y ruido en matrices biológicas.

[0121] No todos los anticuerpos conjugados siguen siendo activos y no todas las partículas permanecen en un estado coloidal estable después de la conjugación. Se pueden investigar múltiples químicas de unión, múltiples tipos de partículas magnéticas (que se diferencian en tamaño, composición y funcionalidad superficial), múltiples funcionalidades de etiquetas SERS y múltiples anticuerpos para cada analito.

[0122] Es importante desarrollar métodos robustos y controlables de bioconjugación tanto con la partícula de captura como con la partícula de detección. Puesto que las nanoetiquetas SERS adecuadas y las partículas magnéticas se pueden encapsular en vidrio, puede ser posible utilizar las mismas químicas de bioconjugación. Los grupos silanol superficiales se pueden derivatizar fácilmente con carboxisilanos, mercaptosilanos y aldehído-silanos comercialmente disponibles que permiten explorar muchas oportunidades de optimización. El protocolo preferido para la modificación superficial se basa en nanoetiquetas SERS tioladas. Las funcionalidades carboxilato, amina y aldehído

pueden proporcionar intermedios más estables. Se pueden investigar diferentes químicas de unión (que corresponden a condiciones de reacción diferentes). Esto debe incluir los requisitos del tampón (Pi) para la mayoría de moléculas biológicas y evitar la posibilidad de agregación y desnaturalización durante la conjugación, como se muestra en la Tabla 2 (Kricka (2005) Microchips, microarrays, biochips and nanochips - personal laboratories for the 21st century.

- 5 <http://www.ifcc.org/ejifcc/voll2no4/voll2no4a2.htm>; MacBeath y Schreiber (2000) *Science* 289:1760-1763; Kusnezow y Hoheisel (2003) *J. Molecular Recognition* 16:165-176; Nemez y col. (2001) *J. Immunol. Methods* 255(149-157). Por ejemplo, la aminación reductora ofrece algunas ventajas, ya que funciona para un intervalo de pH más amplio que la reacción de la carbodiimida (EDC) y, por tanto, el pH se puede controlar y adaptar a los requisitos de estabilidad del anticuerpo/tampón (Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press). La precipitación del anticuerpo o la agregación de partículas se pueden evitar de esta forma. Es otra ventaja que, como el enlace amina es más estable que el enlace amida, la carga global del anticuerpo permanece tras la aminación reductiva y no aparece reticulación del anticuerpo, como se observa tan frecuentemente durante la reacción con carbodiimida.

[0123] Tabla 2 Lista de funcionalización de la superficie y químicas de conjugación.

15

Funcionalidad de la partícula	Química de conjugación	Condición, pH
Carboxilato	EDC	5-7
Tiol	Maleimida	7-8
Aldehído	Aminación reductiva	7-10

- [0124]** La variable principal en este punto es la eliminación de la unión no específica (UNE) y también comprender la interacción entre la partícula magnética y la nanoetiqueta SERS. Se debe investigar el nivel en el que los diferentes protocolos de conjugación, y la cubierta superficial, afectan a la UNE. Se debe investigar el uso de agentes bloqueantes y tampones normalizados (por ejemplo, BSA, Tween, y caseína, además de diferentes pH y tampones). El tiempo de reacción y concentración de partículas es también fundamental. Será importante que las partículas no se agreguen de forma no específica. Se espera que la unión no específica se minimice cuando la partícula magnética y la nanoetiqueta SERS tengan las mismas propiedades superficiales. Si la UNE se demuestra insuperable, se investigará la derivatización basada en polímeros de la carcasa de vidrio de la nanoetiqueta SERS, tal como con poli(acrilamida, polietilenglicol y similares (Lee y col., (2002) *Bioconj. Chem.* 13:97-103) y dendrímeros (Le Berre y col., (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:e88). todos conocidos por tener una UNE baja. Se pueden seleccionar protocolos optimizados de biofuncionalización de las nanoetiquetas SERS y las partículas magnéticas por evaluación de su rendimiento de emparejamiento; sensibilidad de determinación, intervalo dinámico y especificidad en tampón.

- [0125]** Como partículas de captura se pueden utilizar partículas superparamagnéticas revestidas de vidrio. También se pueden tener en cuenta otras partículas habitualmente utilizadas para la separación magnética en biología molecular y fácilmente disponibles de empresas tales como Dynal, Bangs Laboratories, CPG Inc., y PerSeptive Biosystems. Estas partículas típicamente magnetizables se han utilizado en gran medida en inmunoensayos enzimáticos (8) y para otros ensayos de unión en una amplia gama de tamaños (de 50 nm a varios micrómetros). Una partícula magnética de 2,8 micrómetros revestida de poliestireno carboxilado de Dynal se comparó con una partícula magnética de 1 micrómetro revestida de vidrio procedente de Bioclone (Bioclone Magnetic Particles (2005) <http://www.bioclon.com/functional-magnetic-paramagnetic-NH2-COOH-silica-epoxy-IDA-beads.html>) y se ha descubierto que la partícula revestida de vidrio menos porosa produjo una interacción no específica menor de las nanoetiquetas SERS en los datos de dosis-respuesta para CRP. Las partículas se pueden obtener con diferentes grupos funcionales superficiales tales como amina, carboxi, aldehído, epoxi, sílice, hidrazida, y otros que se han utilizado para la unión estable y covalente de anticuerpos.

- 45 **[0126]** Nanoetiquetas SERS espectralmente diferentes se fabrican de forma muy reproducible (los ejemplos se ilustran en la Fig. 2). Se podrán conseguir mejores límites de detección con partículas futuras que sean más brillantes y tengan una intensidad uniforme.

- [0127]** Los datos descritos anteriormente se obtuvieron en un tubo eppendorf hecho de polipropileno. Una ventaja importante del análisis Raman es que muchos materiales de recipientes de ensayo utilizados en la comunidad de bioensayo son transparentes para la luz dispersada Raman, y que la señal de fondo Raman de estos materiales es por lo general mínima. Los muchos formatos de ensayo propuestos no están limitados por la naturaleza del recipiente de ensayo (como es en muchos casos con la fluorescencia) sino lo que es más importante, la señal SERS se puede leer a través del material de la pared de muchos recipientes de reacción. La única limitación es que la pared del recipiente no interfiera/absorba la energía de la luz láser (de forma típica 650 o 783 nm). Una amplia variedad de recipientes de ensayo baratos y de uso habitual, incluyendo placas de 96 pocillos, tubos, viales, vacutainers y copas son adecuados para los ensayos descritos. Los siguientes tipos de materiales: vidrio, sílice, silicona, vidrio silanizado, polipropileno, polietileno, poliuretano, Teflón, poliestireno, nitrocelulosa, celulosa, poliéster, y policarbonato pueden ser adecuados para su uso en los recipientes de ensayo.

60

[0128] D. Hibridación de SERS / perlas magnéticas y ensayo con ADN.

[0129] Las nanoetiquetas SERS y las perlas magnéticas se pueden hibridar para funcionar como un ensayo de ADN SERS magnético. La Fig. 22 es un diagrama esquemático que ilustra un método de hibridación de perlas magnéticas SERS. Las esferas más claras 2200 y las esferas más oscuras 2202 representan perlas magnéticas revestidas de vidrio, con superficies de carboxilo. Dos poblaciones de perlas se conjugan con dos secuencias de oligonucleótidos diferentes 2204 y 2206 usando química EDC convencional. Cada población se hibrida por separado con una secuencia de oligonucleótido 2207 complementaria/no complementaria que contiene una porción de biotina 2208. Por tanto, no se realiza un multiplexado auténtico en este punto, en su lugar, cada secuencia se ejecuta en un tubo eppendorf independiente. El procedimiento descrito se puede aplicar a la hibridación de perlas para un ensayo multiplexado, igualmente. Una nanoetiqueta SERS 2210 conjugada con estreptavidina se añade a la reacción, y se utiliza un campo magnético para aislar el aglomerado. En los experimentos iniciales, el aglomerado se leyó con un lector Raman 2212 tal como un microscopio Raman Renishaw InVia. Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo Raman menos caro o portátil. Un ensayo representativo se describe en el Ejemplo 3 siguiente. Otros métodos son igualmente adecuados para preparar o llevar a cabo un ensayo consistente con este aspecto de la presente invención.

[0130] Una ventaja de la solución de hibridación de biotina:estreptavidina es que la secuencia diana que se interroga no tiene que estar marcada con una etiqueta SERS sino que en su lugar, puede estar etiquetada con biotina. Sin embargo, la multiplexación es difícil. Puede ser deseable utilizar una unión de tres piezas para permitir el multiplexado. De manera alternativa, el orden de conjugación se puede invertir, donde las secuencias originales se unen en primer lugar a diferentes "aromas" de nanoetiquetas SERS, seguido por revestimiento con estreptavidina de las partículas magnéticas.

[0131] El Gráfico 2300 de la Fig. 23 ilustra la detección del ADN mutante de p53 con un sistema de perla magnética SERS como se ha descrito anteriormente. El ensayo de las Figs. 22 y 23 es un ensayo no optimizado. Se diseñaron dos variantes de una secuencia de oligonucleótido seleccionada del mutante L344P del gen p53 y se denominaron N30A y N30B. La secuencia diana de las variantes N30A y N30B son las siguientes:

[0132] Tabla 3

Nombre del oligo	Diseño	Natural/Mutante	Cambio en codones	Secuencia	Tm
N30A	sonda	p53 L344P	CTG-CCG Leu-Pro	amina-C12-TTTTTTTTTTTTTTTTTT	70
N30A-T	diana			5' biotina CTCATTTCAGCTCTCGG	70
N30B	sonda	p53 L344P	CTG-CCG Leu-Pro	amina-C12-1 TTTTTTTTTTTTTTTTTT	72
N30B-T	diana			5' biotina CTCATTTCAGCTCTCGG	72

[0133] En el tubo 1, la diana N30A se añadió a perlas magnéticas conjugadas con una secuencia de N30A (mostrada a la izquierda de los resultados designados como N30A en la Fig. 23), y en el tubo 2, la diana N30A se añadió a perlas magnéticas conjugadas con una secuencia N30B (mostrada a la derecha). Se observó una señal significativa solamente cuando N30A y la diana de N30A estaban ambas presentes, como menos señal procedente de la secuencia N30B no complementaria. En el tubo 3, la diana N30B se añadió a perlas magnéticas conjugadas con una secuencia de N30A (mostrada a la izquierda de los resultados designados como N30B en la Fig. 23), y en el tubo 4, la diana N30B se añadió a perlas magnéticas conjugadas con una secuencia N30B (mostrada a la derecha). Se observó una señal significativa solamente cuando N30B y la diana de N30B estaban ambas presentes, como menos señal procedente de la secuencia N30A no complementaria. Se llevó a cabo un experimento de control (terceras dos barras del gráfico 2300) en el que no se añadió diana, como se puede inferir de la baja señal observada.

[0134] El Gráfico 2400 de la Fig. 24 ilustra gráficamente los resultados de una valoración de un ensayo magnético de ADN SERS como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo una titulación del oligonucleótido N30A diana dopado en las perlas magnéticas conjugadas a N30A para determinar los límites de detección potenciales

Ejemplo 3:

[0135] Hibridación de SERS / perlas magnéticas y ensayo con ADN.

[0136] CONJUGACIÓN

1. Tomar 40 ul de perlas magnéticas (8×10^7). Lavar las perlas con MES 50 mM (pH 4,5) dos veces
2. Resuspender las perlas con 163 ul de MES 50 mM (pH 4,5) y añadir 2 ul de oligo 50 uM (100 pmoles). Poner sobre hielo.
3. Preparar EDC al 20% en MES 50 mM (pH 7,0) (10 mg de EDC en 50 ul de MES).
4. Añadir 15 ul de EDC al 20% a la perlas/oligo. Mezclar bien y agitar durante 1 h a 4C

5. Lavar con 500 ul de PBS 100 mM cuatro veces. Es muy importante eliminar por lavado todo el oligo no conjugado.
6. Resuspender en 40 ul de PBS (perlas 8×10^7)

5 **[0137] HIBRIDACIÓN**

7. Tomar 33 ul de tampón 2xTMAC, añadir 5 ul de oligo 10 uM y 5 ul de sonda de perlas magnéticas (4×10^6) Hibridación a 55C durante 1 h
8. Lavar con 1X de SSC a temperatura ambiente durante 5 min y 0. 1X SSC a 55C durante 5 min.
9. Añadir NeutrAvidin -BPE (etiqueta SERS) e incubar durante 30 min.
- 10 10. Lavar con 10 mM de PBS dos veces
11. Adquirir la señal Raman mediante el microscopio Reinshaw InVia Raman

[0138] E. Ensayo competitivo SERS/perlas magnéticas.

- 15 **[0139]** También se realizó un ensayo competitivo homogéneo de dos partículas. Consistente con la presente también se puede implementar con el uso de partículas de detección de nanoetiquetas SERS y una partícula de captura independiente. Algunas ventajas descritas a continuación se llevan a cabo si las partículas de captura son magnéticas, pero este aspecto no se limita a la captura magnética. Se puede seleccionar un formato de ensayo competitivo para implementar cualquier tipo de bioensayo para prueba diagnóstica. El formato de ensayo competitivo es especialmente ventajoso, sin embargo, para detectar analitos que son demasiado pequeños para acomodar dos anticuerpos diferentes que puedan formar un complejo inmune de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente. Un formato de ensayo competitivo tal como se describe en el presente documento se puede utilizar para detectar cualquier tipo de analito incluyendo, pero sin limitación, fármacos terapéuticos, fármacos no terapéuticos (control de drogodependencias), péptidos, hormonas, proteínas u otros analitos de interés. El formato de ensayo competitivo es también especialmente ventajoso cuando solamente un agente de unión está fácilmente disponible para el analito de interés.

- [0140]** Algunos formatos de ensayo competitivo específicos que muestran partículas de captura y partículas de detección con nanoetiquetas SERS se describen detalladamente a continuación. Por lo general, sin embargo, todos los formatos de ensayo competitivo requieren el etiquetado de la partícula de captura o de la partícula de detección con el analito o su análogo. La partícula de detección se puede etiquetar ópticamente tal como una partícula fluorescente, coloreada o activa en SERS. La partícula no marcada con el analito o análogo del mismo se conjuga con un agente de unión adecuado para unirse al analito. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 25A, una partícula de captura 2500 se puede derivatizar con un analito de interés 2502. Además, una partícula de detección con nanoetiqueta SERS se puede conjugar con un agente de unión 2506 que se puede unir de forma selectiva al analito 2502 Como se muestra en la Fig. 25A, la puesta en contacto de una muestra que contiene el analito 2502 libre con las partículas de captura y las partículas de detección con nanoetiqueta SERS preparadas como se ha descrito anteriormente dará como resultado la formación de un complejo 2508 de partícula de captura/partícula de detección SERS junto con partículas de detección SERS unidas al analito libre 2510.

- [0141]** Las partículas de captura 2500 pueden ser partículas de captura magnética, u otras partículas que son adecuadas para la concentración. En una realización no magnética, las partículas de captura son partículas más grandes o densas reunidas por centrifugación. Las partículas de captura más grandes y/o densas incluyen, pero no se limitan a, partículas Nanobarcodes®, nanopartículas metálicas esféricas o anisótropas, o cualquier tipo de partícula constituida por, pero sin limitación, látex, poliestireno, u otro material que tenga suficiente peso específico, tamaño y forma para aglomerarse por centrifugación en el disolvente de interés. En el ejemplo de la Fig. 25A, el complejo 2508 de partícula de captura/partícula de detección SERS se puede concentrar (con un concentrador magnético si la partícula de captura es una partícula magnética) y se puede adquirir el espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con las partículas de detección con nanoetiqueta SERS. La intensidad de la señal Raman será inversamente proporcional a la concentración de analito libre presente en la muestra, ya que el analito 2502 libre unirá de forma competitiva parte de las partículas de detección con nanoetiqueta SERS. A medida que aumenta la concentración de analito libre, proporcionalmente menos partículas de detección con nanoetiqueta SERS se unirán a las partículas de captura magnética derivatizadas.

- [0142]** De forma alternativa, como se muestra en la Fig. 25B, la partícula de detección con nanoetiqueta SERS 2504 se puede derivatizar o marcar de otra forma con el analito 2502 o un análogo del mismo. En ese caso, la partícula de captura 2500, que puede ser una partícula de captura magnética, se puede conjugar con un agente de unión adecuado para unirse al analito. Cuando las partículas preparadas de esta forma entran en contacto con la muestra que contiene el analito de interés, las partículas de captura se pueden unir libremente bien al analito libre o las partículas de detección con nanoetiqueta SERS derivatizadas con el analito. Tras concentrar las partículas capturadas, y realizada la adquisición de un espectro Raman como se ha descrito, la intensidad de la señal Raman es también inversamente proporcional a la concentración de analito libre presente en la muestra.

Ejemplo 4:

[0143] A. Formato de ensayo competitivo con adición simultánea de reactivo

5 **[0144]** En un primer formato competitivo, las partículas de captura y detección se añaden en secuencia rápida al analito que contiene la muestra. Durante la incubación, tanto el analito libre como el análogo del analito puede denominarse como "A", y el analito conjugado con la partícula puede competir por el agente de unión conjugado "R". El agente de unión "R" puede tener una afinidad diferente por el análogo A (preferiblemente inferior) comparado con el A endógeno. Tras la incubación, las partículas magnéticas (incluyendo las

10 partículas MP libres y los complejos MP-R::A-SERS o SERS-R::A-MP que dependen de la partícula que se ha conjugado con el agente de unión) se puede concentrar en una ubicación determinada en el interior del recipiente de reacción para adquirir el espectro Raman. La intensidad de la señal Raman es inversamente proporcional a la concentración (cantidad) de analito libre (endógeno) presente en la muestra. Los posibles complejos formados en este ensayo competitivo, dependiendo de qué partícula esta derivatizada con el analito o su análogo son:

15

[0145] $MP-A + A + SERS-R \rightarrow SERS-R::A + SERS-R::A-MP$; o

[0146] $SERS-A + MP-R + A \rightarrow MP-R::A + MP-R + SERS-A + MP-R::A-SERS$

20 **[0147]** B. Formato de ensayo pseudocompetitivo con adición secuencial de reactivo

[0148] En un segundo formato de ensayo competitivo, la muestra que contiene analito se incuba en primer lugar con la partícula conjugada con el agente de unión "R" (MP-R o SERS-R) durante un tiempo determinado para permitir la captura del analito "A" endógeno antes de añadir la partícula conjugada con A. Esta última partícula derivatizada con

25 analito añadida se une a continuación con el conjugado de la partícula-R residual (MP-R o SERS-R). Después de la incubación, las partículas magnéticas (partículas MP libres y complejos MP-R::A-SERS o SERS-R::A-MP) se concentran en una ubicación determinada en el interior del recipiente de reacción para adquirir el espectro Raman. El número de MP-R::A-SERS o SERS-R::A-MP determinados de forma espectroscópica es inversamente proporcional a la concentración de A libre (endógeno) presente en la muestra. El procedimiento pseudocompetitivo en dos etapas

30 incluye las siguientes reacciones, dependiendo de qué partícula está conjugada con el agente de unión.

[0149] $SERS-R + A \rightarrow SERS-R::A + SERS-R$
 $(SERS-R::A + SERS-R) + MP-A \rightarrow SERS-R::A + SERS-R::A-MP$; O

35 **[0150]** $MP-R + A \rightarrow MP-R::A + MP-R$
 $(MP-R::A + MP-R) + SERS-A \rightarrow MP-R::A + MP-R::A-SERS$

[0151] En otro formato de ensayo, SERS-R::A-MP (o MP-R::A-SERS) se puede preformar y guardar en el recipiente de ensayo en forma tanto líquida como liofilizada. Tras añadir la muestra, este complejo partícula-partícula se disocia

40 por interacción con A endógeno en proporción a la concentración de analito, de acuerdo con las siguientes reacciones.

[0152] $MP-R::A-SERS + A \rightarrow MP-R::A + MP-R::A-SERS$; O

[0153] $SERS-R::A-MP + A \rightarrow SERS-R::A + SERS-R::A-MP$

45

[0154] F. Ensayos de detección de la secuencia de nucleótidos

[0155] Las partículas de detección con nanoetiqueta SERS y las partículas de captura independientes también se pueden utilizar para implementar diferentes tipos de ensayos para detectar secuencias de nucleótidos. Las secuencias

50 de nucleótidos que son adecuadas para su detección mediante un ensayo que se describe en el presente documento pueden proceder de cualquier fuente u organismo. Por ejemplo, las fuentes de nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, material humano, animal, vegetal, bacteriano, vírico u otro material genético. Algunas ventajas descritas a continuación se llevan a cabo si las partículas de captura son magnéticas, pero este aspecto no se limita a las realizaciones que muestran partículas de captura magnética. Los ensayos de detección de secuencias de nucleótidos

55 descritas en el presente documento permiten detectar secuencias de nucleótidos diana en lisatos brutos y preparaciones de ADN impuras sin necesidad de etapas de lavado o la eliminación de mezclas de muestras. Algunos ensayos descritos en el presente documento se pueden completar en un tiempo corto, por ejemplo, en media hora o menos.

60 **[0156]** Un ensayo de detección de secuencias de nucleótidos se ilustra de forma esquemática en la Fig. 26. El ensayo de la Fig. 26 presenta al menos una sonda de captura 2600 que incluye una secuencia de nucleótido de captura 2602 conjugado con una partícula. Las etapas de selección descritas a continuación se pueden optimizar si la partícula es una perla magnética, paramagnética, u otro tipo de partícula magnética 2604. Este ensayo incluye también una sonda de detección de secuencias de nucleótido 2606 que incluye una secuencia de detección 2608 conjugada

con una molécula de captura 2610. Tanto la secuencia de captura como la secuencia de selección se seleccionan para tener afinidad de hibridación por la secuencia de nucleótido de interés. La molécula de captura puede ser cualquier molécula adecuada para unir una diana complementaria. Por ejemplo, la sonda de detección 2606 puede ser una secuencia biotinilada o cualquier otra secuencia haptenilada. Se puede preparar un ensayo multiplexado proporcionando sondas de detección independientes 2606 con una primera secuencia de detección 2608 conjugada con una primera molécula de captura 2610 tal como biotina y una segunda secuencia de detección 2612 conjugada con una molécula de captura 2614 diferente como otro hapteno. Es importante resaltar que este ensayo se puede implementar con cualquier molécula de captura 2610 que se pueda unir a una diana complementaria. Los ejemplos anteriores que usan biotina y otro hapteno se presentan a fines ilustrativos.

10

[0157] El ensayo ilustrado en la Fig. 26 se puede llevar a cabo por hibridación de la sonda de captura y la sonda de detección en presencia de las secuencias de nucleótido de interés. Además, el complejo hibridado se puede incubar o ponerse en contacto de otra forma con una nanoetiqueta SERS 2616 conjugada con una molécula diana complementaria que se puede unir de forma selectiva a la molécula de captura 2610. Por ejemplo, la nanoetiqueta SERS se puede conjugar con NeutrAvidin si la biotina se selecciona como molécula de captura.

15

[0158] Tras incubar las sondas hibridadas con el complejo de nanoetiqueta SERS, el espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con la nanoetiqueta SERS se puede detectar con un espectrómetro Raman, un microscopio Raman u otro dispositivo de detección 2618. La concentración o la selección del complejo hibridado resultante se deben llevar a cabo con el fin de separar las nanoetiquetas hibridadas de las etiquetas no unidas. Si se utiliza una partícula magnética 2604 para preparar una sonda de captura, la selección de las partículas magnéticas se puede llevar a cabo usando técnicas de concentración magnética conocidas.

20

[0159] Los datos de la validación experimental de la eficacia de la Fig. 26 se muestran gráficamente en las Figs. 27-32. El límite de detección del ensayo determinado experimentalmente es de aproximadamente 4 pM.

25

[0160] La Fig. 27 es un diseño detallado de la sonda adecuada para su uso en un ensayo de detección de un nucleótido secuenciado. La sonda B1 se puede conjugar con la partícula magnética 2604 y la sonda S1 se puede conjugar con la etiqueta SERS 2616. Se procesaría la hibridación cuando la sonda B, la sonda S y la diana estén presentes en las condiciones adecuadas, por ejemplo 55C.

30

[0161] La Figura 28 ilustra un gráfico 2800 que muestra la prueba de concepto del ensayo mostrado en la Fig. 26. El oligo StexI, diana génica de *E. coli*, se diluyó de 1000 pM a 1 pM. Los datos indican que el límite de detección es de aproximadamente 4 pM con una confianza del 99,7%.

35

[0162] La Figura 29 ilustra algunos cebadores RT-PCR y sondas de hibridación diseñadas para la detección del VIH y del VHC. Por ejemplo, la sonda 5'p de VHC y la sonda 3' del VHC se pueden utilizar para RT-PCR. La sonda B ilustrada se puede conjugar con una partícula magnética tal como la partícula magnética 2604 y la sonda S ilustrada se puede conjugar con una etiqueta SERS 2616. Los gráficos 3000 y 3002 de la Figura 30 ilustran los resultados de una titulación de VHC (3000) y VIH (3002). También se ilustra en la Fig. 30 una correlación lineal entre la concentración de la diana y la señal. Se demuestra que el límite de detección del VHC es de aproximadamente 4,1 pM, y para el VIH, se demostró que era de aproximadamente 3,7 pM. Para confirmar la eficacia de este ensayo en una muestra clínica, muestras de ARN del VHC o del VIH se amplificaron mediante RT-PCR y estos productos se detectaron mediante el sistema. Los resultados ilustran que una sonda del VHC tal como se describe en el presente documento era adecuada para detectar las dianas específicas de la secuencia del VHC. No se observó una detección falsa de una diana errónea como el VHA o un control negativo. (Véase el Gráfico 3100 de la Figura 31). Se obtuvieron resultados similares al detectar el VHC. Véase por ejemplo el Gráfico 3200 de la Fig. 32. El resultado indica que el límite de detección del producto RT-PCR es de aproximadamente 0,28 - 2,8 pM. Esto confirma que el ensayo descrito puede detectar una concentración del ADN diana tan baja como 0,28 - 4 pM.

45

[0163] Un ensayo de detección de secuencias de nucleótidos alternativo se ilustra de forma esquemática en la Fig. 33. En la Fig. 33, uno o más tipos de sonda de captura 3300 se proporcionan por conjugación de una partícula, que puede ser una partícula magnética 3302, con una secuencia de captura 3304 o 3305. Además, uno o más tipos de sondas de detección 3306 se pueden proporcionar por conjugación directa de una secuencia de detección 3308, 3308 a una nanoetiqueta SERS 3310 o 3311. En cada caso, las secuencias de captura y detección se seleccionan para tener una afinidad por hibridación con las secuencias de nucleótido diana. Las sondas de captura 3300 y las sondas de detección 3306 se pueden hibridar en presencia de las secuencias de nucleótidos de interés. A continuación, el complejo resultante se puede seleccionar o concentrar seguido de la detección del espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con la nanoetiqueta SERS. Si se utiliza una partícula magnética 3302 para preparar las sondas de captura 3300, el complejo de interés se puede seleccionar o concentrar usando técnicas de concentración magnética conocidas. Se puede preparar un ensayo multiplexado proporcionando múltiples sondas de captura 3300 que muestran diferentes secuencias de captura 3304, 3305 y múltiples sondas de detección 3306 con diferentes secuencias de detección 3308, 3309 donde cada tipo de secuencia de detección está conjugado con un tipo de nanoetiqueta SERS 3310, 3311 que presenta una molécula indicadora Raman diferente.

60

- [0164]** El Gráfico 3400 de la Fig. 34 es una representación de los resultados de la validación experimental del ensayo ilustrado en la Fig. 33. El límite de detección en un sistema oligonucleótido equivalente era de aproximadamente 10 pM en condiciones de ensayo no optimizadas. El límite de detección en sistemas modelo disminuye cuando la hibridación tiene lugar en presencia de ADN genómico no relacionado como fondo. La detectabilidad se puede reducir adicionalmente cuando la sonda de oligonucleótido se hibrida a una megabase de diana de ADN genómico en lugar de a la diana de oligo análoga deseada. De acuerdo con ello, en determinados casos, puede ser deseable aumentar la eficacia y la sensibilidad del ensayo.
- [0165]** Un método para aumentar la sensibilidad del ensayo de detección de nucleótidos se ilustra de forma esquemática en la Fig. 35. Este ensayo incluye un corte inicial o rotura de la secuencia del nucleótido de interés en 3500 en múltiples secciones. Se puede emplear en esta etapa cualquier técnica conocida para cortar un nucleótido en secciones. Por ejemplo, se puede utilizar una enzima frecuente y de acción rápida para digerir el nucleótido de interés en piezas pequeñas. Las secciones del nucleótido diana así preparadas se pueden hibridar a continuación con diferentes sondas de captura múltiples y diferentes sondas de detección múltiples, donde cada tipo de sonda tiene diferentes afinidades de hibridación por partes independientes de las secuencias de nucleótidos de interés. Como se ha descrito anteriormente, las sondas de detección se pueden conjugar a una nanoetiqueta SERS y las sondas de captura se pueden conjugar a una partícula magnética. La fragmentación del ADN diana en múltiples trozos pequeños aumenta de forma eficiente la eficacia de la hibridación y la concentración del complejo diana, ya que los múltiples fragmentos de la diana deseada presente en la muestra de ensayo se pueden unir por separado a múltiples partículas de detección, lo que aumenta la señal y, de este modo, aumenta la sensibilidad del ensayo. Una ventaja asociada con el método ilustrado en la Fig. 35 es que este método aumenta la sensibilidad del ensayo sin introducir sesgo por amplificación.
- [0166]** Alternativamente, un fragmento de nucleótido mayor (por ejemplo, un fragmento genómico o un gen sin digestión o con una digestión mínima) se puede hibridar con una secuencia de captura conjugada con una partícula de captura. Adicionalmente, múltiples secuencias de detección complementarias de un fragmento de nucleótido mayor, cada una de ellas, se puede conjugar con la misma nanoetiqueta SERS. De esta forma, la sensibilidad del ensayo aumenta al aumentar el número de sondas de detección para una secuencia única más grande del nucleótido. En este caso, la especificidad del ensayo también se podría aumentar mediante el uso de una pluralidad de nanoetiquetas SERS. Alternativamente, si se han conjugado múltiples secuencias de detección diferentes con diferentes nanoetiquetas SERS, o se puede identificar una delección o mutación genómica específica por diseño de secuencias de detección específicas para detectar la región de interés. Adicionalmente, la partícula magnética se podría conjugar a múltiples secuencias de captura diferentes complementarias de diferentes fragmentos de nucleótidos de interés, dando como resultado la potenciación de la señal del ensayo para cada partícula magnética.
- [0167]** Se pueden utilizar otros métodos para aumentar la sensibilidad del ensayo de ácido nucleico. Por ejemplo, la amplificación en círculo rodante (RCA) isoterma, la amplificación relacionada con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación impulsada por el ARN de T7, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), ADN ramificado (ADNb) u otros métodos de amplificación conocidos se pueden utilizar junto con las sondas de detección y captura descritas anteriormente. Un ensayo de ejemplo que presenta una RCA se ilustra en la Fig. 36. El ensayo de la Fig. 36 tiene sondas de captura 3600 que presentan una secuencia de captura 3602 conjugada a una partícula magnética 3604 y una o más sondas 3606 de RCA, cada una de ellas conjugada a una molécula 3608 de RCA que se puede hibridar en presencia de una secuencia de nucleótidos 3610 de interés seguido por RCA usando técnicas conocidas. El complejo resultante se puede poner en contacto con una o más sondas de detección 3612, cada una de ellas conjugada a una nanoetiqueta SERS 3614 aumentando sustancialmente, de esta forma, el número de nanoetiquetas asociadas a cada molécula de captura. A continuación, se puede adquirir el espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con la nanoetiqueta SERS mediante un espectrómetro Raman, microscopio Raman u otro equipo 3616. El Gráfico 3700 de la Fig. 37 ilustra la sensibilidad de un ensayo preparado de acuerdo con la Fig. 36. El ensayo de la Fig. 37 se describe detalladamente en el Ejemplo 5 siguiente. Los expertos en la materia observarán que, en el ensayo potenciado mediante RCA, la partícula de captura magnética asociada a la sonda de captura se puede utilizar para facilitar la selección y/o concentración tanto después de la RCA como después de la incubación de los productos de la hibridación iniciales en presencia de sondas de detección con nanoetiquetas SERS.

55 Ejemplo 5:

[0168] Funcionalización con carboxilo del revestimiento con etiquetas SERS

[0169] FUNCIONALIZACIÓN CON AMINA:

1. Lavar 500 µl 20x de vidrio revestido con etiquetas SERS tres veces en EtOH.
2. Resuspender en 930 µl de EtOH. Añadir 50 pi de agua y 20 µl de APTMS.
3. Mezclar durante una hora.
4. Lavar tres veces con 1 ml de DMSO. Funcionalización con carboxilo:
5. Disolver 0,04 g de anhídrido succínico en 1 ml de DMSO.

6. Añadir 10 µl de disolución de anhídrido succínico a nanoetiquetas SERS en DMSO. Mezclar durante una hora.
7. Añadir 10 µl de más disolución de anhídrido succínico. Mezclar durante una hora más.
8. Enjuagar tres veces con MES 50 mM pH 4,5.
- 5 9. Resuspender las nanoetiquetas SERS a 500 µl de MES y almacenar a 4C.

[0170] CONJUGACIÓN DEL OLIGO A ETIQUETAS SERS FUNCIONALIZADAS

1. Tomar 40µl 20x de etiquetas SERS funcionalizadas. Lavarlas con MES 50 mM (pH 4,5) dos veces.
2. Resuspender las etiquetas SERS con 163 µl de MES 50 mM (pH 4,5) y añadir 2 µl de oligo 50 µM (100 pmoles). Poner sobre hielo.
- 10 3. Preparar EDC al 20% en MES 50 mM (pH 7,0) (10 mg de EDC en 50 µl de MES).
4. Añadir 15 µl de EDC al 20% a las etiquetas/oligo SERS. Mezclar bien y agitar durante 1 hora a 4C.
5. Lavar con 500 µl de PBS 10 mM cuatro veces. Es muy importante eliminar por lavado todo el oligo no conjugado.
- 15 6. Resuspender en 40 µl de PBS.

[0171] CONJUGACIÓN DEL OLIGO A PERLAS MAGNÉTICAS

1. Tomar 40 µl de perlas magnéticas (8×10^7) Lavar las perlas con MES 50 mM (pH 4,5) dos veces.
2. Resuspender las perlas con 163 µl de MES 50 mM (pH 4,5) y añadir 2 pl de oligo 50 pM (100 pmoles). Poner sobre hielo.
- 20 3. Preparar EDC al 20% en MES 50 mM (pH 7,0) (10 mg de EDC en 50 µl de MES).
4. Añadir 15 µl de EDC al 20% a las perlas/oligo. Mezclar bien y agitar durante 1 hora a 4C.
5. Lavar con 500 µl de PBS 10 mM cuatro veces. Es muy importante eliminar por lavado todo el oligo no conjugado.
- 25 6. Resuspender en 40 µl de perlas magnéticas (8×10^7)

[0172] HIBRIDACIÓN

1. Tomar 33 µl de tampón 2xTMAC o HS114, añadir 5 µl de oligo 10 µM y 5 pi de sonda de perla magnética (4×10^6). Hibridación a 55C durante 30 minutos. Adquirir la señal Raman o continuar con las siguientes etapas.
- 30 2. Lavar con 1X de SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos y 0,1X de SSC a 55C durante 5 minutos.
3. Añadir NeutrAvidin -BPE (etiqueta SERS) e incubar durante 30 minutos.
4. Lavar con 10 mM de PBS dos veces.
5. Adquirir la señal Raman mediante el microscopio Reinshaw InVia Raman o el espectrofotómetro QE65000.

35 [0173] AMPLIFICACIÓN DE SERS MEDIANTE CÍRCULO RODANTE

1. En 42 µl de tampón HSI 14, añadir 5 µl de oligo, 1 µl de sonda RCA 5 uM y 2 µl de sonda de perlas hasta un volumen total de 50 µl e incubar a 55C durante 30 minutos.
2. Lavar una vez con PBS, y añadir 46 µl de PBS/Tween-20 al 0,05% y 4 µl de sonda circular 10 pM a las perlas.
3. Incubar a 37C durante 30 minutos y lavar una vez con PBS.
- 40 4. A las perlas, añadir 2 µl de ADN polimerasa phil29 (20U), 1 µl de dNTP (20 mM/cada dNTP), 10 pi 2x tampón/1x BSA y 7 µl de H₂O, hasta totalizar 20 µl.
5. Incubar a 37 C durante 2 horas hasta toda la noche. Lavar una vez con PBS.
6. Añadir 50 µl de 0,5X de sonda con la etiqueta SERS en 2x disolución de SSC/Tween-20 al 0,05% e incubar a 37C durante 20-30 minutos.
- 45 7. Lavar con 1X SSC durante 1 minuto a temperatura ambiente.
8. Lavar con 0,1X SSC durante 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Adquirir la señal Raman en un instrumento QE65000.

[0174] Aunque la invención se ha demostrado de forma particular, y se ha descrito en referencia a un número de realizaciones, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar cambios en la forma y detalles de las diferentes realizaciones descritas en el presente documento sin separarse del alcance de la invención.

<110> SOLICITANTE: Oxonica, Inc.
 Natan, Michael J.
 Cromer, Remy
 Penn, Sharron Gaynor
 5 Sha, Michael
 Doering, William E.
 Xu, Hongxia
 <120> TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ENSAYOS CON NANOETIQUETAS SERS
 <130> ARCHIVO DE REFERENCIA: 0X115/PCT
 10 <140> NÚMERO DE SOLICITUD ACTUAL: PCT/US07/61878
 <141> FECHA DE PRESENTACIÓN ACTUAL: 08-02-2007
 <150> NÚMERO DE SOLICITUD ANTERIOR: 60/771.766
 <151> FECHA DE PRESENTACIÓN ANTERIOR: 08-02-2006
 <150> NÚMERO DE SOLICITUD ANTERIOR: 60/832.917
 15 <151> FECHA DE PRESENTACIÓN ANTERIOR: 24/07/2006
 <150> NÚMERO DE SOLICITUD ANTERIOR: 60/870.963
 <151> FECHA DE PRESENTACIÓN ANTERIOR: 20/12/2006
 <160> NÚMERO DE N^{ROS} DE SEC ID: 7
 <170> PROGRAMA INFORMÁTICO PatentIn versión 3.3
 20 <210> SEC ID N° 1
 <211> LONGITUD 34
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Artificial
 <220> RASGO:
 25 <223> OTRA INFORMACIÓN: Sonda
 <400> SECUENCIA: 1
 tttttttttt ttttttttcc gagagctgaa tgag 34
 <210> SEC ID N° 2
 <211> LONGITUD 16
 30 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Artificial
 <220> RASGO:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Diana
 <400> SECUENCIA: 2
 35 ctcatcagc tctcgg 16
 <210> SEC ID N° 3
 <211> LONGITUD 34
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Artificial
 40 <220> RASGO:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Sonda
 <400> SECUENCIA: 3
 tttttttttt ttttttttcc gagagccgaa tgag 34
 <210> SEC ID N° 4
 45 <211> LONGITUD 16
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Artificial
 <220> RASGO:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Diana
 50 <400> SECUENCIA: 4
 ctcatcggc tctcgg 16
 <210> SEC ID N° 5 <211> LONGITUD: 410
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: virus de la Hepatitis C
 55 <400> SECUENCIA: 5
 gacctccacc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt cttcaocgag aaagcgtcta 60
 gccatggcgt tagtatgagt gtcgtgcagc ctccaggacc ccccctcccg ggagagccat 120
 agtgggtctgc ggaaccgggtg agtacaccgg aattgccagg acgaccgggt cctttcttgg 180
 atcaaccgcg tcaatgcctg gagatttggg cgtgcccccg caagactgct agccgagtag 240
 tgttggtctc gaaaggcct tgtggtactg cctgataggg tgcttgcgag tgccccggga 300
 ggtctcgtag accgtgcacc atgagcacga atcctaaacc tcaaagaaa accaaacgta 360
 acaccaaccg tcgccacag gacgtcaagt tcccgggtgg cggtcagatc 410

ES 2 493 990 T3

<210> SEC ID Nº 6
 <211> LONGITUD 172
 <212> TIPO: ADN
 <213> ORGANISMO: Virus de la inmunodeficiencia humana

5 <400> SECUENCIA: 6
 aacacagtgg ggggacatca agcagccatg caaatgttaa aagagacat caatgaggaa 60
 gctgcagaat gggatagatt gcatccagtc catggagggc ctattgcacc aggccagatg 120
 agagaaccaa ggggaagtga catagcagga actactagta cccttcagga ac 172

<210> SEC ID Nº 7
 <211> LONGITUD: 1320
 <212> TIPO: ADN

10 <213> ORGANISMO: Artificial
 <220> RASGO:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Sonda

<400> SECUENCIA: 7
 cgtacgtcaa gtagtcgcat gagatctgac cagatatggt aaggttgacg ctctctttga 60
 atataattat ctttttcatt acgttattgt tacgttttatc cggtgcgccg taaaacgccg 120
 tccttcaggg ggtggaggat gtcaagaata tagttatcgt atggtgctca aggagtattg 180
 tgtaatatga aaataattat ttttagagt ctaacttttt tctttgttat cttttcagtt 240
 aatgtggttg cgaaggaatt taccttagac ttctcgactg caaagacgta tgtagattcg 300
 ctgaatgtca ttcgctctgc aataggtact ccattacaga ctatttcacg aggaggtacg 360
 tctttactga tgattgatag tggcacaggg gataatttgt ttgcagttga tgtcagaggg 420
 atagatccag aggaagggcg gtttaataat ctacggctta ttgttgaacg aaataattta 480
 tatgtgacag gatttgttaa caggacaaat aatgtttttt atcgcttttc tgatttttca 540
 catgttacct ttccaggtac aacagcggtt acattgtctg gtgacagtag ctataccacg 600
 ttacagcgtg ttgcagggat cagtcgtacg gggatgcaga taaatcgcca ttcggttgact 660
 acttcttatc tggatttaat gtcgcatagt ggaaccttac tgacgcagtc tgtggcaaga 720
 gcgatgttac ggtttgttac tgtgacagct gaagctttac gttttcggca aatacagagg 780
 ggatttcgta caacactgga tgatctcagt gggcgttctt atgtaatgac tgctgaagat 840
 gttgatctta cattgaactg ggaaggttg agtagtgcc tgccctgatta tcatggacaa 900
 gactctgttc gtgtaggaag aattttcttt ggaagcatta atgcaattct ggaagcgtg 960
 gcattaatac tgaattgtca tcatcatgca tcgcgagttg ccagaatggc atctgatgag 1020
 tttccttcta tgtgtccggc agatggaaga gtccgtggga ttacgcacaa taaaatattg 1080
 tgggattcat ccaactctgg ggcaattctg atgcgcagaa ctattagcag ttgaggggt 1140
 aaaatgaaaa aaacattatt aatagctgca tcgctttcat ttttttcagc aagtgcgctg 1200
 gcgacgcctg attgtgtaac tggaaaggtg gagtatacaa aatataatga tgacgatacc 1260
 tttacagtta aagtgggtga taaagaatta tttaccaaca gatggaatct tcagttctct 1320

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una molécula de interés que comprende:

- 5 proporcionar una perla magnética conjugada a una molécula;
hibridar la perla magnética con una diana complementaria capaz de unirse de manera selectiva a la molécula,
incluyendo la diana una porción de biotina;
poner en contacto la perla magnética hibridada con una nanoetiqueta SERS capaz de unirse a la porción de biotina;
separar magnéticamente la perla magnética; y
10 detectar el espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con la nanoetiqueta SERS.

2. Un método para detectar una molécula de interés que comprende:

- 15 proporcionar una nanoetiqueta SERS conjugada a una molécula;
hibridar la nanoetiqueta SERS con una diana complementaria capaz de unirse de manera selectiva a la molécula,
incluyendo la diana una porción de biotina;
poner en contacto la nanoetiqueta SERS hibridada con una partícula magnética capaz de unirse a la porción de
biotina;
separar magnéticamente la partícula magnética; y
20 detectar el espectro Raman de una molécula indicadora Raman asociada con la nanoetiqueta SERS.

3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la diana es una molécula de ácido nucleico.

4. Un método para detectar una molécula de interés que comprende:

- 25 proporcionar una primera nanoetiqueta SERS conjugada a una primera molécula;
proporcionar una segunda nanoetiqueta SERS conjugada con una segunda molécula, donde la segunda
nanoetiqueta SERS presenta un espectro Raman diferente del de la primera nanoetiqueta SERS cuando se
somete a análisis;
30 hibridar la primera y segunda nanoetiqueta SERS con una diana complementaria capaz de unirse de manera
selectiva a una de la primera y segunda molécula, conteniendo la diana una porción de biotina;
poner en contacto la primera y segunda nanoetiqueta SERS hibridada con una partícula magnética capaz de unirse
a la porción de biotina;
seleccionar magnéticamente la partícula magnética; y
35 detectar el espectro Raman de una de la primera y segunda nanoetiqueta SERS.

5. El método de la reivindicación 4, donde la primera y la segunda molécula son moléculas de ácido nucleico.

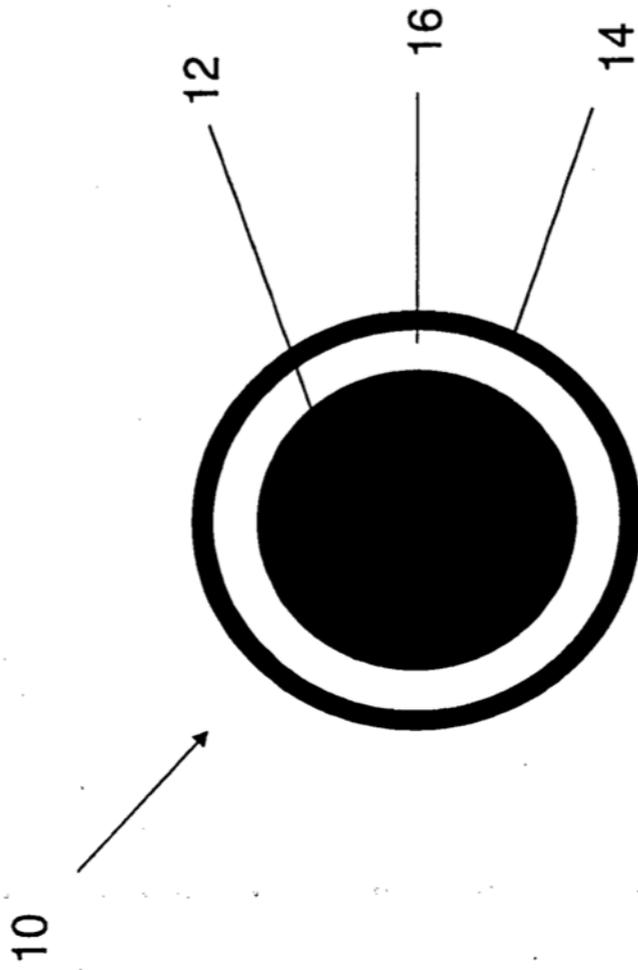
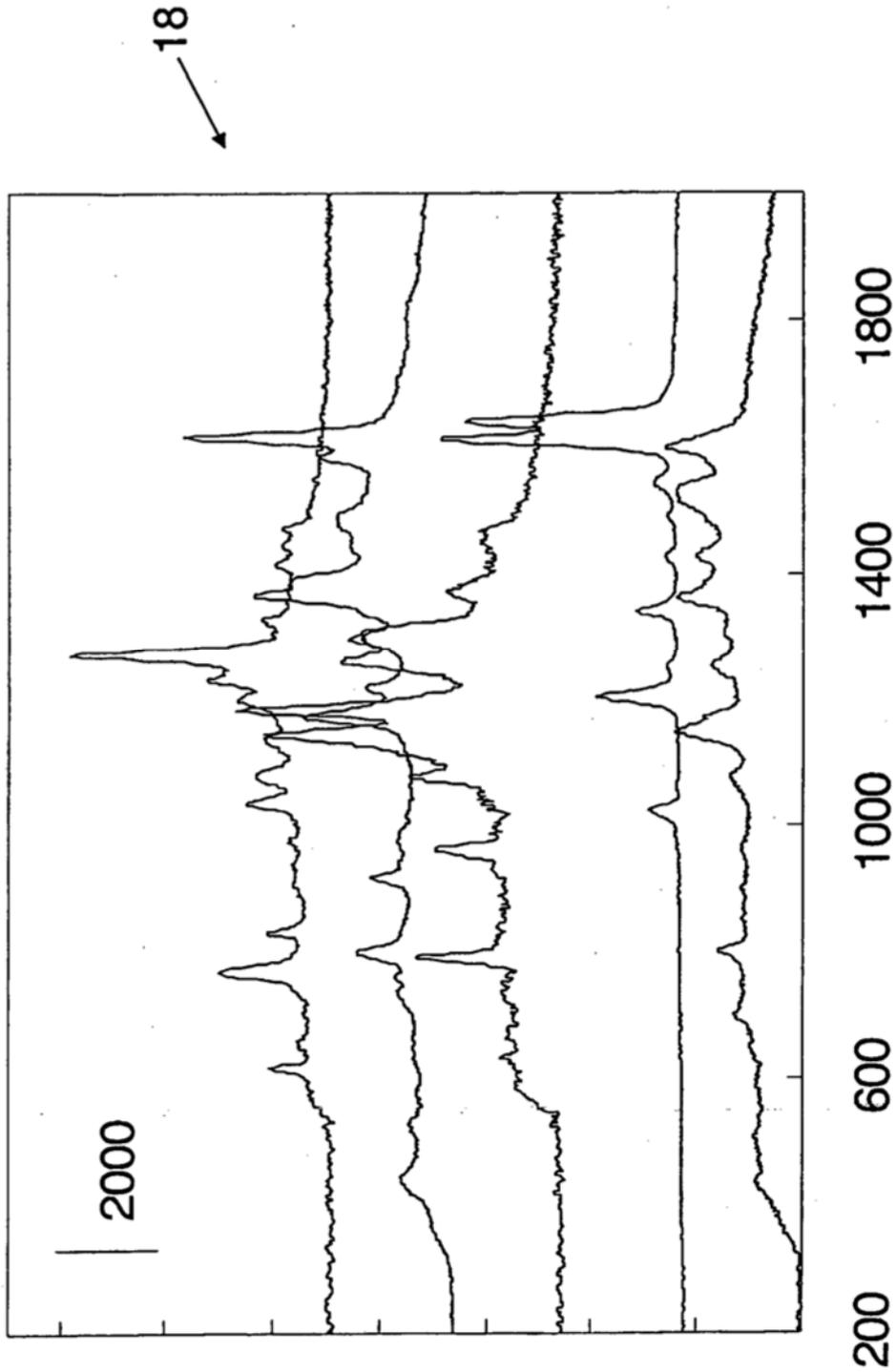


FIG. 1



Desplazamiento Raman (cm^{-1})

FIG. 2

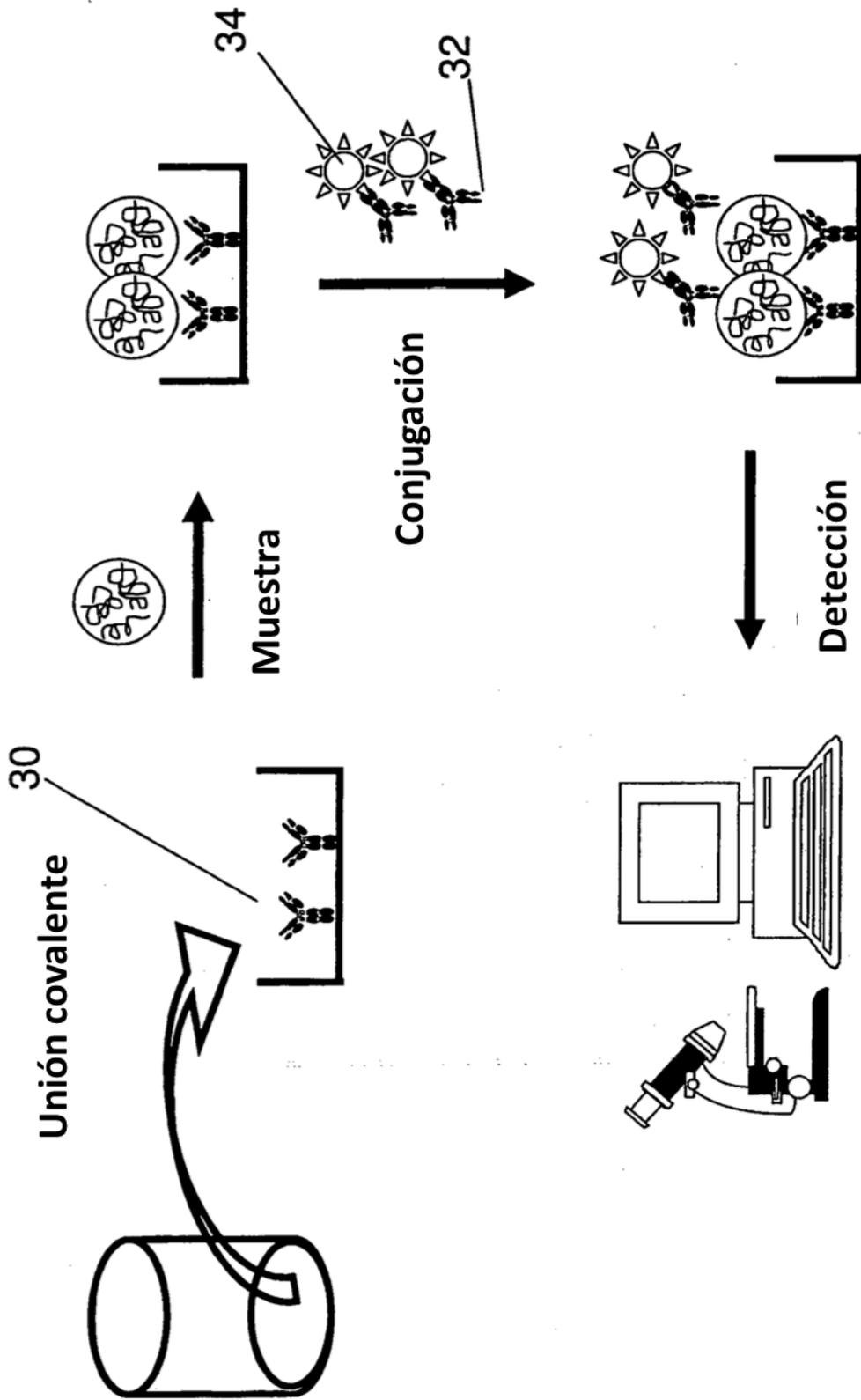


FIG. 3

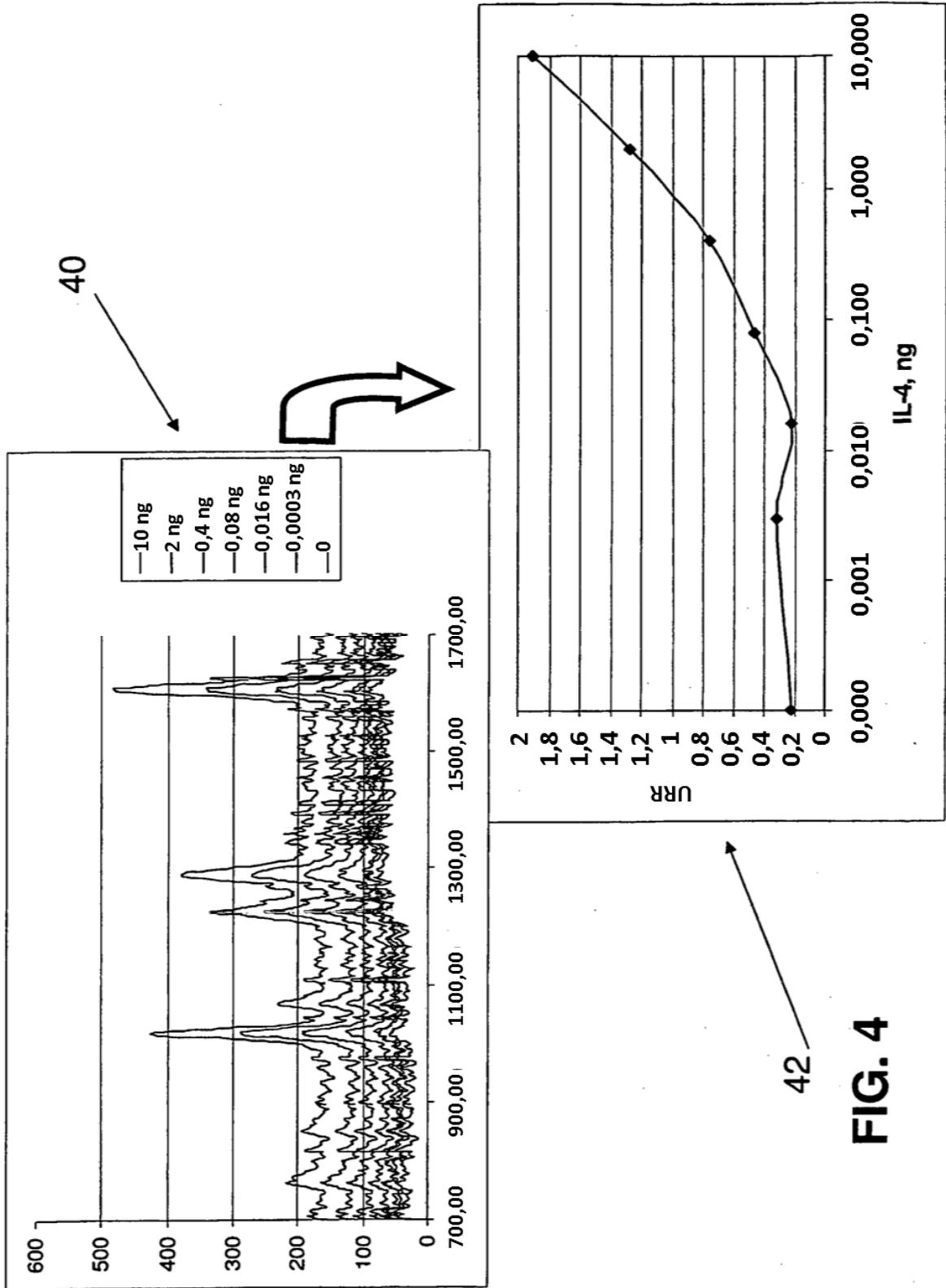
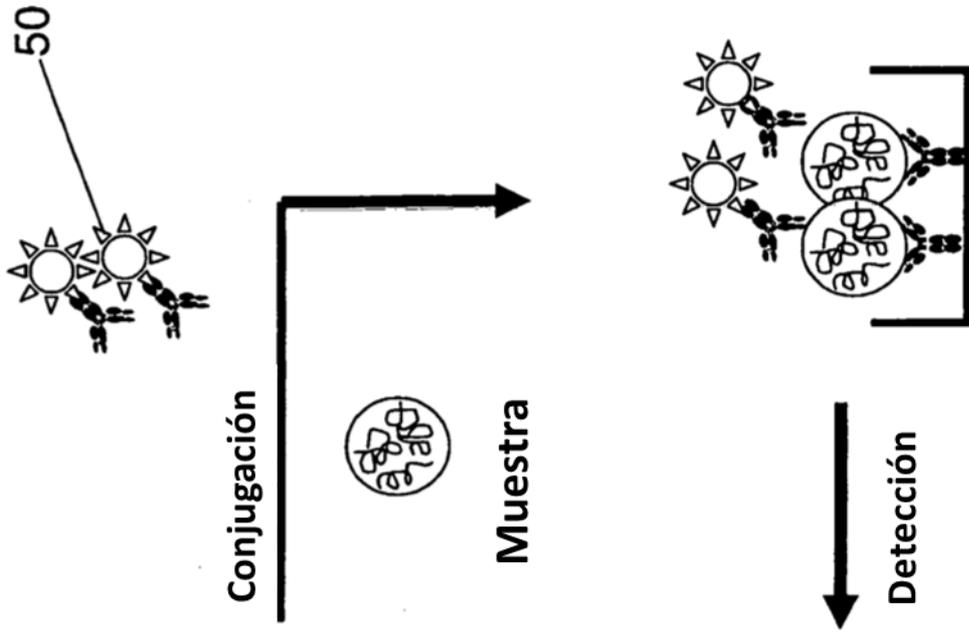


FIG. 4



Unión covalente

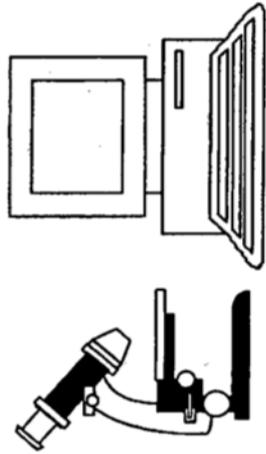
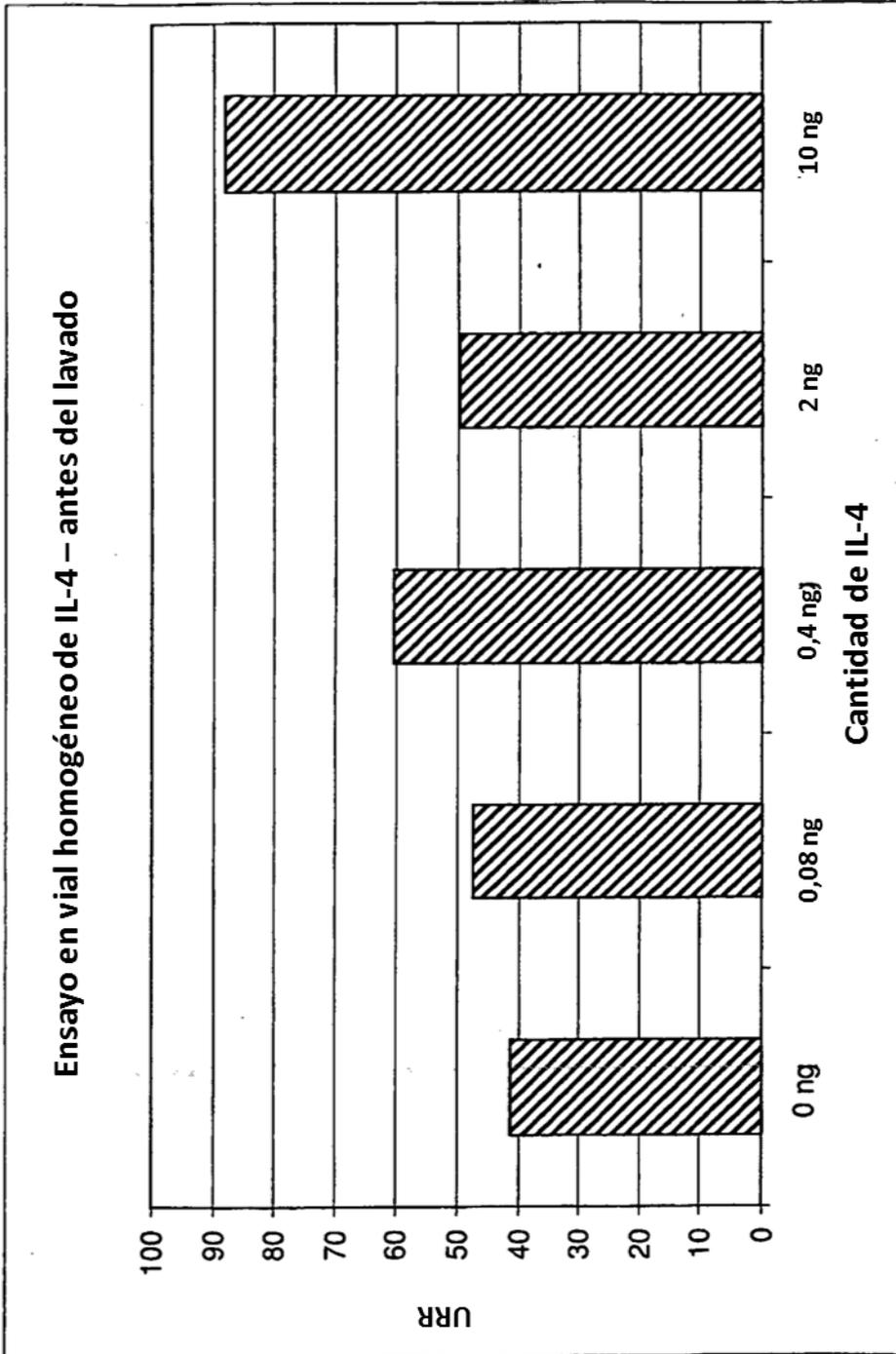


FIG. 5



60

FIG. 6

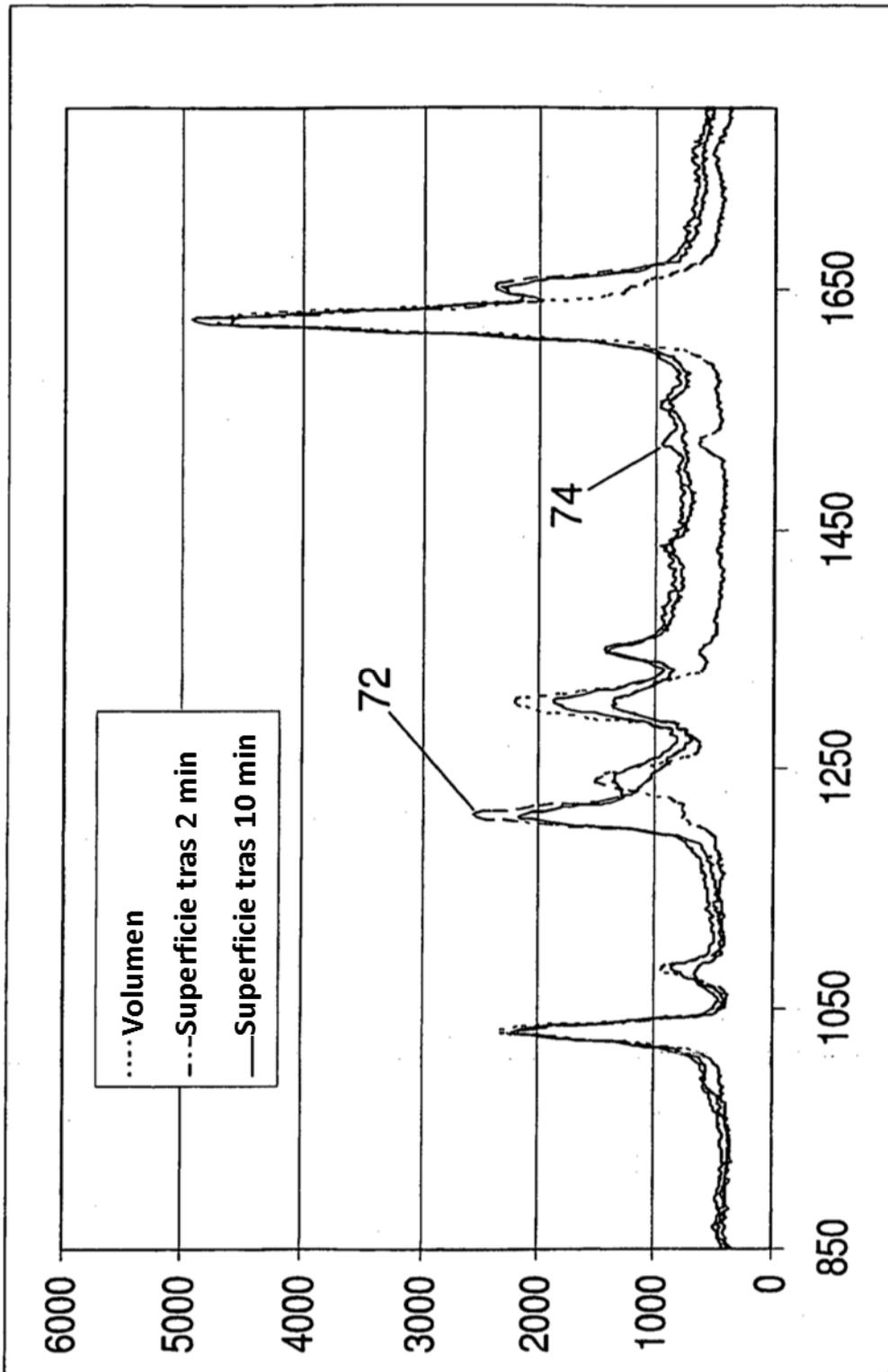
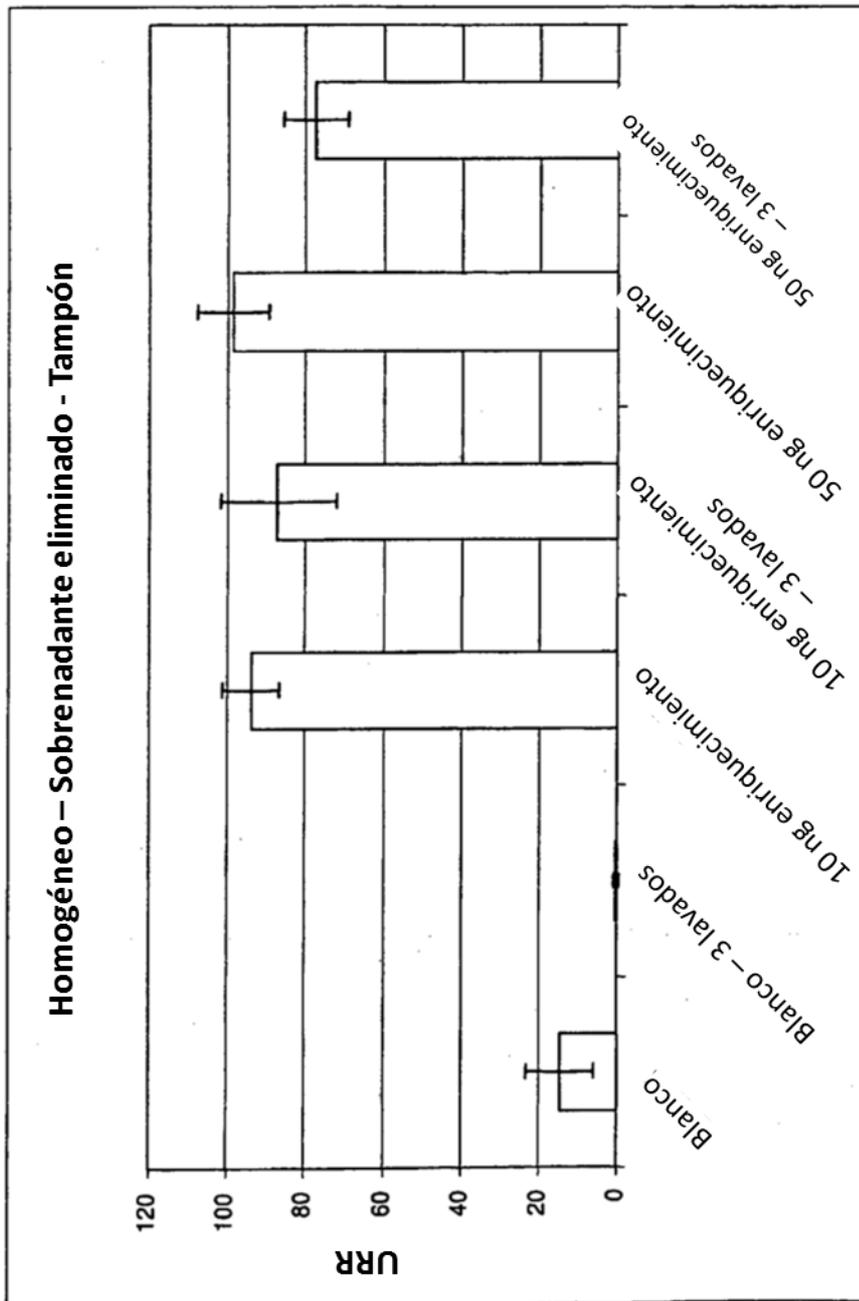


FIG. 7



80

FIG. 8

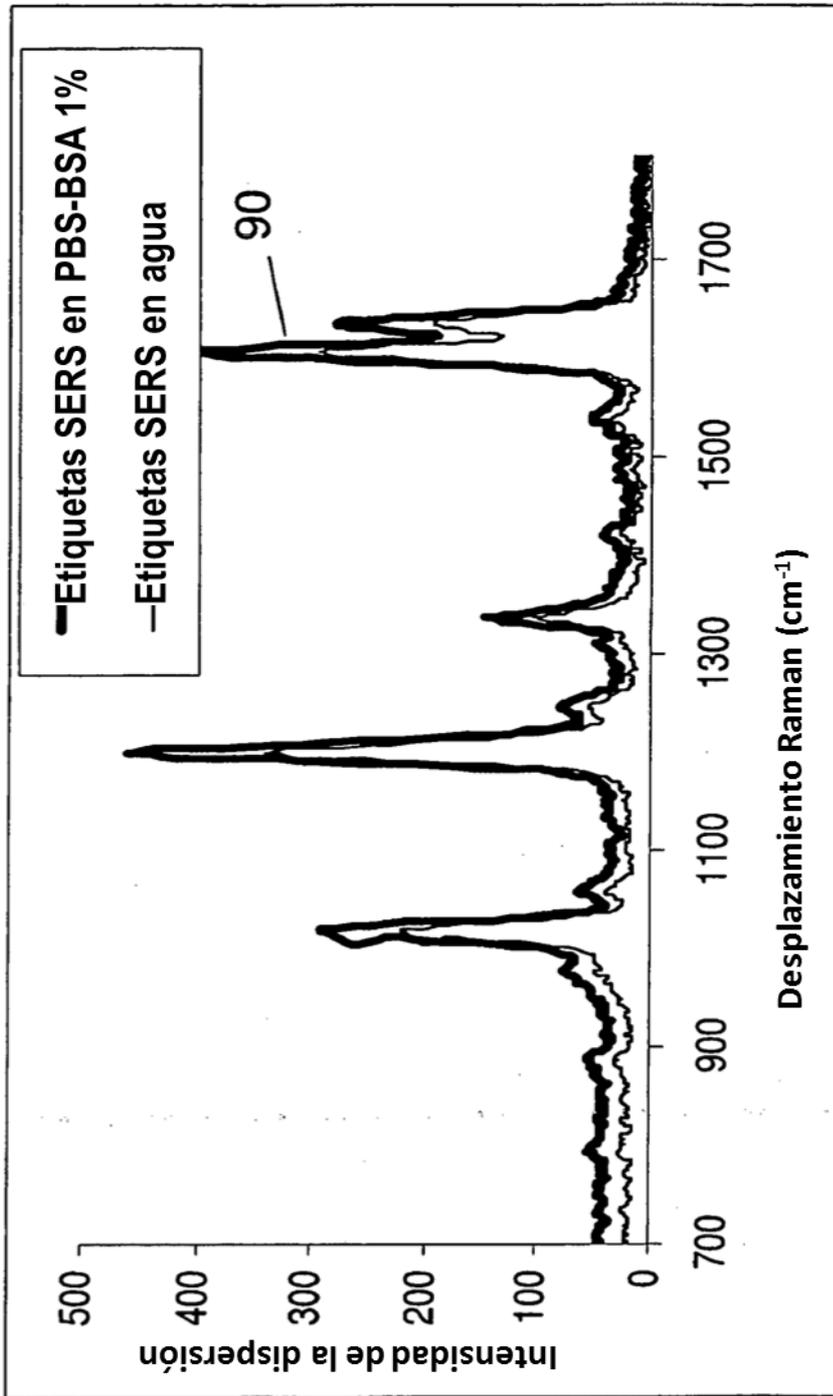


FIG. 9A

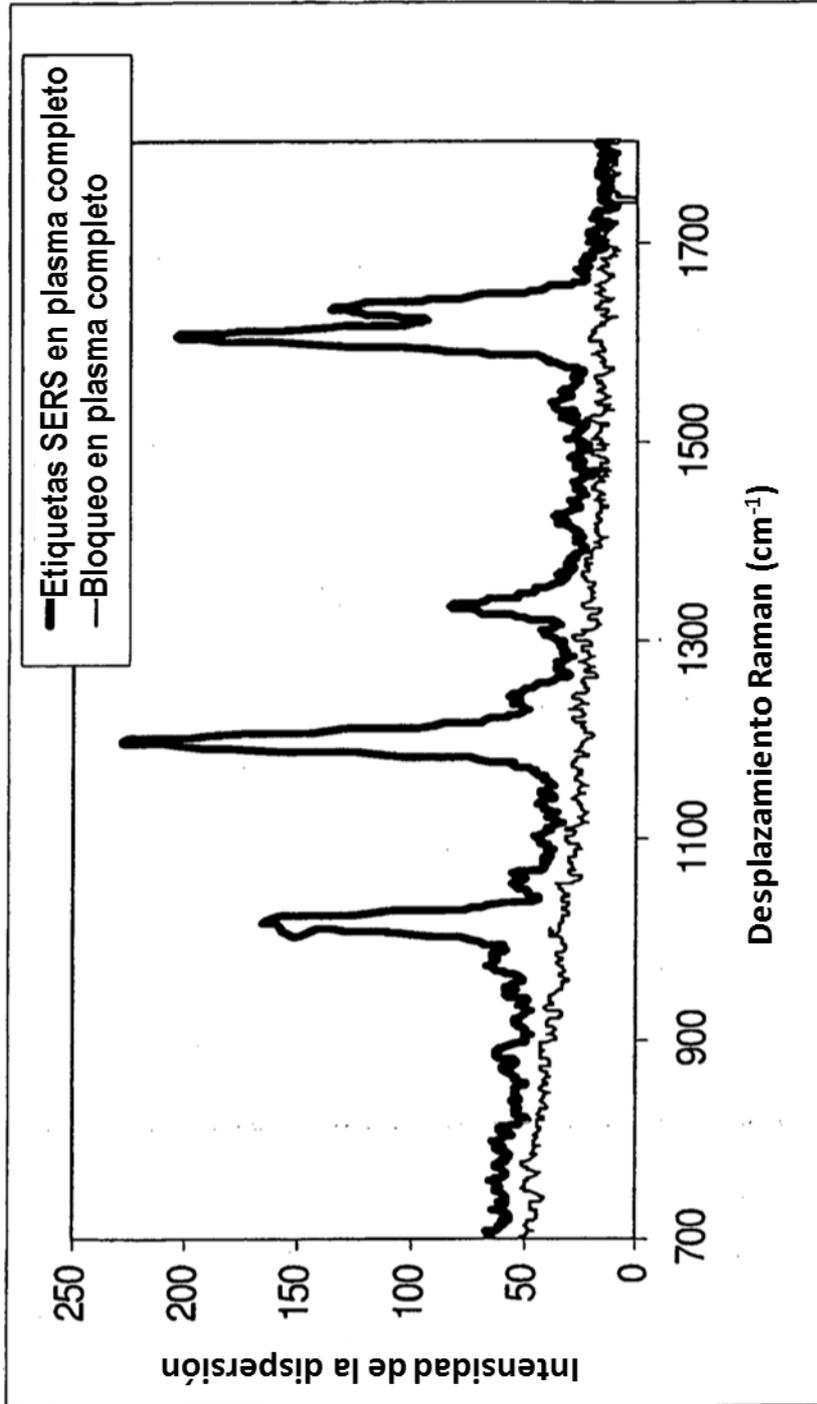


FIG. 9B

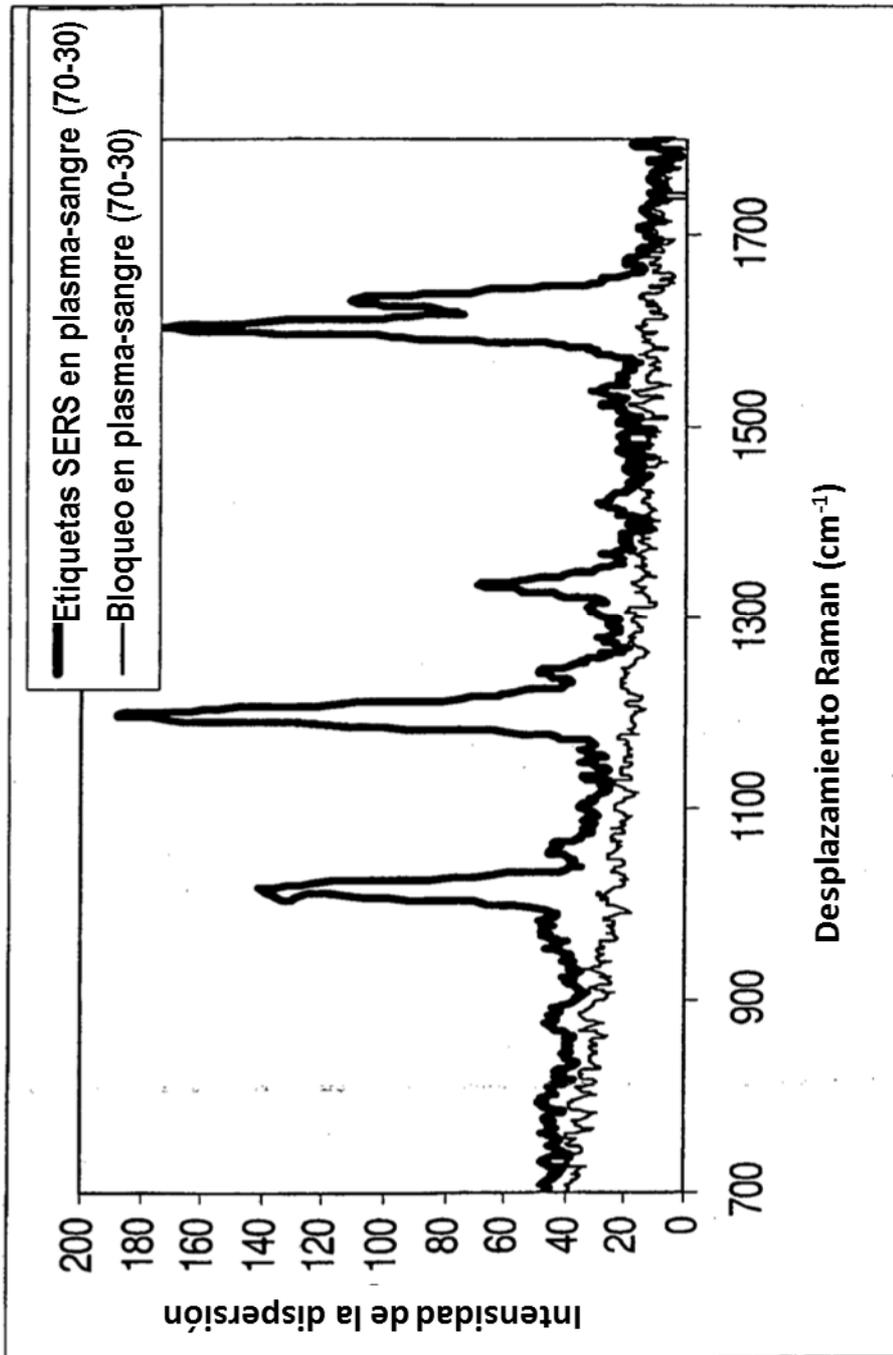
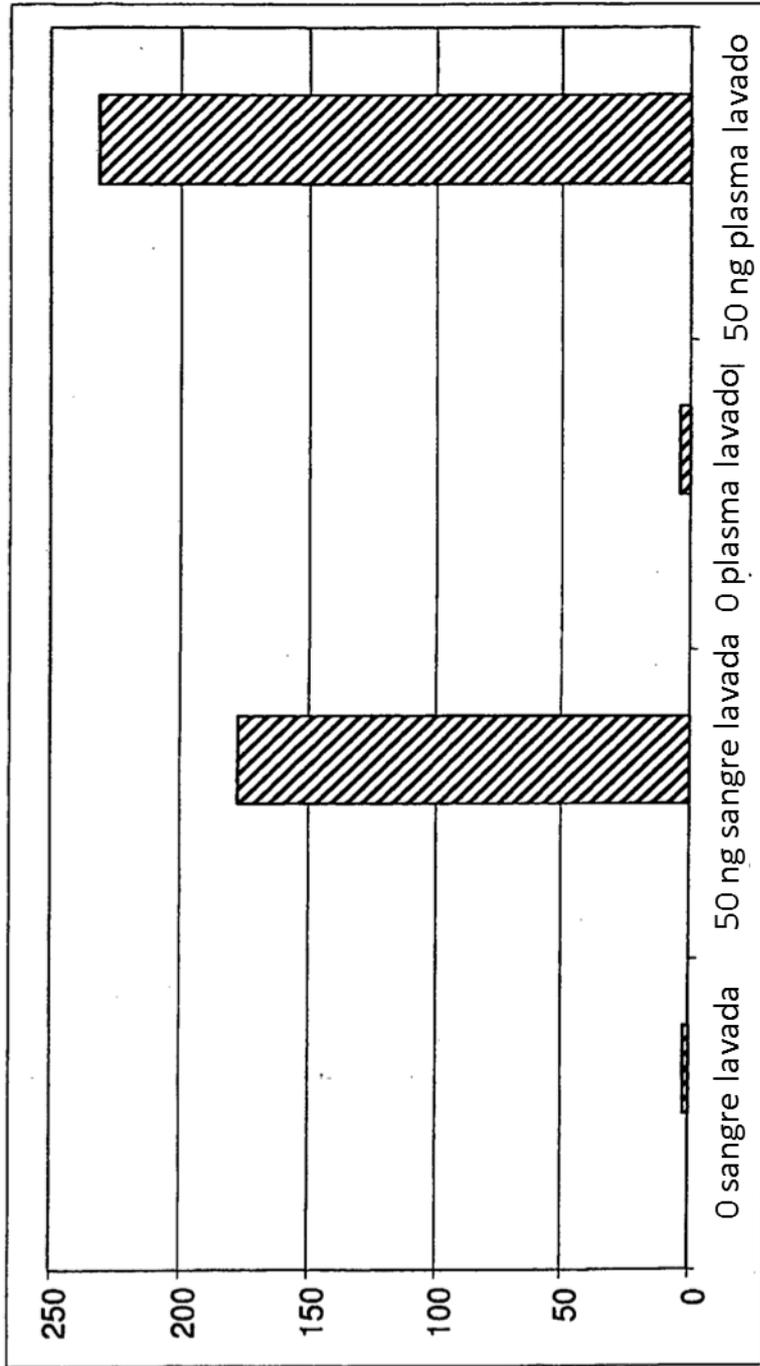


FIG. 9C



100

FIG. 10

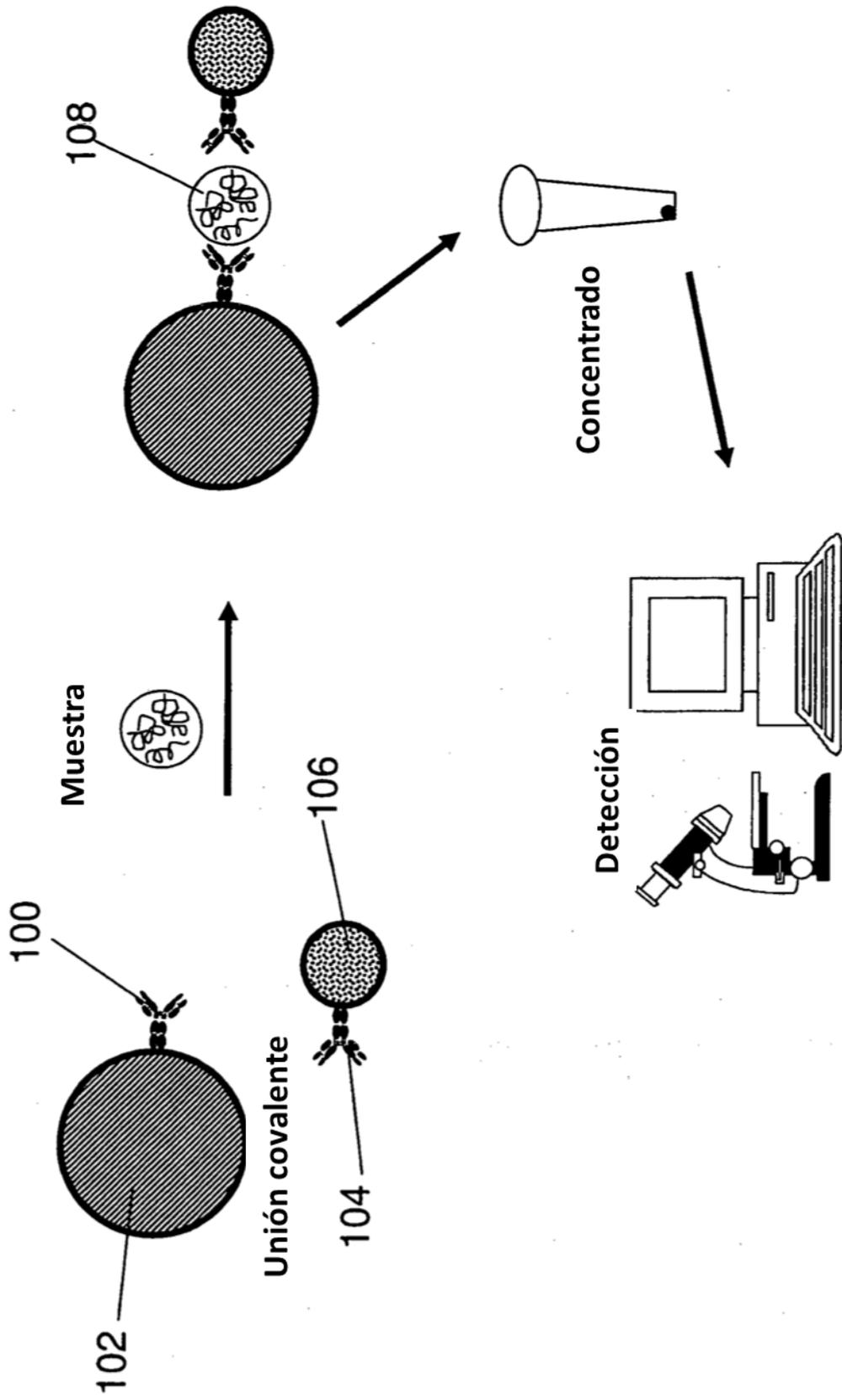


FIG. 11

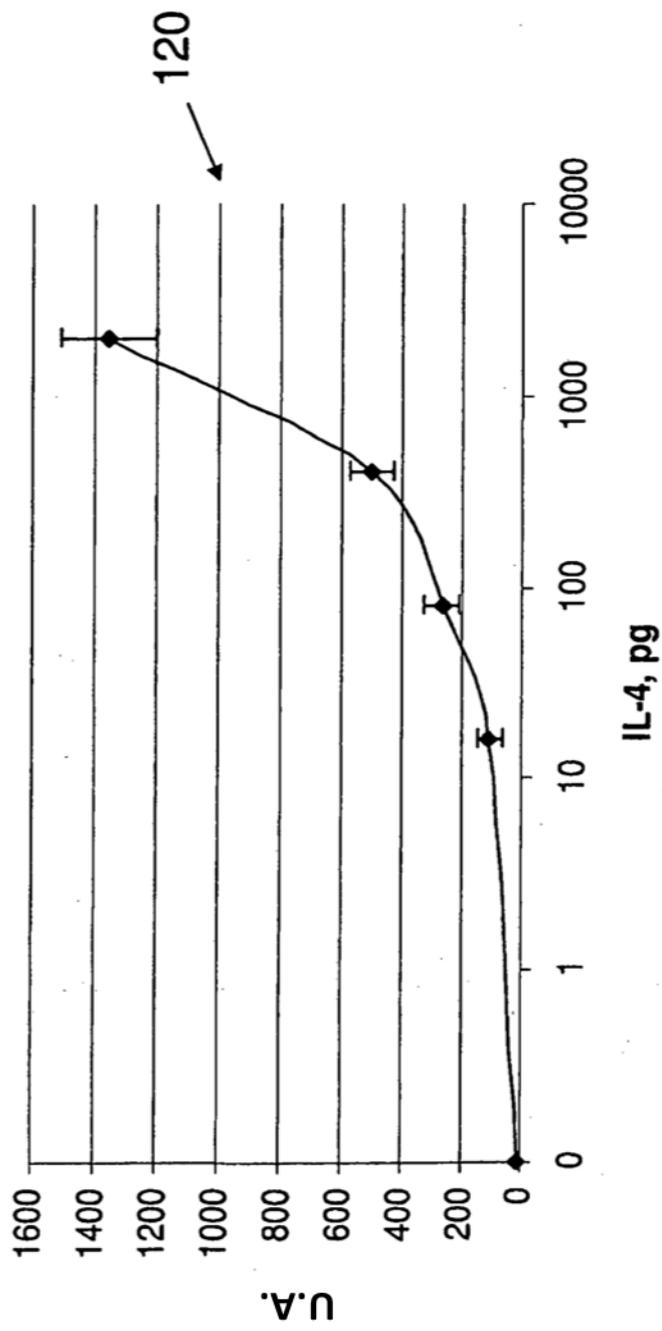
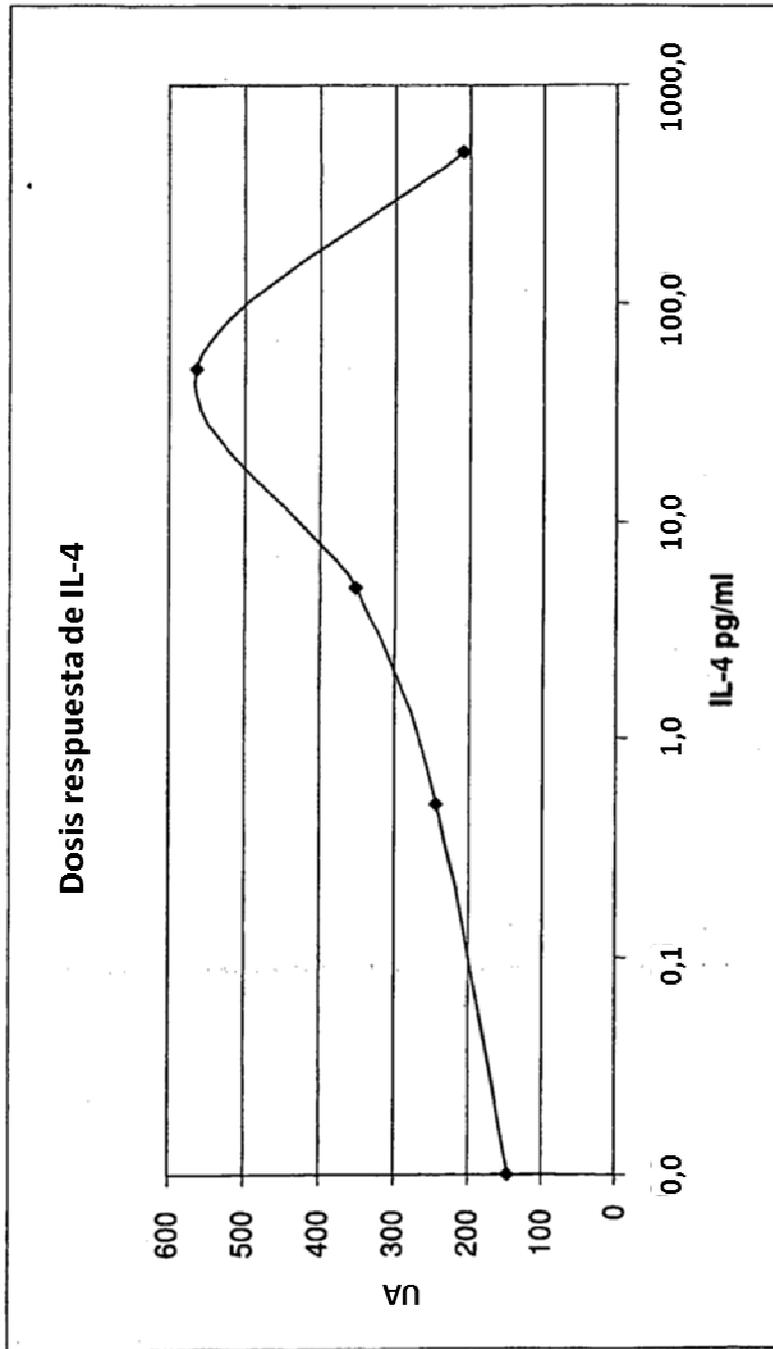


FIG. 12



130

FIG. 13

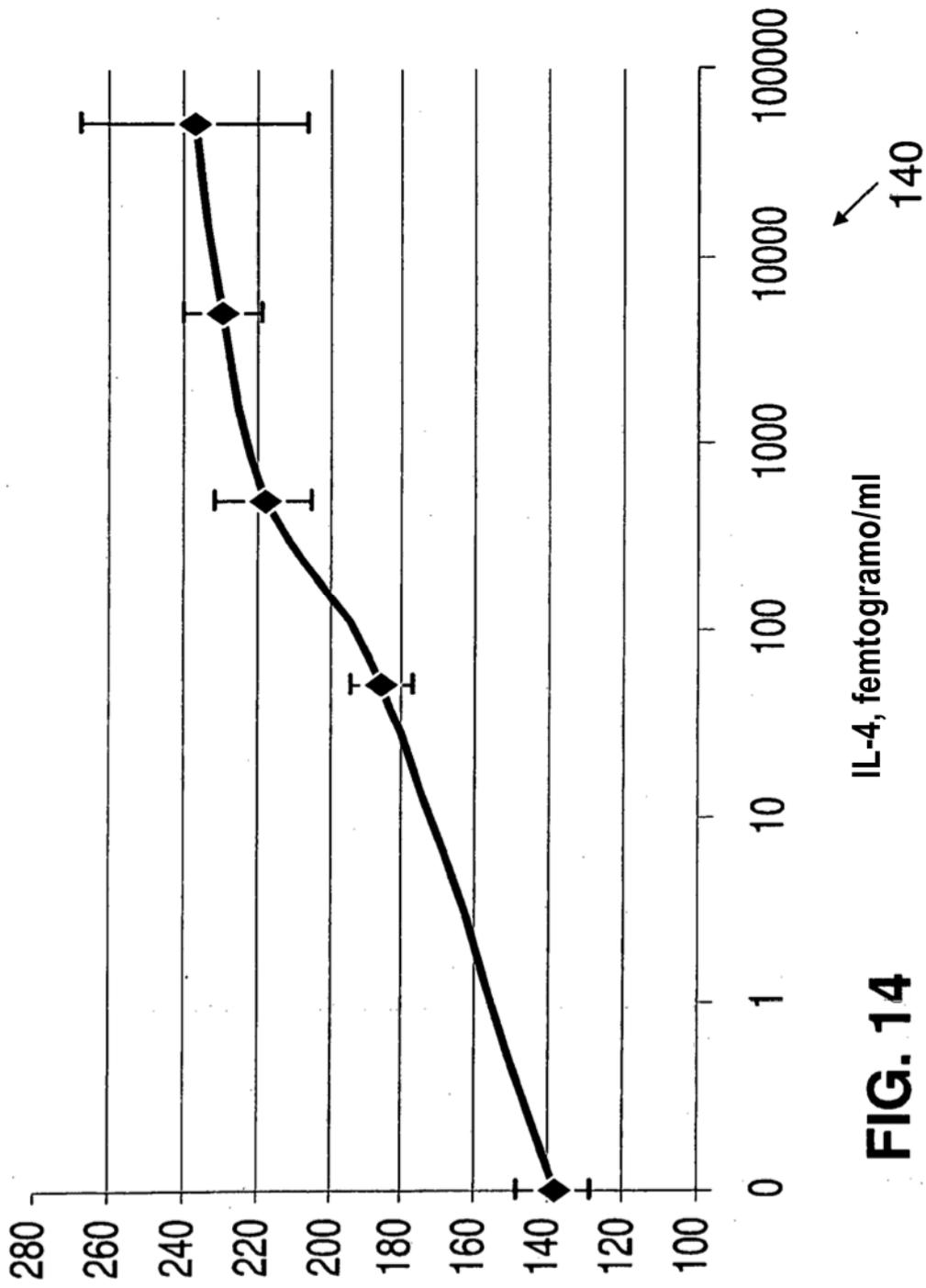


FIG. 14

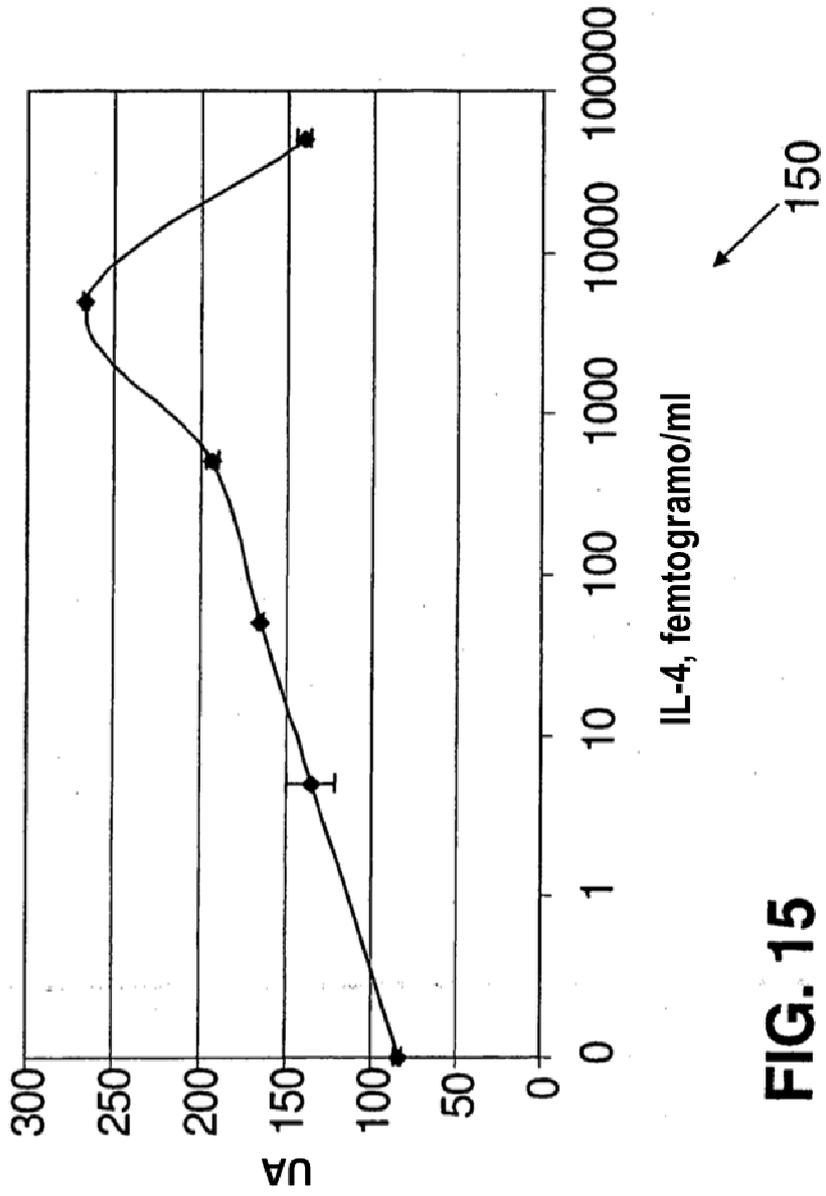


FIG. 15

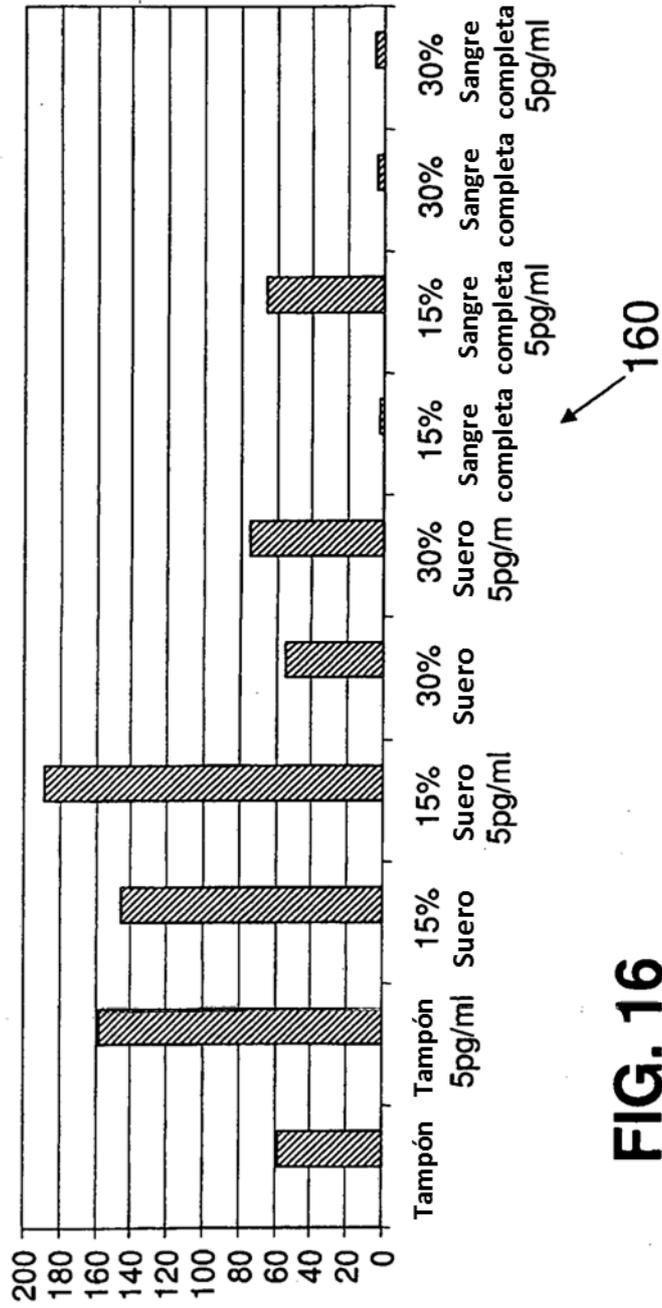


FIG. 16

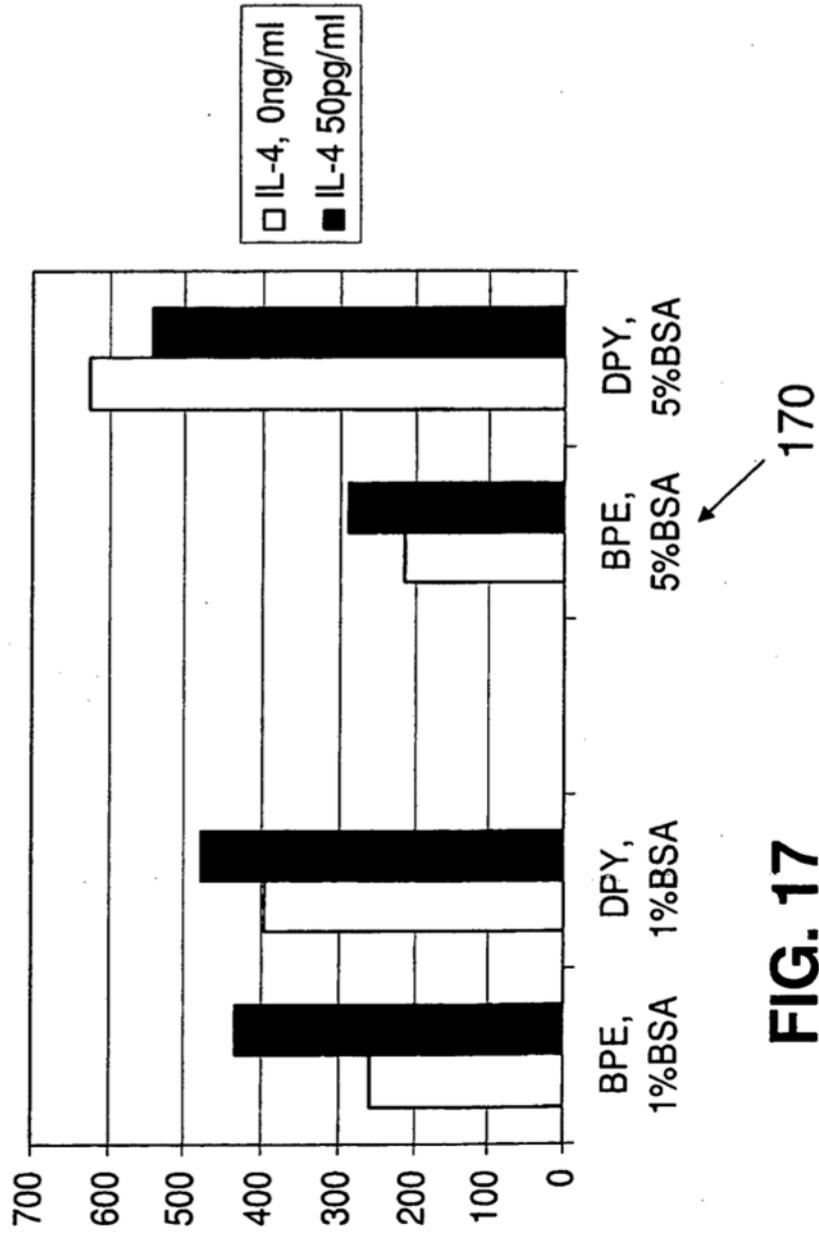


FIG. 17

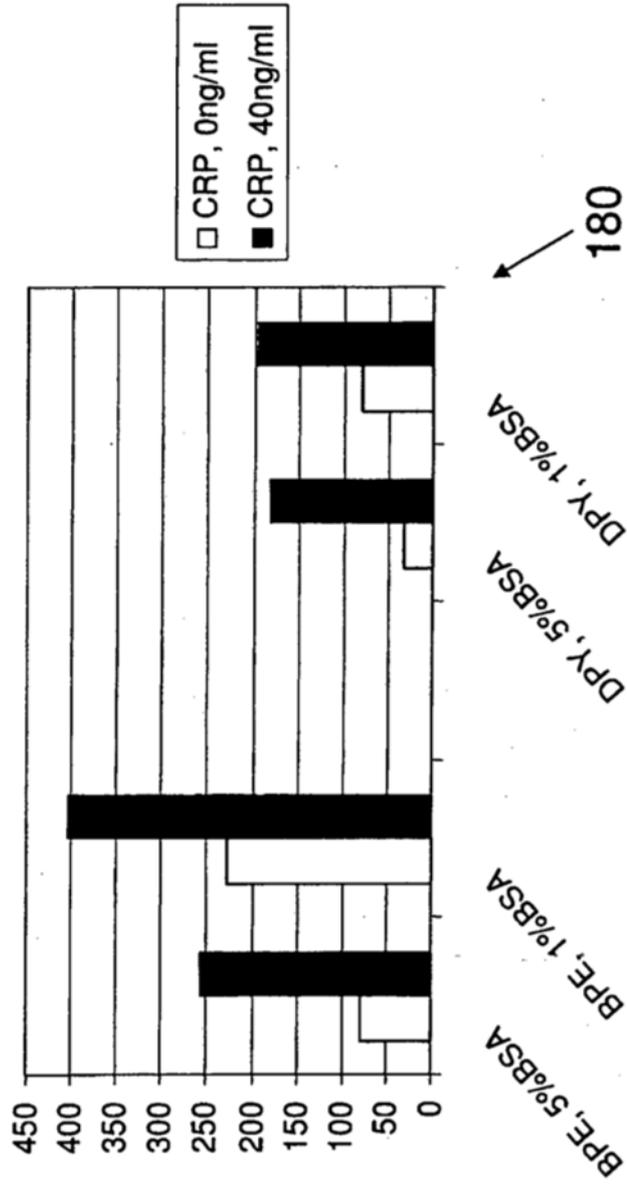


FIG. 18

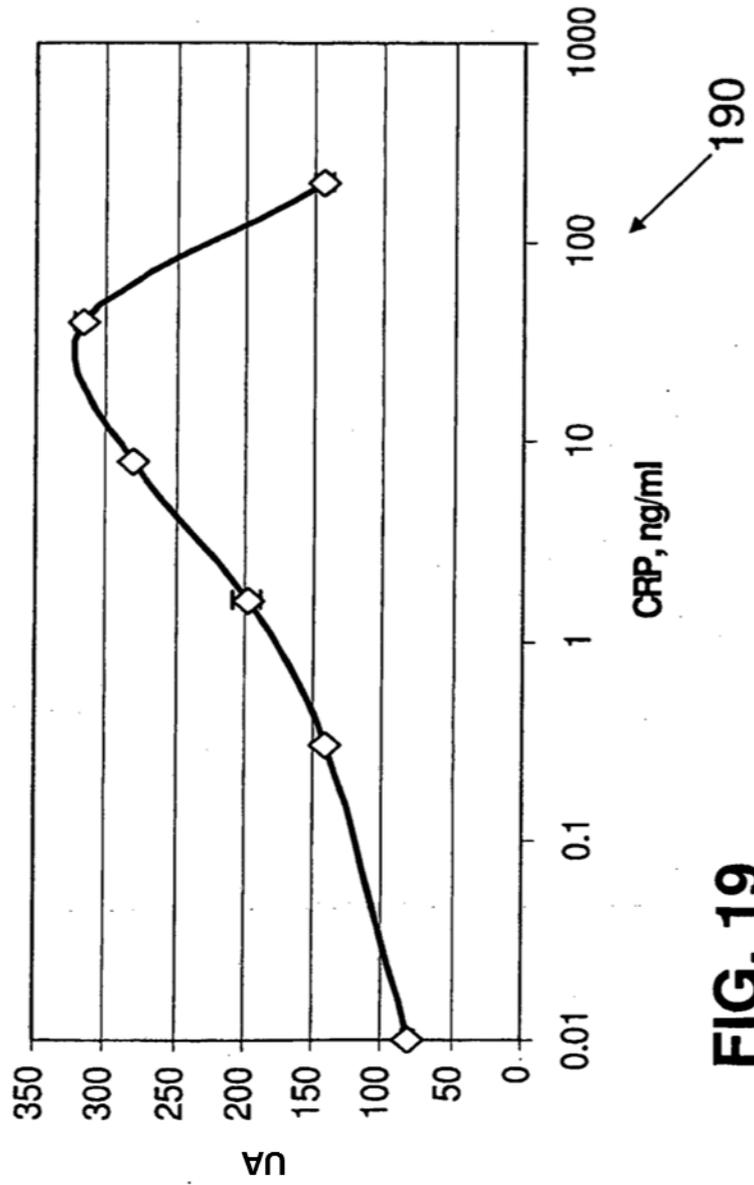


FIG. 19

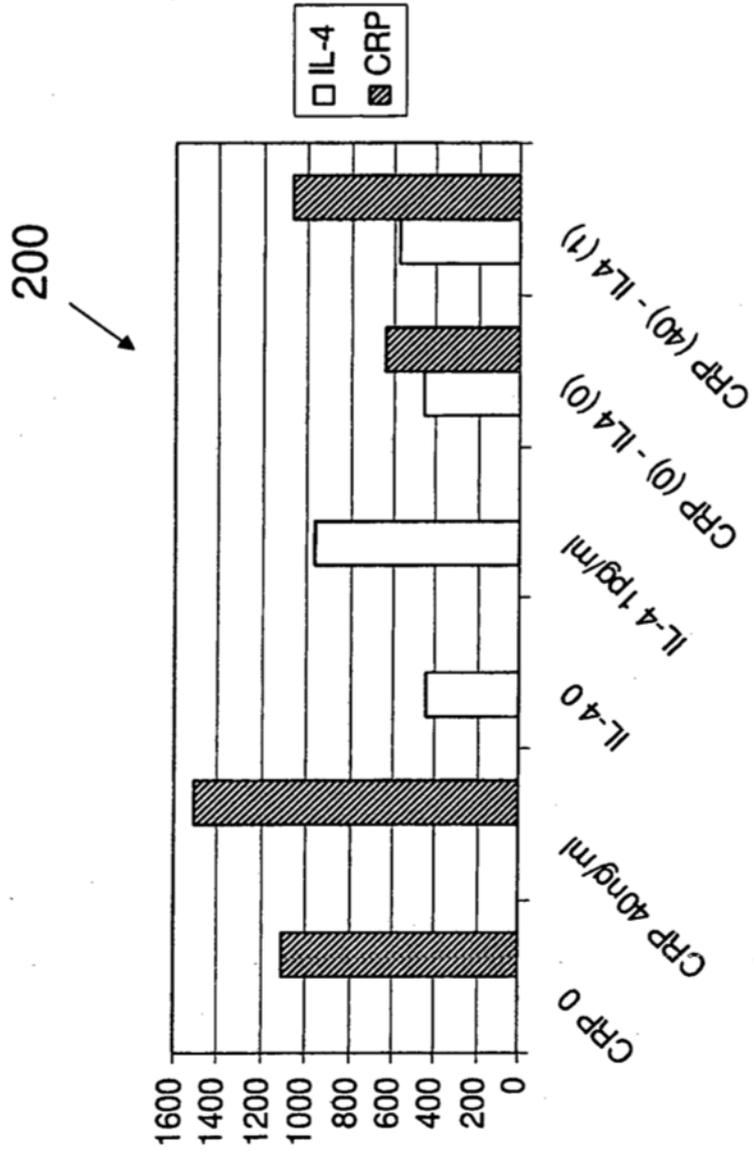


FIG. 20

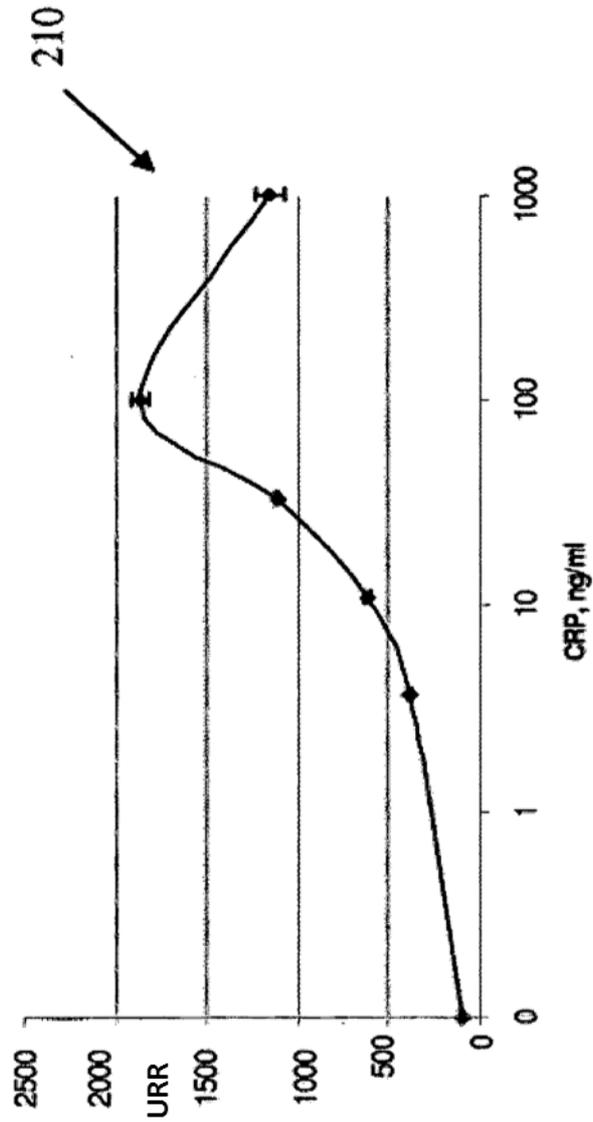


FIG. 21

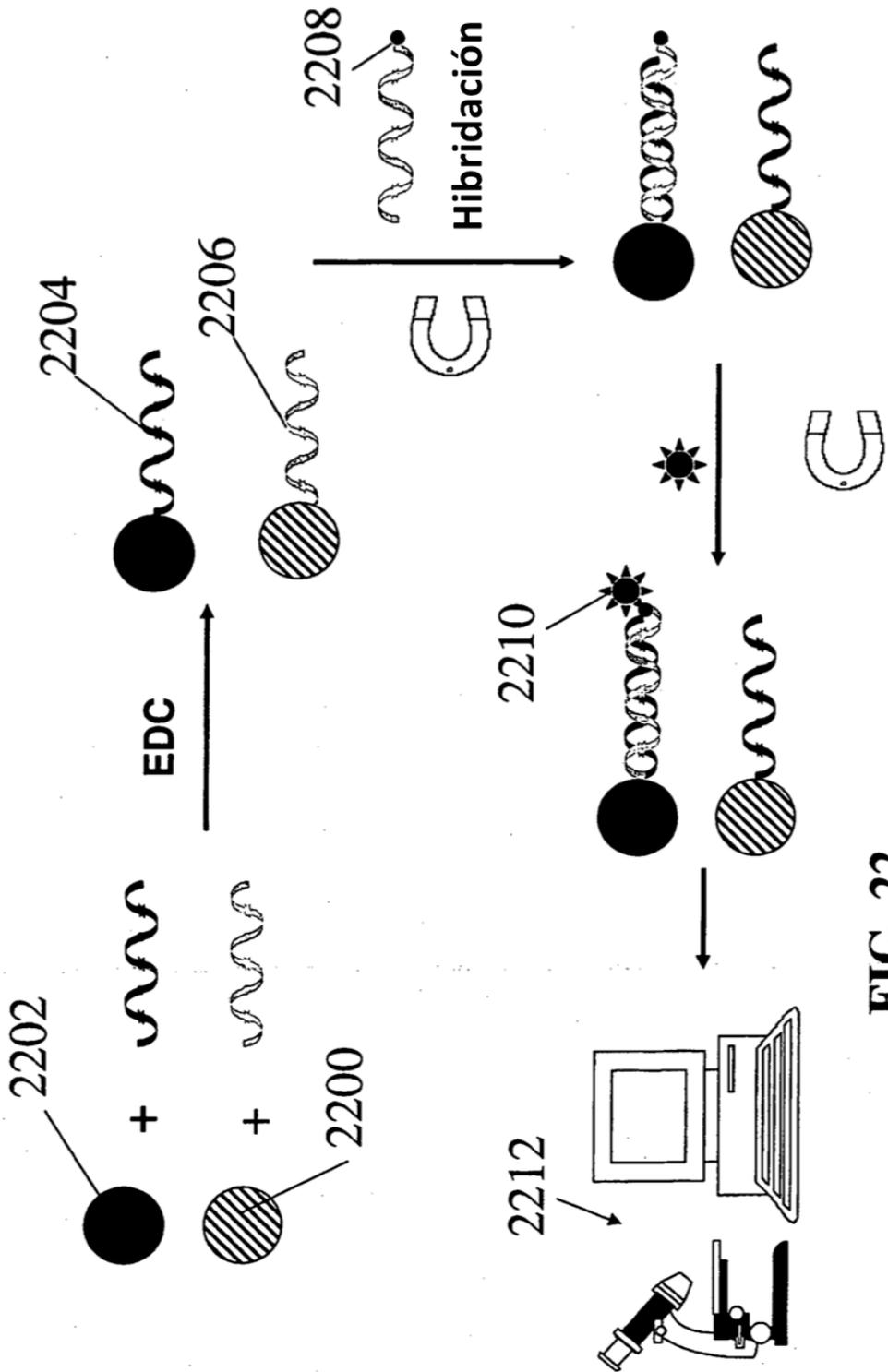


FIG. 22

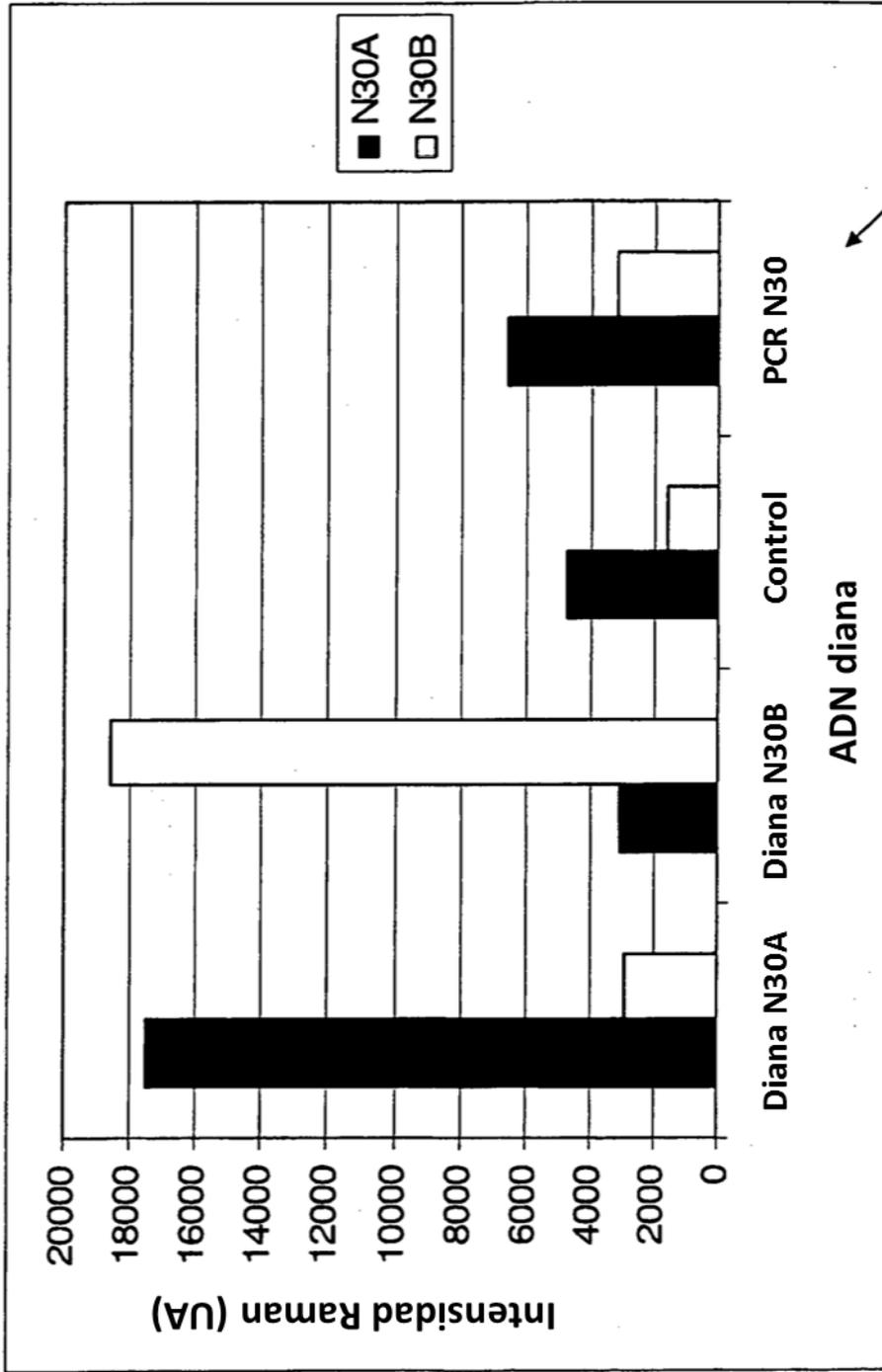


FIG. 23

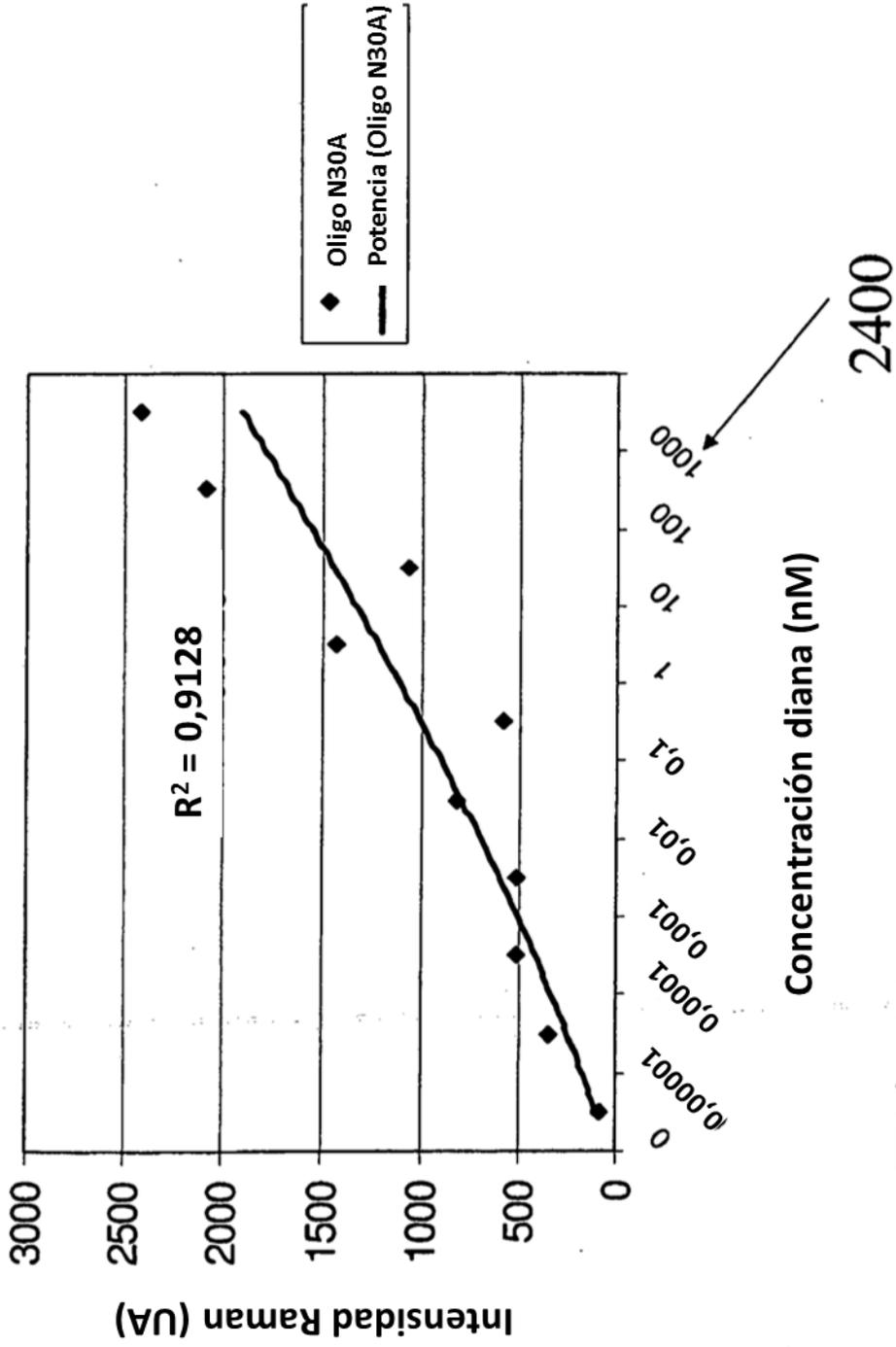


FIG. 24

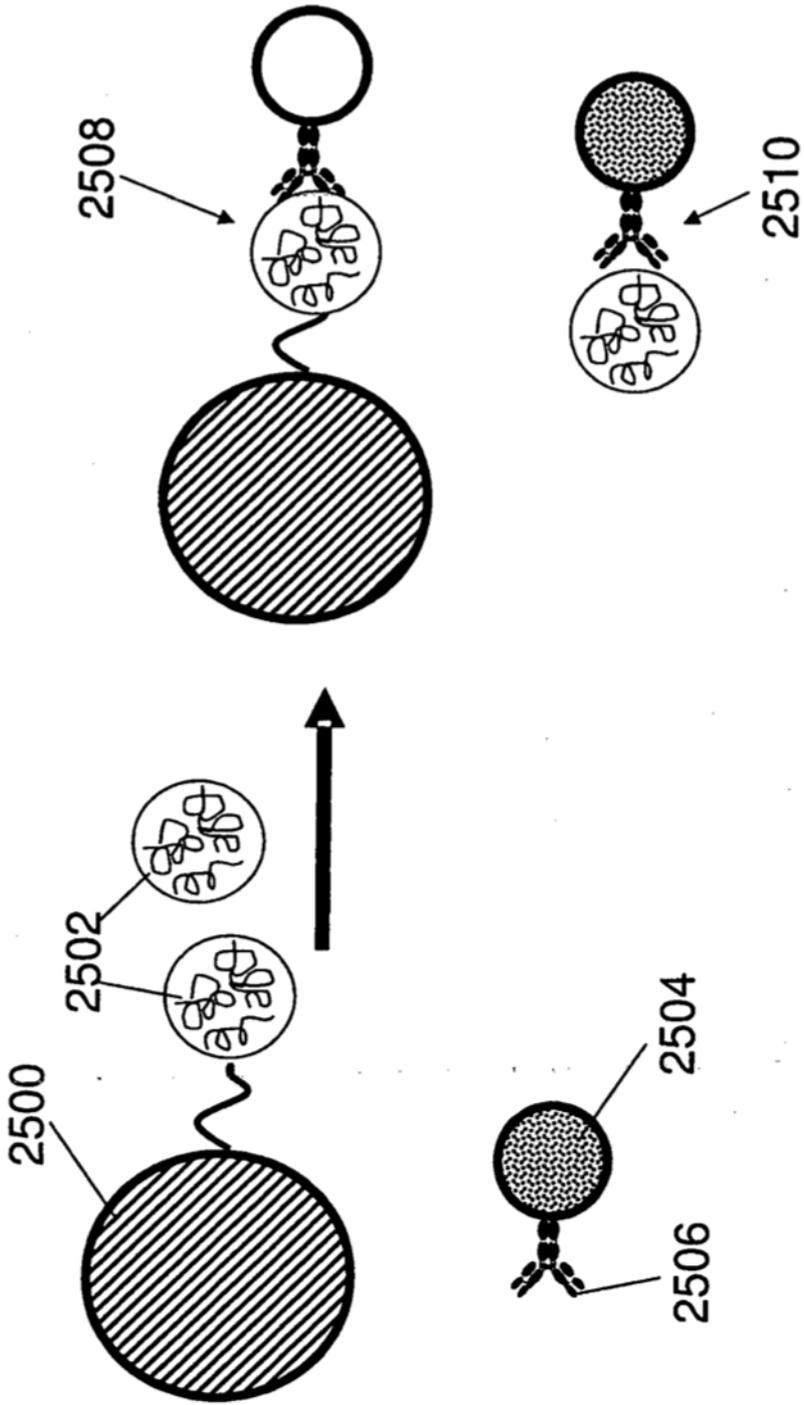


FIG. 25A

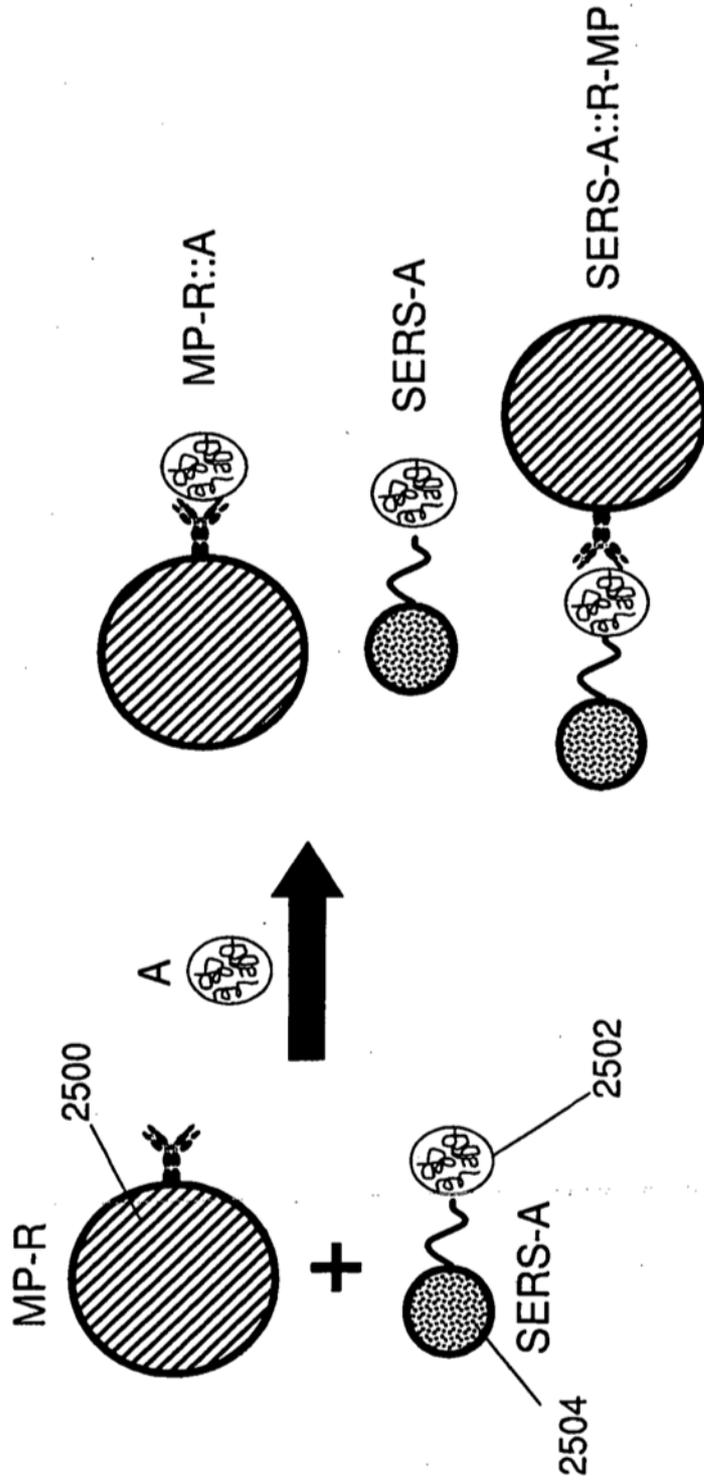


FIG. 25B

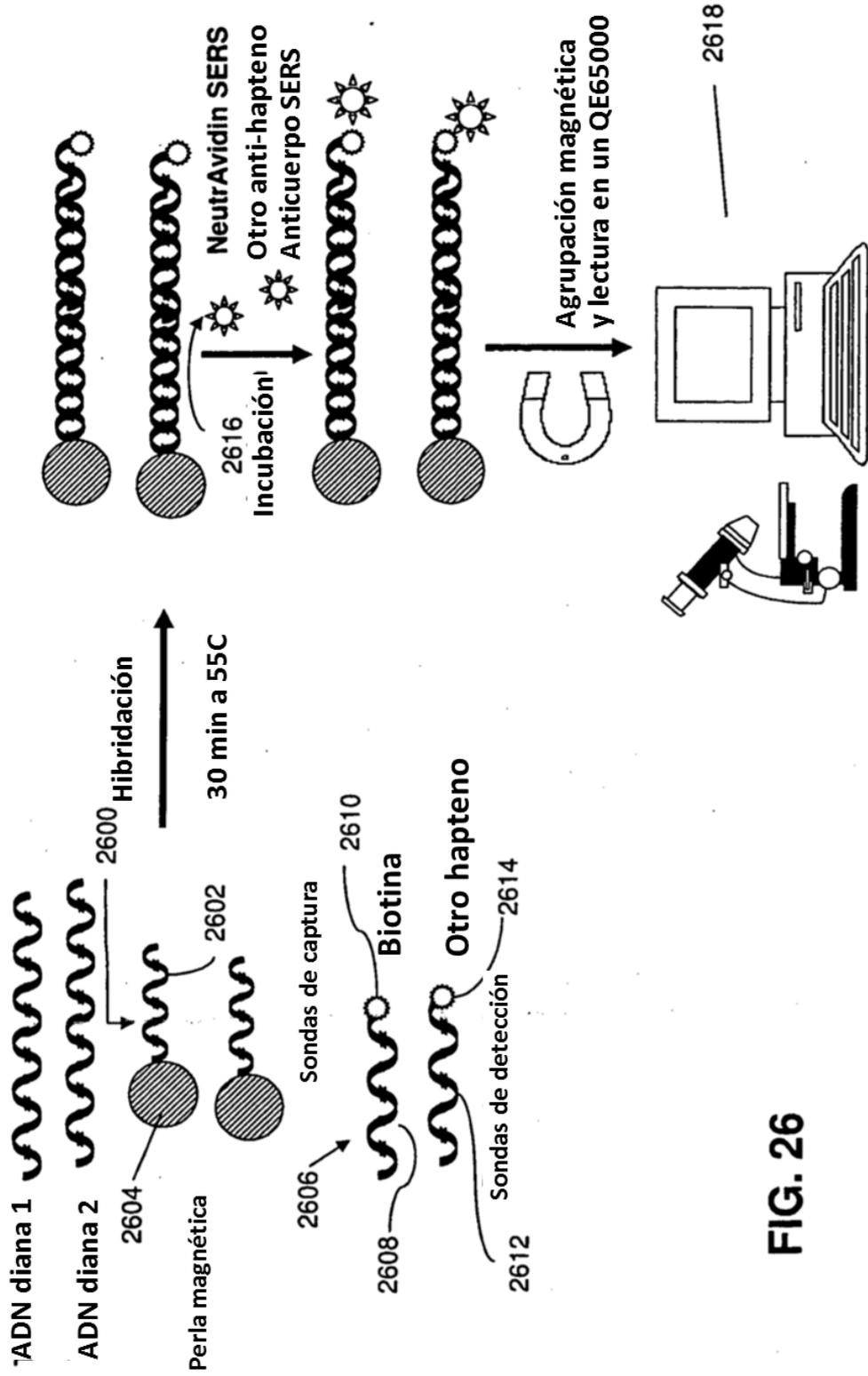
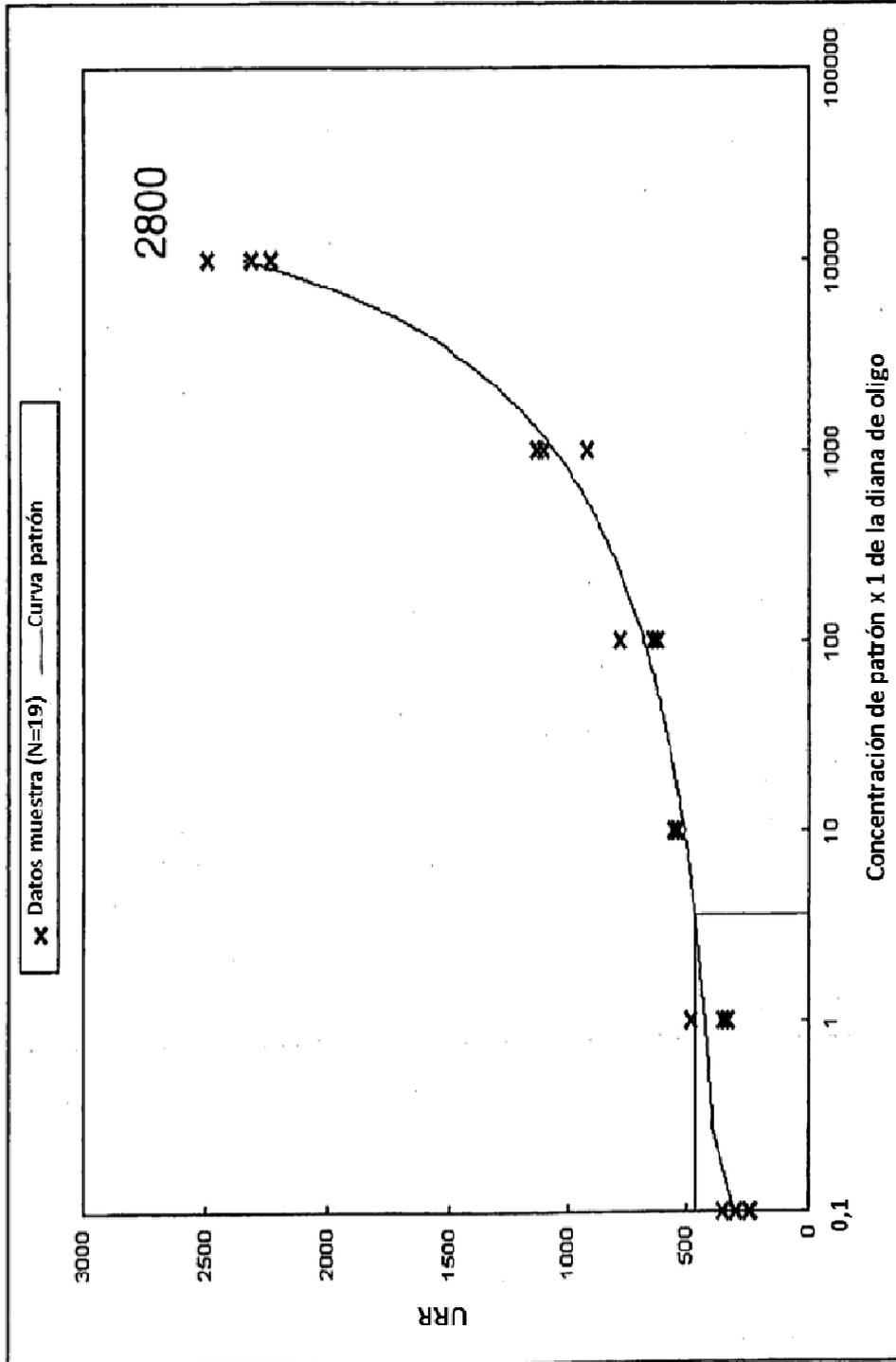


FIG. 26

CGTACGTC AAGTAGTCGCATGAGATCTGACCAGATATGTTAAGGTTGCAGCTCTCTTTGAATATA
 ATTATCATTTCATTACGTTATTGTTACGTTTATCCGGTGC CGCTAAACGCCGCTCCTTCAGGG
 GGTGGAGATGTCAAGAATAAGTATCGTATGGTGC CAAGGAGTATTGTTGTAATATGAAAATA
 ATTATTTTAGAGTGCTAACTTTTCTTTGTTATCTTTTCAGTTAATGTGGTTCGGAAGGAATTA
Sonda B1
CCTTAGACTTCTCGACTGCA AAGACGTAGTAGATTCGCTG AATGCAATCGCTCGCAATAGG
Sonda B2
TACTCCATTACAGACTATTTCATCAGGAGGTACGTCCTTACTGATGATTGATAGTGGCACAGGG
 GATAATTTGTTGCAGTTGATGTCAGAGGGATAGATCCAGAGGAAGGGCGGTTTAATAATCTAC
 GGCTTATTGTTGAACGAATAATTTATATGTGACAGGATTTGTTAACAGGACAAATAATGTTTTT
 ATCGCTTTGCTGATTTTCACATGTTACCTTTCCAGGTACAACAGCGGTTACATTTGCTGGTGAC
 AGTAGCTATACCCAGTTACAGCGTGTGCAGGGATCAGTCGTACGGGATGCAGATAAATCGC
 CATTGCTGACTACTTCTTATCTGGATTTAATGTCGCATAGTGGAACTTACTGACGCAGTCTGT
 GGCAAGAGCGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGCTGAAGCTTTACGTTTTTCGGCAAATACAG
 AGGGGATTTTCGTACAACACTGGATGATCTCAGTGGCGTCTTATGTAATGACTGCTGAAGATG
 TTGATCTTACATTGAAGTGGGAAGGTTGAGTAGTGTCTGCCTGATTCATGACAAAGACTCT
 GTTCGGTAGGAAGAAATTTCTTTTGGAAAGCATTAAATGCAATTTCTGGGAAGCGTGGCATTAACT
 GAATTTGTCATCATGCATCGCGAGTTGCCAGAATGGCATCTGATGAGTTTCCCTTCTATGTGTC
 CGGCAGATGGAAGAGTCCGTGGGATTACGCACAATAAAAATTTGTGGATTTCATCCACTCTGGG
 GGCAATTTCTGATGGCAGAACTATTAGCAGTTGAGGGGTAAAATGAAAAAACATTTAATAG
 CTGCATCGCTTTCATTTTTTTCAGCAAGTCCGCTGGCGACGCCTGATTGTGTAACCTGGAAAGGT
 GGAGTATACAAAATAATAATGATGACGATACCTTTACAGTTAAAGTGGGTGATAAAGAATTTTAC
 CAACAGATGGAATCTTCAGTCTCT

FIG. 27



Datos generados a partir de *E. coli* patrón x1 de la diana de oligo. LOD es 3,4 pM con una confianza del 99,7%

FIG. 28

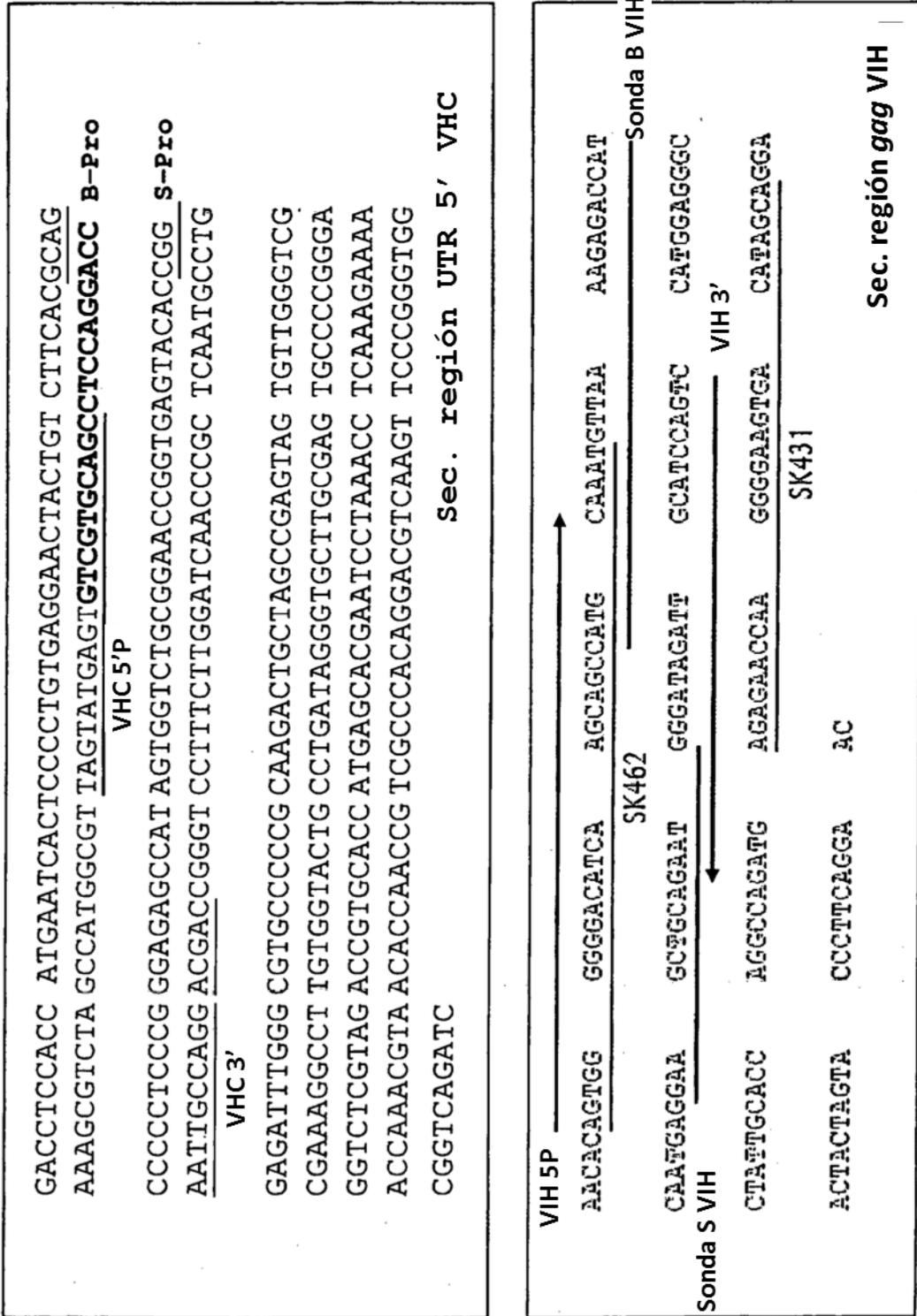
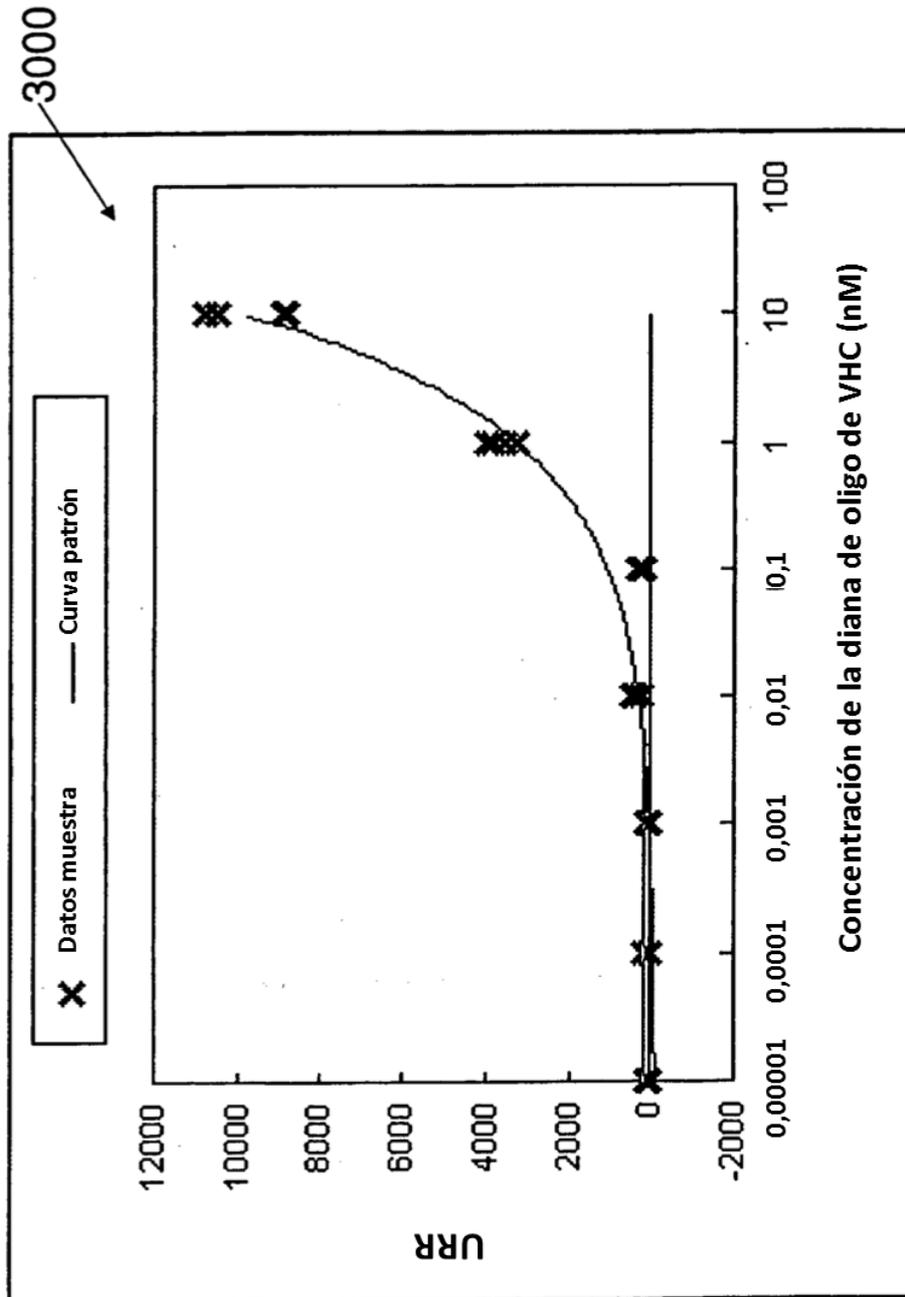
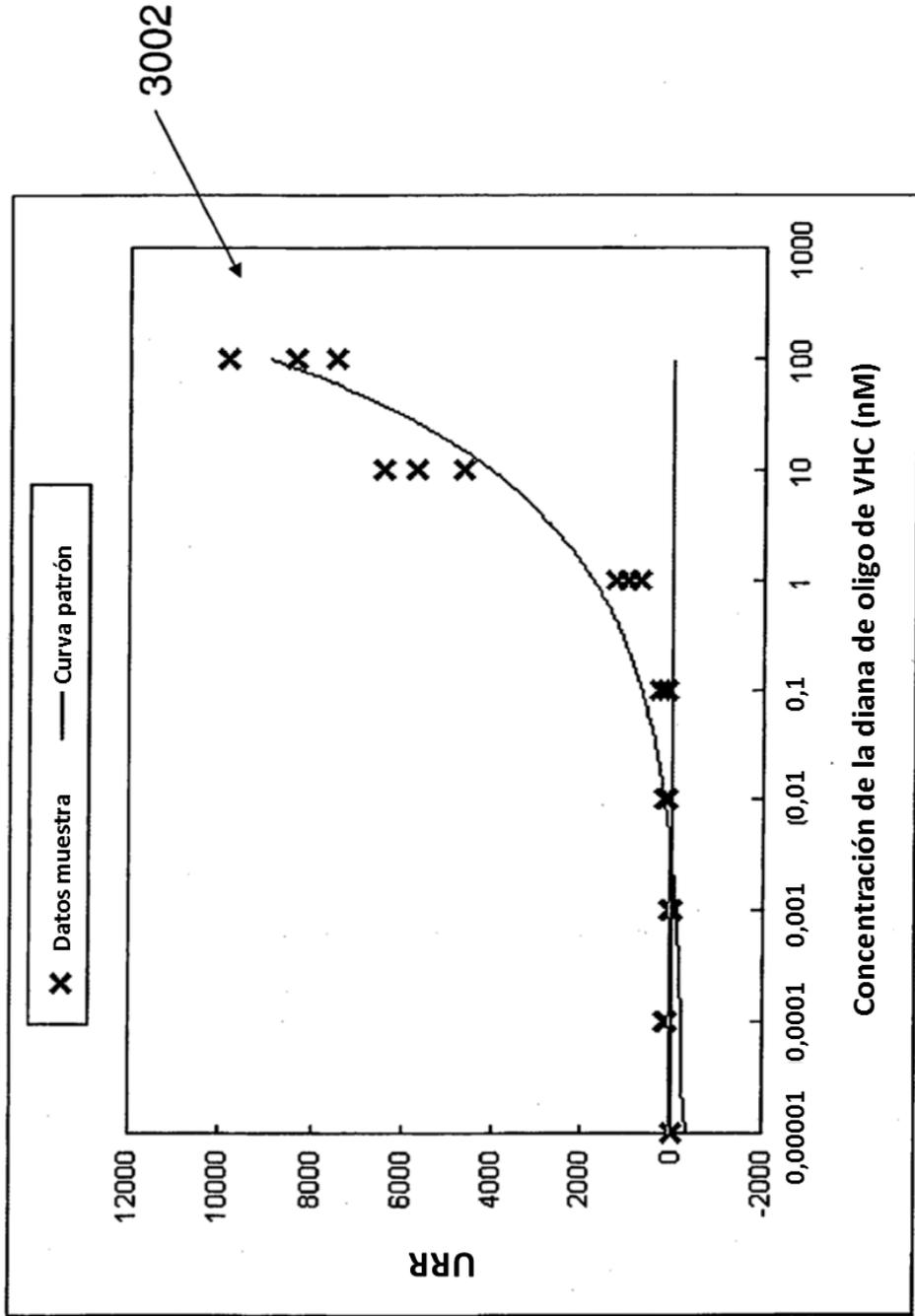


FIG. 29



LOD 4,1 pM

FIG.30 Parte 1 de 2



LOD 3,7 pM **FIG.30 Parte 2 de 2**

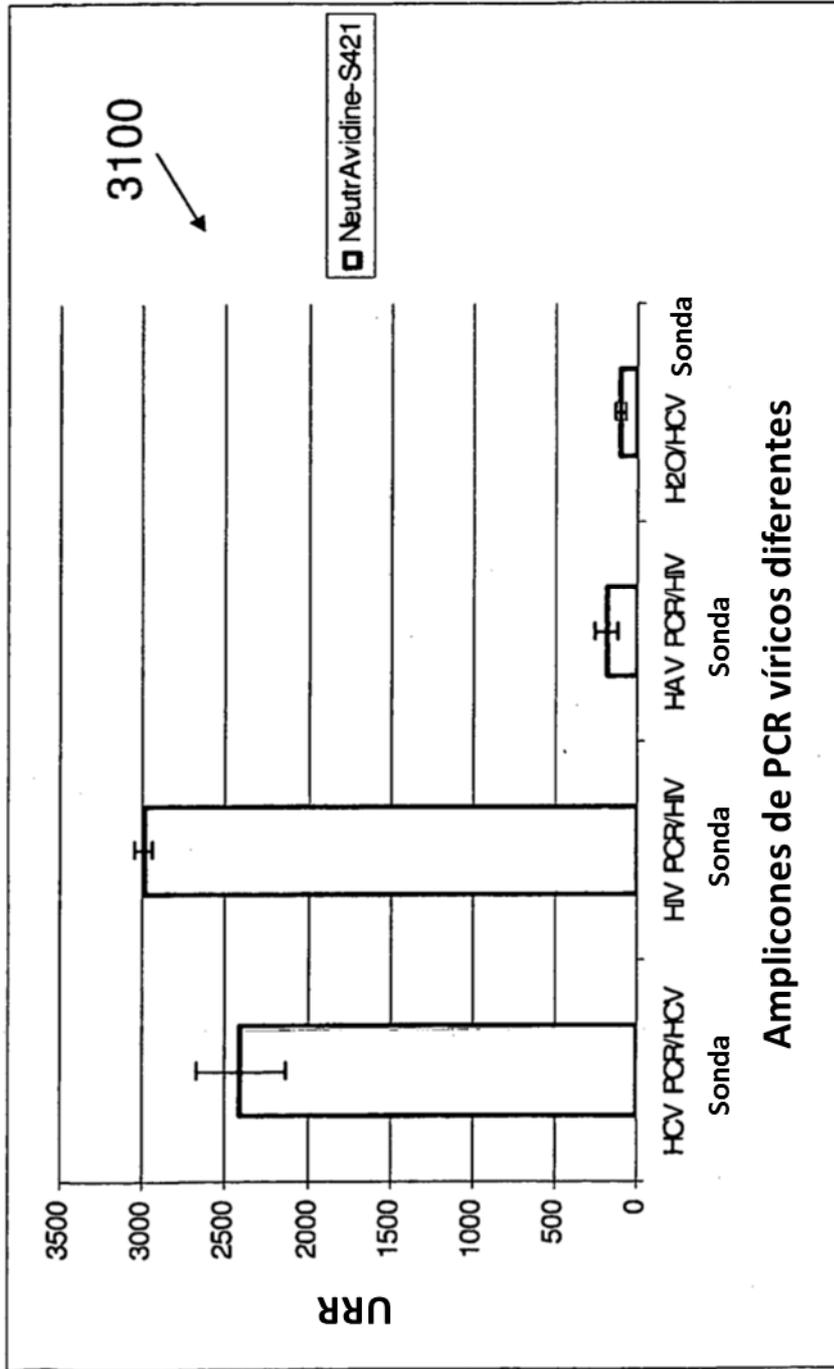
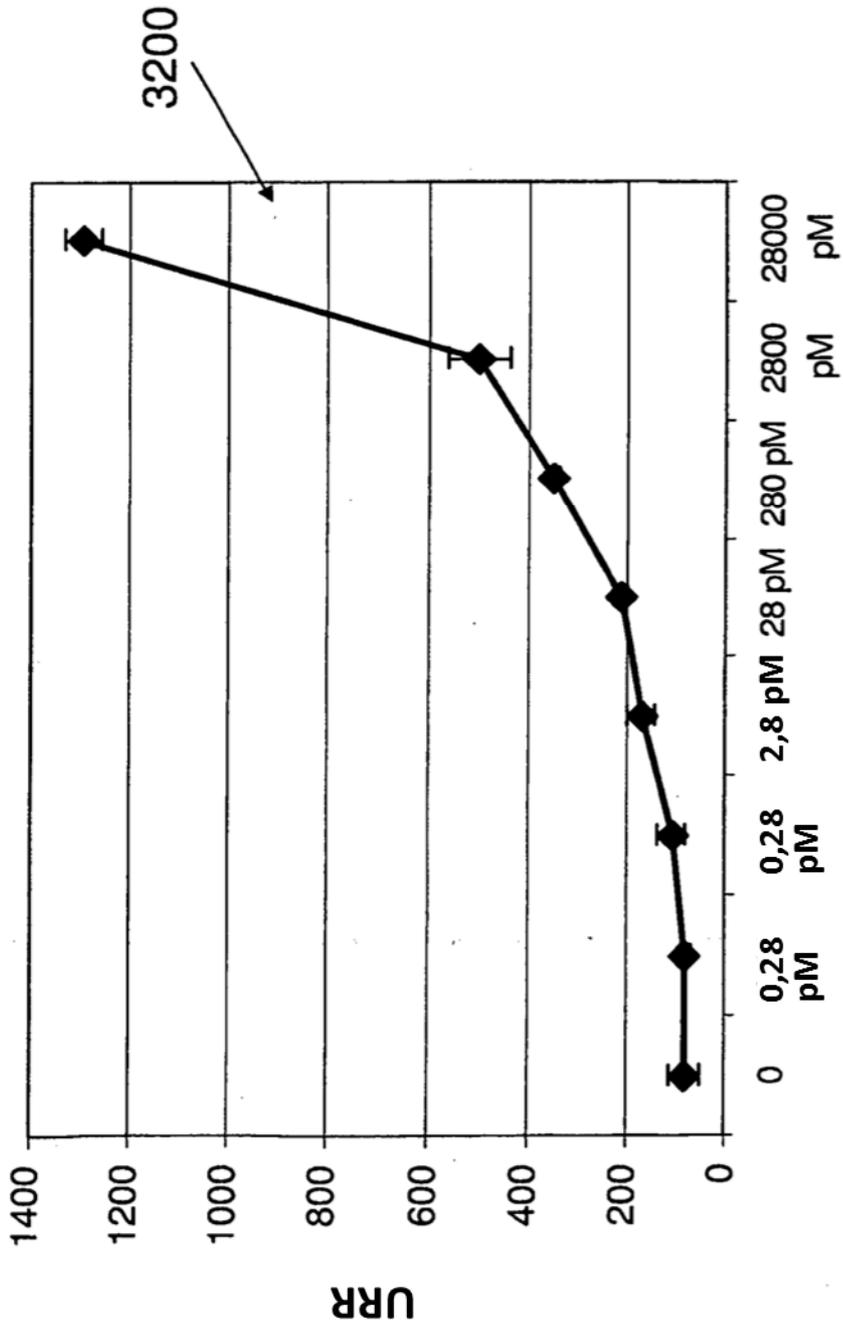


FIG. 31



Dilución en serie del producto de RT-PCR de VIH

FIG. 32

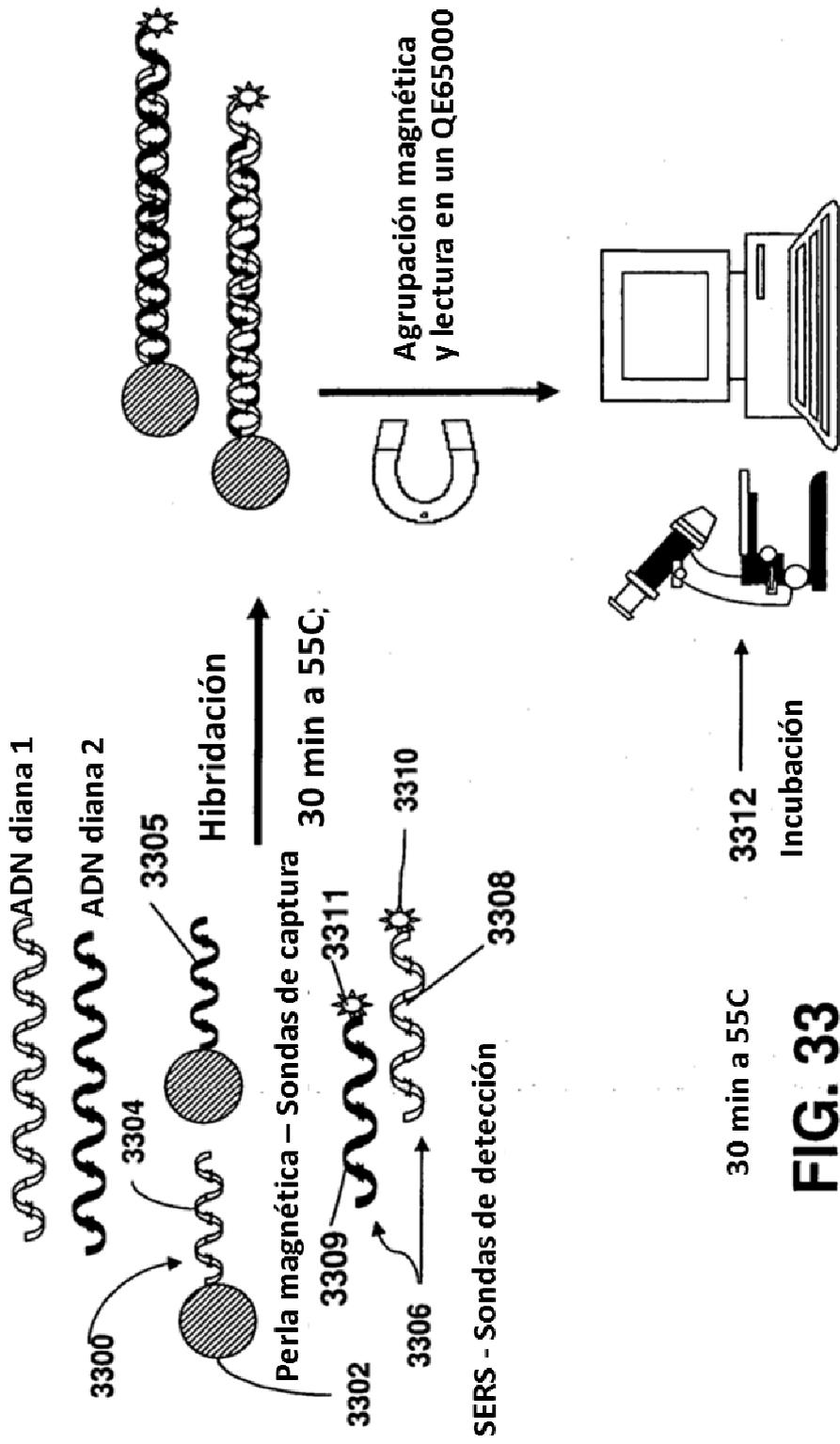
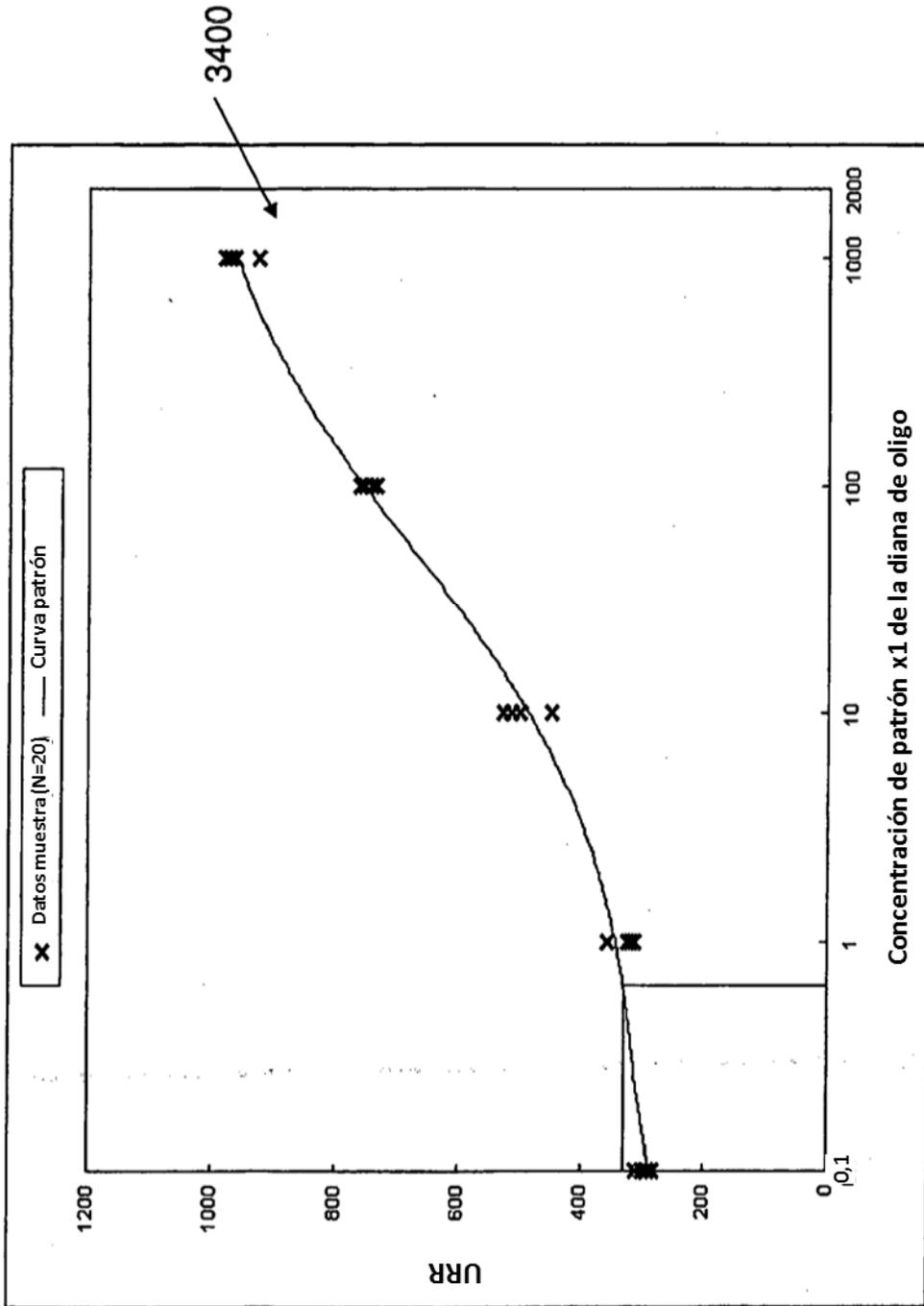


FIG. 33



Datos generados a partir de E. coli patrón x1 de la diana de oligo. LOD inferior a 10 pM

FIG. 34

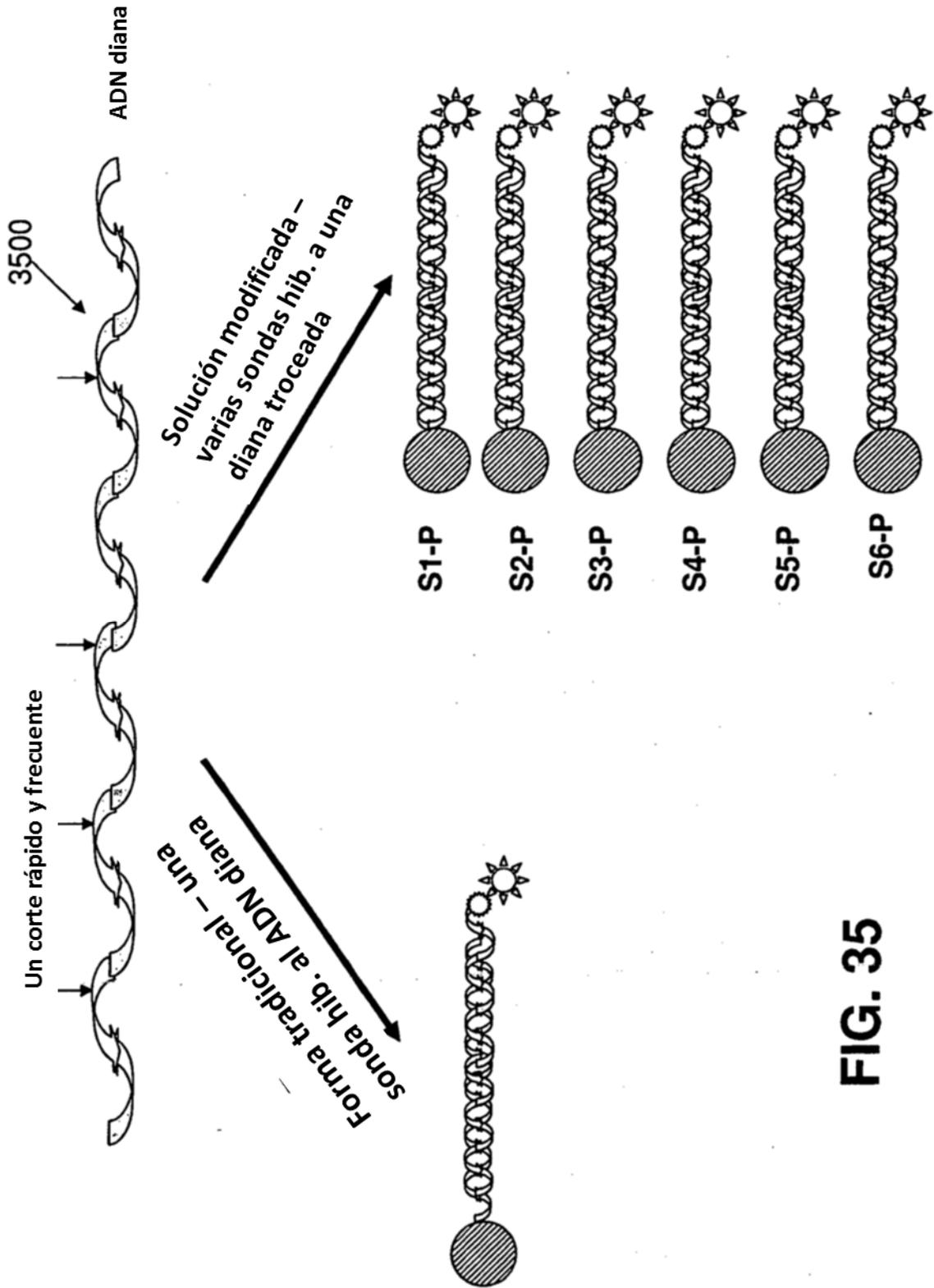


FIG. 35

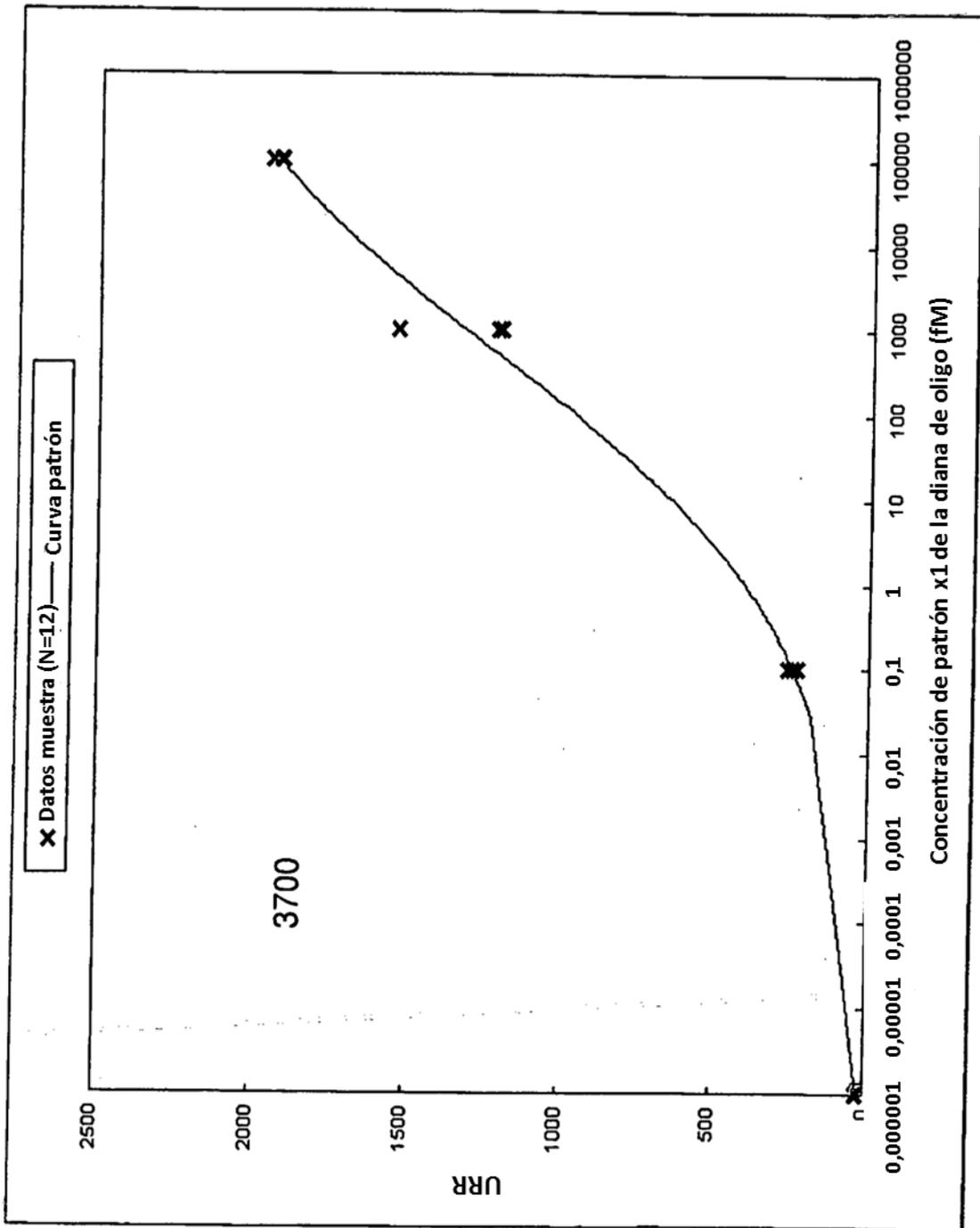


FIG. 37

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2004007767 A [0007]
- WO 2005113817 A [0007]
- US 6514767 B [0007] [0013] [0014]
- US 6861263 B [0014]
- US 0761878 W [0111]
- US 60771766 B [0111]
- US 60832917 B [0111]
- US 60870963 B [0111]

10

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • The Immunoassay Handbook. Nature Publ, 2001 [0004]
- LU-YAO et al. *J Natl Cancer Inst.*, 2003, vol. 95, 1792-1797 [0005]
- 20 • *Genomic Health's Oncotype Dx Breast Cancer Assay*, 2005, www.genomichealth.com [0005]
- MULVANEY et al. *Langmuir*, 2003, vol. 19, 4784-4790 [0013]
- 25 • RAMAN SCATTERING. The Raman Effect; A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules. John Wiley & Sons Ltd, 2002 [0013]
- Modern Techniques in Raman Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, 1996 [0013]
- 30 • Analytical Applications of Raman Spectroscopy. Blackwell Science Ltd, 1999 [0013]
- MOSKOVITS. *Rev. Mod. Phys.*, 1985, vol. 57, 783-826 [0013]
- 35 • OTTO et al. *J. Phys. Cond. Mat.*, 1992, vol. 4, 1143-1212 [0013]
- CAMPION ; KAMBHAMPATI. *Chem. Soc. Rev.*, 1998, vol. 27, 241-249 [0013]
- TIAN et al. *J. Phys. Chem. B*, 2002, vol. 106, 9463-9483 [0013]
- 40 • EMORY et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 8009-8010 [0013]
- MOYER et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, 5409-5410 [0013]
- 45 • NIE ; EMORY. *Science*, 1997, vol. 275, 1102-1106 [0013]
- KNEIPP et al. *Phys. Rev. Lett.*, 1997, vol. 78, 1667-1670 [0013]
- 50 • MICHAELS et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, 9932-9939 [0013]
- XU et al. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, vol. 83, 4357-4360 [0013]
- GOULE et al. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, 1918-1923 [0013]
- *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 7961 [0018]
- MUCIC et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 12674 [0018]
- JACKSON et al. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2004, vol. 101 (52), 17930-5 [0018]
- TALLEY et al. *Nano Letters*, 2005 [0018]
- ASLAM ; DENT. *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences*. Grove's Dictionaries Inc, 1998 [0019]
- KRICKA. *Microchips, microarrays, biochips and nanochips - personal laboratories for the 21st century*, 2005, <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol12no4/vol12no4a2.htm> [0073]
- MACBEATH ; SCHREIBER. *Science*, 2000, vol. 289, 1760-1763 [0073]
- KUSNEZOW ; HOHEISEL. *J. Molecular Recognition*, 2003, vol. 16, 165-176 [0073]
- NEMZEK et al. *J. Immunol. Methods*, 2001, vol. 255, 149-157 [0073]
- HERMANSON. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 1996 [0073]
- LEE et al. *Bioconj. Chem.*, 2002, vol. 13, 97-103 [0074]
- LE BERRE et al. *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31, e88 [0074]
- *Bioclone Magnetic Particles*, 2005, <http://www.bioclone.com/functional-magnetic-paramagnetic-NH2-COOH-silica-epoxy-IDA-beads.html> [0075]