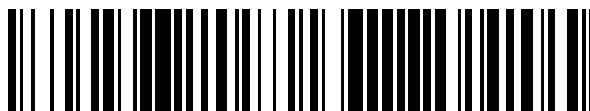


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 717**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

C09B 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08770267 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2152319**

54 Título: **Colorantes del infrarrojo cercano como indicadores de la dispersión raman potenciada en la superficie**

30 Prioridad:

06.06.2007 US 942329 P

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 BECTON DRIVE
FRANKLIN LAKES, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**BHAT, RAJENDRA, R.;
DILLMORE, W., SHANNON;
THOMAS, JOSEPH y
SHERMAN, DOUGLAS, B.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 535 717 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

Colorantes del infrarrojo cercano como indicadores de la dispersión raman potenciada en la superficie

Campo técnico

5 La materia objeto descrita en la presente solicitud se refiere a colorantes en el infrarrojo cercano y a su uso como moléculas indicadoras de la dispersión Raman potenciada en la superficie (SERS).

Antecedente

10 Cuando una molécula se irradia con fotones de una frecuencia concreta, los fotones se dispersan. La mayoría de los fotones incidentes se dispersan elásticamente sin cambio en la frecuencia (dispersión de Rayleigh), mientras que una pequeña fracción de fotones incidentes (aproximadamente 1 de cada 10) interactúa con un modo de vibración de la molécula irradiada y se dispersan inelásticamente. Los fotones dispersados inelásticamente cambian de frecuencia y tienen tanto una frecuencia mayor (anti-Stokes) como una frecuencia más baja (Stokes). Al representar gráficamente la frecuencia de los fotones dispersados inelásticamente frente a su intensidad se observa un único espectro Raman de la molécula. La baja sensibilidad de la espectroscopía Raman convencional, sin embargo, ha limitado su uso para caracterizar muestras biológicas en las que el analito o analitos diana está presente normalmente en pequeñas cantidades.

15 Cuando una molécula activa Raman se adsorbe sobre o está en cerca de por ejemplo, en aproximadamente 50 Å de, una superficie metálica, se puede potenciar la intensidad de una señal Raman procedente de la molécula activa en Raman. Esta potenciación se refiere al efecto de dispersión Raman potenciado en la superficie (SERS). El efecto SERS se notificó en primer lugar en 1974 por Fleishman et al. que observaron una dispersión Raman intensa procedente de piridina adsorbida en un electrodo de plata de superficie rugosa. Véase Fleishman et al., "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chem. Phys. Lett.*, 26, 163 (1974); véase también Jeanmaire, D. L. y Van Dyne, R. P., "Surface Raman spectroelectrochemistry. 1. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines absorbed on anodized silver electrode." *J Electroanal. Chem.*, 84(1), 1-20 (1977); Albrecht, M. G. y Creighton, J. A. "Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode," *J.A.C.S.*, 99, 5215-5217 (1977). Como desde entonces se ha observado el SERS en numerosas moléculas diferentes adsorbidas sobre la superficie de superficies metálicas. Véase, por ejemplo, A. Campion, A. y Kambhamtpati, P., "Surface-enhanced Raman scattering," *Chem. Soc. Rev.*, 27, 241 (1998).

20 La magnitud de la potenciación de SERS depende de numerosos parámetros, incluyendo la posición y la orientación de diversos enlaces presentes en la molécula adsorbida con respecto al campo electromagnético en la superficie metálica. Se piensa que el mecanismo por el cual se produce SERS es el resultado de una combinación de (i) resonancias de plasmón superficial en el metal que potencian la intensidad local de la luz incidente; y (ii) formación y transiciones posteriores de complejos de transferencia de carga entre la superficie metálica y la molécula activa en Raman.

25 Se puede observar el efecto SERS con las moléculas activas en Raman absorbidas o en estrecha proximidad con partículas metálicas coloidales, películas metálicas sobre sustratos dieléctricos, y matrices de partículas metálicas, incluyendo nanopartículas metálicas. Por ejemplo, Kneipp et al. han notificado la detección de las moléculas individuales de un colorante, violeta de cresilo, absorbido sobre clústeres agregados de nanopartículas de plata coloidales. Véase Kneipp K. et al., "Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)," *Phys. Rev. Lett.*, 78(9), 1667-1670 (1997). El mismo año, Nie y Emory observaron la señal de espectroscopía Raman potenciada en superficie (SERRS), en donde la resonancia entre la energía de absorción de la molécula activa en Raman y la de la nanopartícula da como resultado una potenciación tan grande como de aproximadamente 10^{10} a aproximadamente 10^{12} , de una molécula colorante adsorbida sobre una nanopartícula de plata individual, donde las partículas variaron de esféricas a de tipo varilla y tenían una dimensión de 100 ciclos. Véase Nie, S., y Emory, S. R., "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering", *Science*, 275, 1102-1106 (1997); Emory, S. R., y Nie, S., "Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles", *Anal. Chem.*, 69, 2631 (1997).

30 Incluso el documento WO 2006/025887 A2 describe compuestos fluoróforos para su uso en biosensores con señal potenciada debido al efecto SERS o SERRS, el uso de la espectroscopía Raman puede estar limitado en ensayos y aplicaciones diagnósticas que requieren una elevada sensibilidad. Por consiguiente, existe necesidad en la técnica de moléculas indicadoras activas en SERS que dan lugar a un aumento de la señal Raman cuando se comparan con las moléculas indicadoras activas en SERS conocidas en la técnica. La materia objeto descrita en la presente solicitud resuelve, en todo o en parte, estas y otras necesidades en la técnica.

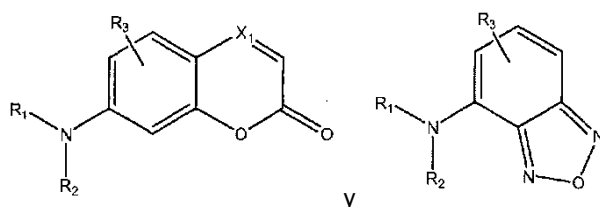
Breve compendio

35 En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona una nanopartícula que comprende una molécula indicadora activa en dispersión RAMAN potenciada en superficie (SERS) de la fórmula:

A—Y

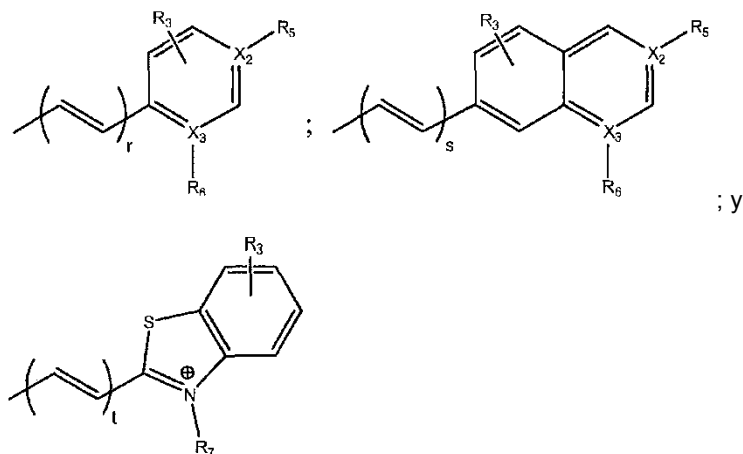
en donde:

A se selecciona del grupo que consiste en:



5 en donde X₁ es CR₄ o N;

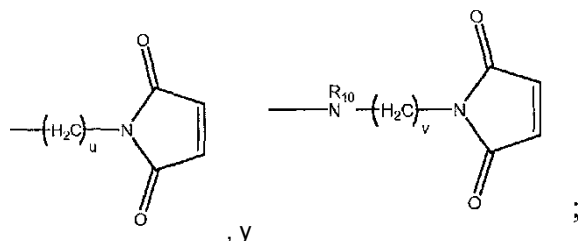
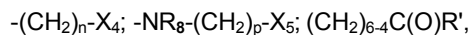
Y se selecciona del grupo que consiste en:



en donde:

10 r, s, son cada uno independientemente un entero de 1:

cada uno de X₂ y X₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en C, S, y N, con la condición que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆ está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z', en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:



en donde:

20 n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

cada uno de X₄ y X₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol;

X₆ es O o NR₁₁;

en donde:

cada $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_8, R_{10}, R_{11}$, y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxicicloalquilo, alcocicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcocicarbonilo;

R_7 es Z' ;

R_9 es $-(CH_2)_m-X_7$ o $-(CH_2)_m-B$, en donde

m es un número entero de 1 a 8;

X_7 es halógeno; y

B es una molécula enlazadora que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar.

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para marcar una molécula, células, perlas, o soportes sólidos, comprendiendo el método: (a) proporcionar al menos una molécula, células, perlas, o soportes sólidos; y (b) unir una partícula a al menos una molécula, células, perlas, o soportes sólidos, en donde la partícula comprende una nanopartícula activa en espectroscopía Raman potenciada en superficie (SERS) que tiene asociada la anterior un colorante de la Fórmula A-Y.

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia o uno o más analitos en una muestra biológica, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra biológica que se sospecha que contiene uno o más analitos; (b) poner en contacto la muestra biológica con un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociadas a las anteriores al menos una molécula enlazadora específica que tiene una afinidad para el uno o más analitos y al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y; (c) iluminar la muestra biológica con radiación incidente a una longitud de onda para inducir a la molécula indicadora activa en SERS a producir una señal SERS; y (d) medir la señal SERS para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos de la muestra biológica.

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia de una o más estructuras diana en una célula de muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una o más células de la muestra con una o más nanopartículas activas en SERS marcadas con una o más moléculas enlazadoras en condiciones adecuadas para la unión de la una o más moléculas enlazadoras a la una o más estructuras diana en una célula de muestra, en donde la nanopartícula activa en SERS tiene asociado con la misma un colorante de Fórmula A-Y que puede producir una señal distinguible en Raman; y (b) detectar una o más señales distinguibles en SERS de la célula de muestra para indicar la presencia de la una o más estructuras diana de la célula de muestra.

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un kit que incluye un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en espectroscopía Raman potenciada en la superficie (SERS) que tienen asociadas a las anteriores al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y.

Por tanto, es un objeto de la materia objeto descrita en la presente solicitud proporcionar una nanopartícula que comprende una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y. Es otro objeto de la materia objeto descrita en la presente solicitud proporcionar un método para marcar una molécula, células, perlas, o soportes sólidos, con una nanopartícula que comprende una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y. Es otro objeto adicional de la materia objeto descrita en la presente solicitud proporcionar un método para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica. Es otro objeto de la materia objeto descrita en la presente solicitud proporcionar un método para detectar la presencia de una o más estructuras diana en una célula de muestra. Es otro objeto de la materia objeto descrita en la presente solicitud proporcionar un kit que incluye un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en espectroscopía Raman potenciada en la superficie (SERS) que tienen asociadas a las anteriores al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y.

Determinados objetos de la materia objeto descrita en la presente solicitud que se han indicado anteriormente en el presente documento, que se resuelven en todo o en parte mediante la materia objeto descrita en la presente solicitud, otros objetos llegarán a ser evidentes a medida que la descripción proceda cuando se toman junto con los Ejemplos y Dibujos que los acompañan como mejor se describe en el presente documento a continuación.

Breve descripción de los dibujo(s)

Habiendo descrito de esta manera la materia objeto descrita en la presente solicitud en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos adjuntos, que no están necesariamente dibujados a escala, y en donde:

La Figura 1 muestra un espectro Raman obtenido de una molécula indicadora Raman conocida en la técnica, por ejemplo, *trans*-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE) (línea punteada) y un espectro Raman de un colorante en el infrarrojo cercano descrito en la presente solicitud, por ejemplo, cumarina picolinio (CoPic);

La Figura 2 muestra una comparación de la intensidad Raman observada con moléculas Raman no fluorescentes y colorantes comerciales adsorbidos en nanopartículas de oro esféricas de 60-nm. La Figura 2A muestra la intensidad Raman de moléculas Raman no fluorescentes adsorbidas en nanopartículas de oro de 60 nm. La Figura 2B muestra la intensidad Raman de colorantes comerciales adsorbidos en nanopartículas de oro de 60 nm;

- 5 Las Figuras 3 A y 3B muestran una comparación de la intensidad Raman de moléculas indicadoras Raman comerciales y colorantes comerciales (Fig. 3A) y los colorantes en el infrarrojo próximo descritos en la presente solicitud (Fig. 3B) adsorbidos en nanopartículas de oro esféricas;

La Figura 4 muestra estructuras químicas de las realizaciones representativas de los colorantes en el infrarrojo próximo descritos en la presente solicitud;

- 10 La Figura 5 es un esquema que muestra sondas de DNA inmovilizadas a partículas magnéticas (M) y una nanopartícula activa en SERS mediante un enlazador de polietilenglicol (PEG) de acuerdo con una realización de la materia objeto descrita en la presente solicitud (solo se muestra una sonda por claridad y no está dibujada a escala); y

Las Figuras 6A-6C muestran los espectros SERS representativos procedentes de los ensayos de captura magnética descritos en la presente solicitud;

- 15 La Figura 6A muestra los espectros SERS de un tubo de muestras vacío (línea sólida) y de nanopartículas activas en SERS revestidas de oligonucleótidos (línea punteada) en ausencia del ADN diana, en donde el oligonucleótido se ha unido directamente a las nanopartículas activas en SERS y las partículas magnéticas, respectivamente, mediante asociaciones de biotina-estreptavidina; y

- 20 Las Figuras 6B y 6C muestran espectros SERS representativos de nanopartículas activas en SERS revestidas de oligonucleótidos en ausencia de ADN diana, en donde los oligonucleótidos se han unido a nanopartículas activas en SERS y a partículas magnéticas, respectivamente, mediante una molécula enlazadora de polietilenglicol. La Figura 6C presenta los mismos datos que la Figura 6B en una escala más estrecha. La línea punteada de la Figura 6C representa el espectro SERS de un tubo de muestras vacío y las líneas sólidas representan la señal del ensayo.

Descripción detallada

- 25 Se describirá la materia objeto descrita en la presente solicitud de forma más completa a continuación en el presente documento con referencia a los dibujos que la acompañan, en los cuales se muestran algunas pero no todas las realizaciones de la materia objeto descrita en la presente solicitud. Muchas modificaciones y otras realizaciones de la materia objeto descrita en la presente solicitud se le ocurrirán a una persona experta en la técnica a la que pertenece la materia objeto descrita en la presente solicitud aprovechando las enseñanzas presentadas en las anteriores descripciones y en los dibujos asociados. Por tanto, debe entenderse que la materia objeto descrita en la presente solicitud no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas y que se pretende que las modificaciones y otras realizaciones se incluyan en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se empleen en el presente documento términos específicos, se usan solo en un sentido genérico y descriptivo y no a fines de limitación.

- 30 Los términos "un", "uno," y "el " se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de muestras, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario (por ejemplo, una pluralidad de muestras), y así sucesivamente.

En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprende", "comprenden" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto si el contexto requiere otra cosa.

- 40 Como se emplea en esta memoria, se entiende que el término "aproximadamente," cuando se refiere a un valor abarca variaciones de, en algunas realizaciones $\pm 50\%$, en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos o emplear las composiciones descritas.

I. Nanopartículas que comprenden moléculas indicadoras activas en SERS en el IR cercano

- 45 La materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona colorantes en el infrarrojo cercano y su uso como moléculas indicadoras activas en SERS, que se denominan también en el presente documento moléculas activas en SERS, colorantes activos en SERS, o marcas activas en SERS. Una "molécula indicadora" se refiere a cualquier molécula o compuesto químico que puede producir un espectro Raman cuando se ilumina con radiación de una longitud de onda adecuada. Una "molécula indicadora" puede denominarse también en el presente documento como una "marca", un "colorante", una "molécula activa en Raman", o una "molécula activa en SERS," cada una de las cuales puede usarse de manera indistinta.

Tal como se detalla en lo sucesivo, la intensidad de la señal SERS observada para los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud cuando se asocian con, es decir, se adsorben o se unen a una nanopartícula es mayor que la observada para las moléculas indicadoras activas en SERS y los colorantes comerciales conocidos en la

materia. Las señales SERS potenciadas observadas para los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud permiten su uso en aplicaciones tales como ensayos diagnósticos utilizando espectroscopía Raman como método de detección, formación de imágenes ópticas de tejidos y células, y otras aplicaciones en las que se requiere una elevada sensibilidad.

- 5 Cuando se usan en un ensayo diagnóstico, las señales SERS potenciadas observadas para los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud permiten la detección de biomarcadores, incluyendo, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, y metabolitos, a concentraciones menores que las mensurables utilizando moléculas indicadoras activas en SERS conocidas en la técnica. Esta mayor sensibilidad es beneficiosa en aplicaciones en las que la señal Raman ha de pasar a través de, es decir, se transmite a través de, un medio complejo, tal como sangre completa o suero.

Además, se pueden requerir ensayos diagnósticos con una sensibilidad mayor por los analitos de interés para la detección temprana de una dolencia o patología en un sujeto.

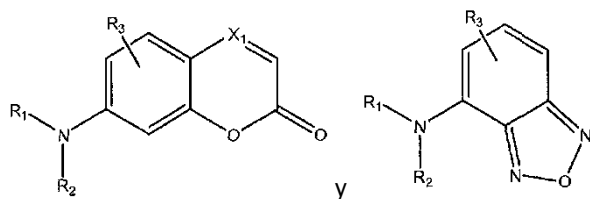
A. Nanopartículas que comprenden moléculas indicadoras activas en SERS en el IR cercano de Fórmula A-Y

- 15 En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona una nanopartícula que comprende una molécula indicadora activa en SERS de la Fórmula:



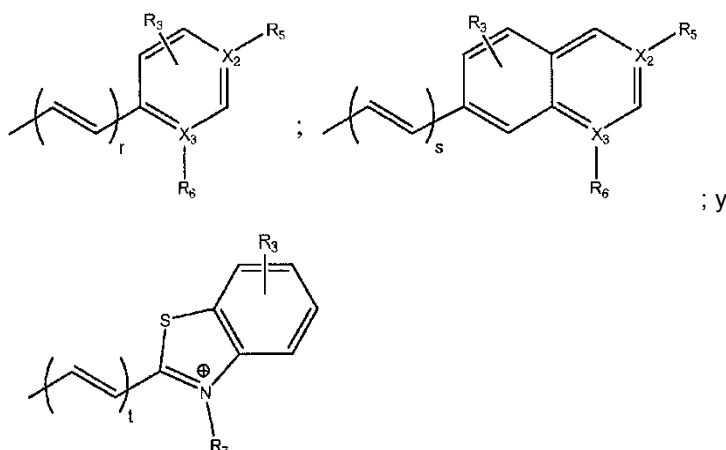
en donde:

A se selecciona del grupo que consiste en:



- 20 en donde X₁ es CR₄ o N;

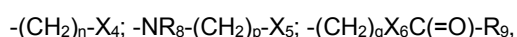
Y se selecciona del grupo que consiste en:

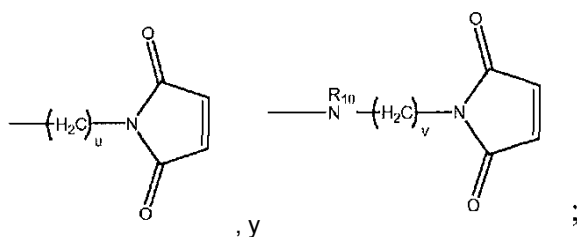


en donde:

- 25 r, s, y t son cada uno independientemente un número entero de 1;

cada uno de X₂ y X₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en C, S, y N, con la condición que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆, está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z' en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:





en donde:

n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

cada uno de X₄ y X₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol;

5 X₆ es O o NR₁₁;

en donde:

10 cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀, R₁₁, y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxícicloalquilo, alcocícicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcocarbonilo;

R₇ es Z';

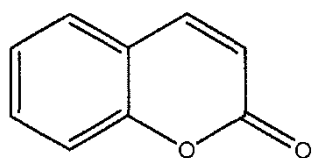
R₉ es -(CH₂)_m-X₇ o -(CH₂)_m-B, en donde

m es un número entero de 1 a 8;

X₇ es halógeno; y

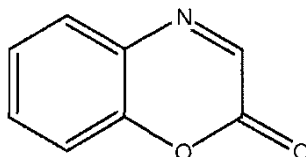
15 B es una molécula enlazadora que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar.

En algunas realizaciones, la variable "A" de fórmula A-Y comprende un núcleo de cumarina, un núcleo de azacumarina, un núcleo de benzodiazol, o sus análogos o derivados. Las estructuras representativas de un núcleo de cumarina, un núcleo de azacumarina, y un núcleo de benzoxadiazol se proporcionan en el presente documento inmediatamente a continuación:



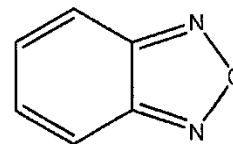
cumarina

;



aza-cumarina

; y



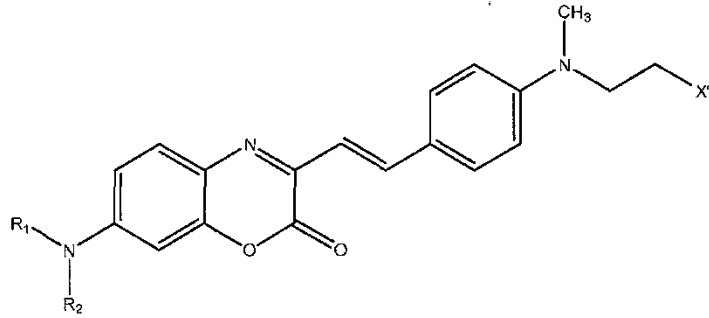
benzoxadiazol

20

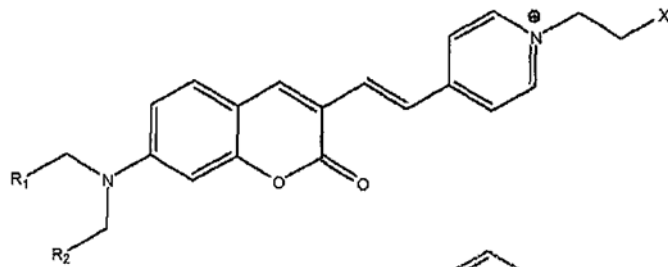
Como se emplea en esta memoria, un "análogo" se refiere a un compuesto químico en el que se han sustituido uno o más átomos individuales o grupos funcionales de un compuesto precursor, tanto con un átomo diferente como con un grupo funcional diferente. Por ejemplo, tiofeno es un análogo de furano, en el que el átomo de oxígeno del anillo de furanilo de cinco miembros está sustituido por un átomo de azufre.

25 Como se emplea en esta memoria, un "derivado" se refiere a un compuesto químico que se deriva o se obtiene a partir de un compuesto precursor y contiene elementos esenciales del compuesto precursor, pero normalmente tiene uno o más grupos funcionales diferentes. Dichos grupos funcionales se pueden añadir a un compuesto precursor por ejemplo, para mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, actividad Raman, y similares, de la molécula, o disminuir la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable de la molécula, y similares. Se entiende que un derivado de un compuesto precursor incluye cualquier modificación química, adición, 30 delección, o sustitución del compuesto precursor. En algunas realizaciones, un derivado de un compuesto precursor puede incluir cualquier producto de reacción del derivado, por ejemplo, el producto de derivado con un resto de aminoácido. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden incluir un colorante de Fórmula A-Y, donde el núcleo de colorante incluye un grupo reactivo que se 35 puede conjugar, por ejemplo, unido covalentemente, a un aminoácido, por ejemplo, un resto aminoácido de una proteína. Un ejemplo no limitante de un derivado es un éster o amida de un compuesto precursor que tiene un grupo funcional ácido carboxílico.

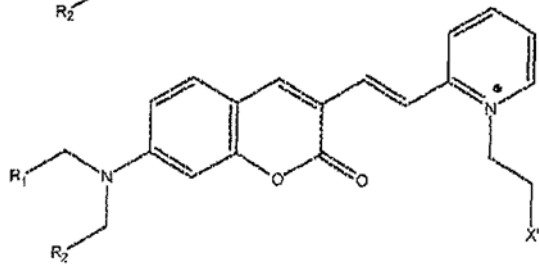
En algunas realizaciones, la molécula colorante indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y se selecciona del grupo que consiste en:



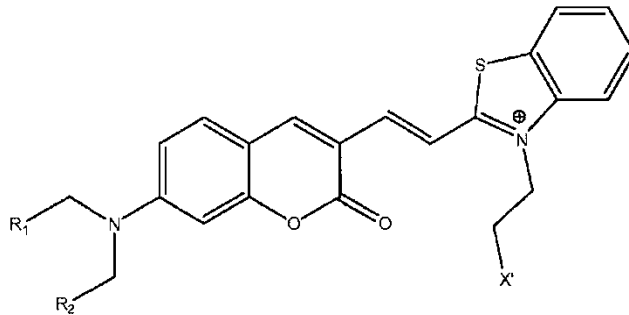
;



;

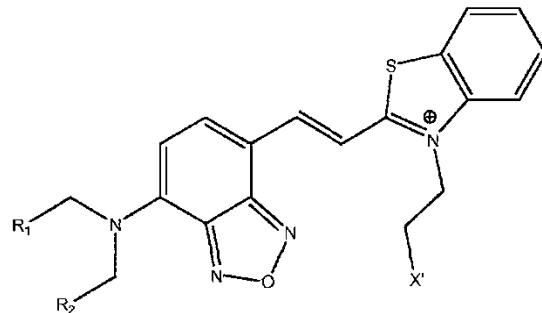


; y



;

5



;

en donde X' incluye hidroxilo, amino, y tiol; y R₁ y R₂ son como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

10 En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden conjugar con un miembro "B" específico de unión de una pareja de unión. El miembro específico de unión se puede conjugar con la molécula indicadora activa en SERS, por ejemplo, un compuesto de fórmula A-Y a través, por ejemplo, de un

grupo tiol que se ha representado por la variable X', o unirse o asociarse de otra manera con la propia nanopartícula. Como se emplea en esta memoria, una molécula enlazadora específica es un miembro de una pareja de unión específica. Una "pareja de unión específica" se refiere a dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas se une específicamente a través de medios químicos o físicos a la segunda molécula. En este sentido, un analito es un miembro recíproco de una pareja de unión específica. Además, las parejas de unión específicas pueden incluir miembros que son análogos de los ligandos específicos originales, por ejemplo, un análogo de analito que tiene una estructura similar al analito. Por "similar" se entiende que, por ejemplo, un análogo de analito tenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 60% o 65%, aproximadamente 70% o 75% de identidad de la secuencia, aproximadamente 80% o 85% de identidad de la secuencia, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de la secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos del analito usando programas de alineación y parámetros normalizados bien conocidos en la materia. Un análogo de un analito puede tener la misma función que un analito.

En algunas realizaciones, la molécula enlazadora es una proteína de unión. Como se emplea en esta memoria, el término "proteína de unión" se refiere a una proteína, que cuando se conjuga con una nanopartícula activa en SERS interactúa con un analito o ligando específico de una manera capaz de producir una señal Raman detectable diferenciable de cuando un analito o ligando diana está presente o ausente, o cuando un analito o ligando diana está presente en concentraciones variables en el tiempo. El término "producir una señal detectable" se refiere a la capacidad de reconocer un cambio en una propiedad de un grupo indicador, por ejemplo, un colorante que se ha descrito actualmente, de una manera que permite la detección de un analito del miembro de unión, por ejemplo, unión de ligando-proteína de unión. Además, la producción de una señal detectable puede ser reversible o no reversible. El acontecimiento de señalización-producción incluye medios continuos, programados, y episódicos, que incluyen aplicaciones de una sola vez o reutilizables. El acontecimiento de señalización-producción reversible puede ser instantáneo o puede ser dependiente del tiempo, siempre que se establezca una correlación con la presencia o concentración del analito.

Dichas realizaciones se pueden usar como biosensor. Como se emplea en esta memoria, los términos "biosensor" y "compuesto biosensor" se refieren generalmente a un compuesto que experimenta un cambio detectable en la respuesta específica a un ligando o a un analito diana. Más particularmente, los biosensores descritos en la presente solicitud combinan las propiedades de reconocimiento molecular de las macromoléculas biológicas, tales como una proteína de unión, con nanopartículas activas en SERS que producen una señal en SERS tras la unión al ligando.

El colorante actualmente descrito de Fórmula A-Y puede estar asociado con por ejemplo, adsorbido, o unido, por ejemplo, mediante enlace covalente, a una nanopartícula. En general, el término "asociado" se refiere a un estado de dos moléculas o de una molécula y una partícula tal como una nanopartícula manteniéndose en proximidad entre sí. Como se proporciona con más detalle en los Ejemplos los colorantes descritos en la presente solicitud se pueden mezclar en una relación adecuada con una solución de nanopartículas durante unas pocas horas por ejemplo, cuatro a seis horas, durante lo cual el colorante se adsorbe sobre la superficie de la nanopartícula. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que en algunas realizaciones, los colorantes descritos en la presente solicitud se asocian con una nanopartícula a través del nitrógeno cuaternario del catión piridinio, que se representa por la variable "Y."

Los colorantes descritos en la presente solicitud pueden estar funcionalizados de tal manera que el colorante se unirá covalentemente a una nanopartícula. Dichas realizaciones pueden mejorar la estabilidad del colorante en un medio complejo tal como sangre y suero. Como se emplea en esta memoria, el término "unión directa" puede, en algunas realizaciones, referirse a la unión covalente de una molécula indicadora activa en SERS a la superficie de la nanopartícula. Se puede realizar la unión indirecta utilizando un compuesto interviniente, una molécula, o similar. En algunas realizaciones, la molécula indicadora activa en SERS actualmente descrita se puede modificar para incluir un enlazador, tal como un resto que contiene tiol, por ejemplo, la variable X' que se ha descrito anteriormente en la presente memoria, que se puede unir directamente a las nanopartículas, por ejemplo, nanopartículas de oro, mediante métodos conocidos en la técnica o, como se describe con más detalle en los sucesivos, un enlazador de polietilenglicol (PEG). Se pueden usar también otros métodos para asociar la molécula indicadora activa en SERS incluyendo los métodos de unión no covalente conocidos por los expertos en la técnica.

Una nanopartícula potenciadora de Raman que tiene asociada con la anterior por ejemplo, adsorbida o unida a una(s) molécula activa en SERS se denomina en el presente documento nanopartícula activa en SERS. Más particularmente, una nanopartícula activa en SERS, como se cita en la presente memoria, incluye una nanopartícula que tiene una superficie que induce, produce, o da lugar de otra manera a dispersión de luz Raman potenciada en superficie (SERS) o dispersión de luz Raman con resonancia potenciada en superficie. Numerosas superficies son capaces pueden producir una señal SERS, incluyendo superficies rugosas, superficies texturadas, y otras superficies, que incluyen superficies lisas.

"Dispersión Raman" se refiere generalmente a la dispersión inelástica de un fotón incidente en una molécula. Los fotones que se dispersan inelásticamente tienen una frecuencia óptica (ν_i), que es diferente que la frecuencia de la luz incidente (ν_0). La diferencia de la energía (ΔE) entre la luz incidente y la luz dispersada inelásticamente se puede representar como $(\Delta E) = h|\nu_0 - \nu_i|$, donde h es la constante de Planck, y corresponde a las energías que se adsorben por

la molécula. La radiación incidente puede ser de cualquier frecuencia ν_0 , pero normalmente es una radiación monocromática en la región espectral visible. La diferencia absoluta $|\nu_0 - \nu_i|$ es una frecuencia de infrarrojo, por ejemplo, vibratoria. El proceso que produce luz de frecuencia diferente de ν_0 se denomina "Dispersión Raman." La frecuencia ν_i de la radiación "Raman dispersada" puede ser mayor o menor que ν_0 , pero la cantidad de luz con frecuencia $\nu_i < \nu_0$ (radiación de Stokes) es mayor que con la frecuencia $\nu_i > \nu_0$ (radiación anti-Stokes).

Como se emplea en esta memoria, el término "radiación" se refiere a energía en la forma de radiación electromagnética que puede inducir la radiación Raman potenciada en superficie en una muestra sometida a ensayo, por ejemplo, una muestra que contiene una nanopartícula activa en SERS que tiene una o más de las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud asociadas a la anterior. Más particularmente, el término "radiación" se refiere a energía en la forma de radiación electromagnética que da lugar a que la superficie de una nanopartícula induzca, emita, soporte, o produzca de otra forma la dispersión de la luz, por ejemplo, la dispersión Raman, en una molécula indicadora próxima a la superficie de la nanopartícula.

"Dispersión Raman potenciada en superficie" o "SERS" se refiere a un fenómeno que se produce cuando la señal de la dispersión Raman, o la intensidad, se potencia cuando se adsorbe una molécula activa en Raman o próxima, por ejemplo, en aproximadamente 50 Å de, una superficie metálica. En las mencionadas circunstancias, se puede potenciar la intensidad de la señal Raman que surge de la molécula activa en Raman. "Dispersión Raman de resonancia potenciada en superficie" o "SERRS" se refiere a una señal SERS que se produce cuando la molécula indicadora está próxima a la superficie de la nanopartícula activa en SERS que está en resonancia con la longitud de onda de excitación.

Como se emplea en esta memoria, los términos "nanopartícula", "nanoestructura", "nanocristal", "nanoetiqueta," y "nanocomponente," se utilizan de manera indistinta y se refieren a una partícula que tiene al menos una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm, incluyendo cualquier valor entero entre 1 nm y 1000 nm (incluyendo aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, y 1000 nm). En algunas realizaciones, la nanopartícula es una nanopartícula metálica. En algunas realizaciones, la nanopartícula es una partícula esférica, o una partícula sustancialmente esférica que tiene un diámetro del núcleo entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 200 nm (incluyendo aproximadamente 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, y 200 nm). En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro del núcleo entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 100 nm (incluyendo aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 nm) y en algunas realizaciones, entre aproximadamente 20 nm y 100 nm (incluyendo aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, y 100 nm). Una persona normalmente experta en la técnica, tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud, reconocería que una nanopartícula adecuada para su uso con los ensayos actualmente descritos puede incluir un núcleo, por ejemplo, un núcleo de metal, que induce el efecto Raman, y puede incluir además una o más capas de materiales activos en SERS, encapsulantes, y/o estructuras de envolturas externas que pueden contribuir también al tamaño, por ejemplo, el diámetro total de la estructura de nanopartículas.

Las nanopartículas activas en SERS adecuadas para su uso con los colorantes actualmente descritos comprenden al menos un metal, es decir, al menos un elemento seleccionado de la Tabla Periódica de los Elementos que se conoce comúnmente como metal. Los metales adecuados incluyen metales del Grupo 11, tales como Cu, Ag, y Au, u otros metales cualesquiera conocidos por los expertos en la técnica a apoyan SERS, tales como metales alcalinos. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende sustancialmente un único elemento metálico. Por ejemplo, la preparación de nanopartículas de oro se describe en Frans, G., Nat. Phys. Sci., 241, 20 (1972). En otras realizaciones, la nanopartícula comprende una combinación de al menos dos elementos, tales como una aleación, por ejemplo, una aleación binaria. En algunas realizaciones, la nanopartícula es magnética.

En otras realizaciones, el metal incluye un componente adicional, tal como una partícula que envuelve un núcleo de Au₂S/Au. Se han notificado partículas que envuelven un núcleo de Au₂S/Au que tienen una resonancia óptica para el IR cercano ampliamente ajustable. Véase Averitt R. D., et al. "Ultrafast optical properties of gold nanoshells," JOSA B, 16(10), 1824-1832 (1999). Además, partículas con núcleo de Ag y envoltura de Au, tales como las descritas por Cap. Y.W., et al. "DNA- modified core-shell Ag/Au nanoparticles," V. Am. Chem. Soc., 123(32), 7961-7962 (2001), partículas con núcleo de Au y envoltura de Ag, o se puede utilizar cualquier combinación envoltura-núcleo que implique metales activos en SERS. Otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas núcleo-envoltura son también adecuadas para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud, incluyendo coloides de sílice/alúmina funcionalizada con Au o Ag, coloides de TiO₂ funcionalizados con Au o Ag, Nanopartículas de Au protegidas con nanopartículas de Au (véase, por ejemplo, Mucic. et al. "DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials," J. Am. Chem. Soc., 120(48), 12674 (1998)); Los coloides de TiO₂ protegidos con nanopartículas de Au; y partículas que tienen un núcleo de Si con una envuelta metálica (es decir, "nanoenvolturas"), tales como coloides de SiCl₂ protegidos con plata o coloides de SiO₂ protegidos con oro, Véase. p. ej., Jackson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(52): 17930-5 (2004); véanse también las patentes de los EE.UU. números 6.344.272 y 6.685.986 de Oldenburg et al., cada una de ellas incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad. Se ha descrito el uso de dichas nanoenvolturas en aplicaciones de biosensores. Véase la patente de los EE.UU. N° 6.699.724 de West et al., que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Otra clase de nanopartículas adecuadas para su uso con las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud incluye nanopartículas que tienen una superficie interna. Dichas nanopartículas incluyen partículas huecas y nanocristales huecos o nanopartículas porosas o semiporosas. Véase, por ejemplo, La Patente de los EE.UU N° 6.913.825 de Ostafin et al., que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Por consiguiente, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona también una nanopartícula que comprende una partícula activa de SERS que envuelve un núcleo o una nanopartícula hueca activa para SERS. En algunas realizaciones, dichas nanopartículas pueden presentar una señal SERS mejorada.

Aunque se reconoce que la relación de forma y aspecto de la partícula pueden afectar a las características físicas, ópticas, y electrónicas de las nanopartículas, la relación específica de forma y aspecto, o la presencia/ausencia de un área superficial interna no afecta a la cualificación de una partícula como una nanopartícula. Por consiguiente, las nanopartículas adecuadas para su uso con los colorantes descritos en la presente solicitud pueden tener una variedad de formas, tamaños, y composiciones. Además, la nanopartícula puede ser sólida o, en algunas realizaciones tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, huecas. Los ejemplos no limitantes de nanopartículas adecuadas incluyen nanobarras huecas o rellenas con metales coloidales, nanopartículas magnéticas, paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas, hidrogeles (coloides o barras), y similares. Un experto en la técnica apreciará que las nanopartículas pueden existir en una variedad de formas, que incluyen, pero que no se limitan a esferoides, varillas, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanoresortes, nanoanillos, nanopartículas con forma de varillas, nanopartículas con forma de flecha, nanopartículas con forma de lágrima, nanopartículas con forma de tetrápodo, nanopartículas con forma de prisma, y una pluralidad de otras formas geométricas y no geométricas.

Además, las nanopartículas adecuadas para su uso con los colorantes descritos en la presente solicitud pueden ser isotropas o anisótropas. Como se cita en la presente memoria, las nanopartículas anisótropas tienen una longitud y una anchura. En algunas realizaciones, la longitud de la nanopartícula anisótropa es la dimensión paralela a la apertura en la que se produjo la nanopartícula. En algunas realizaciones, la nanopartícula anisótropa tiene un diámetro (anchura) de aproximadamente 350 ciclos o menos. En otras realizaciones, la nanopartícula anisótropa tiene un diámetro (anchura) de aproximadamente 250 nm o menos y en algunas realizaciones, un diámetro (anchura) de aproximadamente 100 nm o menos. En algunas realizaciones, la anchura de la nanopartícula anisótropa está entre aproximadamente 15 nm a aproximadamente 300 nm. Además, en algunas realizaciones, la nanopartícula anisótropa tiene una longitud, donde la longitud está entre aproximadamente 10 nm y 350 nm.

La mayor parte de la bibliografía sobre SERS (experimental y teórica) sugiere que las partículas anisótropas (varillas, triángulos, prismas) pueden proporcionar una potenciación aumentada de la señal Raman en comparación con las esferas. Por ejemplo, el así denominado "efecto antena" prevé que se espera que la potenciación Raman sea más grande en áreas de mayor curvatura. Se han descrito recientemente muchos informes de partículas anisótropas, incluyendo prismas de plata (Ag) y partículas de oro "ramificadas" (Au).

Se pueden producir nanovarillas de Au y Ag mediante electrodeposición en plantillas de alúmina preformadas, de una manera similar a la producción de partículas de Nanobarcode® (Oxonica Inc., Mountain View, California). Véase, por ejemplo, Nicewamer-Pena, S. R. et al. "Submicrometer metallic barcodes," *Science*, 294, 137- 141 (2001); Walton, I. D. et al., "Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy," *Anal. Chem.* 74, 2240-2247 (2002). Estas partículas se pueden preparar mediante la deposición de capas alternantes de materiales, normalmente Au y Ag, en plantillas de alúmina preformadas, y pueden tener un diámetro de aproximadamente 250 nm y una longitud de aproximadamente 6 micrómetros.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud son adecuadas también para su uso en nanoestructuras compuestas, por ejemplo, estructuras de satélites y estructuras que envuelven núcleos, tal como las descritas en la Solicitud de Patente Internacional PCT N°. PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al. presentada el 20 de marzo de, 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

B. Nanopartículas activas en SERS funcionalizadas

Además, Las nanopartículas activas en SERS que comprenden los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud pueden funcionalizarse con una molécula, tal como una molécula enlazadora específica de un par de unión, que se puede unir a un analito diana. Tras la unión al analito diana, el espectro SERS de la molécula indicadora activa en SERS cambia de tal manera que se puede determinar la presencia o la cantidad del analito diana. El uso de una nanopartícula activa en SERS funcionalizada tiene varias ventajas sobre las nanopartículas no funcionalizadas. En primer lugar, el grupo funcional proporciona un grado de especificidad con la nanopartícula proporcionando una interacción específica con el analito diana. En segundo lugar, el analito diana no tiene que ser activo en Raman por sí mismo; su presencia se puede determinar observando cambios en el espectro SERS del colorante activo en Raman unido a la nanopartícula. Dichas medidas se denominan en el presente documento "detección indirecta" en el que se determina la presencia o ausencia de un analito o ligando diana de una muestra biológica se determina detectando una señal SERS que no emana directamente del analito diana o del ligando de interés.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden funcionalizarse para unirse a un analito diana de al menos dos maneras diferentes. En algunas realizaciones, la molécula indicadora activa en SERS, es decir, el colorante activo en SERS, se puede conjugar con una molécula enlazadora específica de una pareja de unión, mientras que en otras realizaciones, una molécula enlazadora específica de una pareja de unión se puede unir directamente a la nanopartícula. En realizaciones en las que el núcleo de la nanopartícula está al menos parcialmente rodeado por una envuelta encapsulante, la molécula enlazadora puede unirse a una superficie externa de la envuelta encapsulante.

1. Nanopartículas activas en SERS funcionalizadas asociadas con moléculas indicadoras activas en SERS conjugadas con miembros de unión específica de una pareja de unión

En algunas realizaciones, se puede funcionalizar el colorante del IR cercano activo en SERS asociado con una nanopartícula activa en SERS para unirse a un analito diana. Dichas nanopartículas activas en SERS funcionalizadas se pueden usar en combinación con ensayos de unión para detectar moléculas fisiológicamente importantes, incluyendo metabolitos, tales como glucosa, lactato, y ácidos grasos, en muestras biológicas. En algunas realizaciones, los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud incluyen un grupo reactivo que se puede usar o conjugar el colorante con otra molécula, incluyendo un miembro de una pareja de unión específica, tal como una proteína de unión o un receptor, que tiene una afinidad por un ligando o analito específico.

En algunas realizaciones, el núcleo del colorante puede incluir un grupo reactivo con tiol que puede estar conjugado al resto tiol de un resto del aminoácido cisteína en una proteína natural o diseñada o mutada. Como se emplea en esta memoria, el término "grupo reactivo con tiol" se refiere a un grupo sustituyente que puede reaccionar con un resto tiol para formar un enlace de carbono-azufre. Los ejemplos de grupos reactivos con tiol que se pueden introducir en los colorantes descritos en la presente solicitud incluyen un grupo halo-acetilo y un grupo halo-acetamida. En algunas realizaciones, el grupo halo-acetilo incluye un grupo yodoacetilo, mientras que el grupo halo-acetamida puede incluir un grupo yodoacetamida o un grupo bromoacetamida. Un experto en la materia, tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud, reconocería que otros grupos reactivos de tiol conocidos en la técnica, tales como grupos maleimida, son adecuados para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud.

Como se emplea en esta memoria, el término "conjugado" se refiere a una molécula que comprende dos o más subunidades unidas entre sí, opcionalmente a través de un grupo de unión, para formar una estructura molecular simple. La unión puede realizarse tanto mediante un enlace químico directo entre las subunidades como a través de un grupo de unión. Dicha unión en un conjugado es normalmente irreversible. Como se emplea en esta memoria, el término "afinidad" se refiere a la fortaleza de la atracción entre una molécula enlazadora y el otro miembro de una pareja de unión en un sitio de unión concreto. El término "especificidad" y sus derivados se refieren a la probabilidad de que una molécula enlazadora se una a otro miembro de una pareja de unión. Dicha unión entre una molécula enlazadora, por ejemplo, una proteína de unión, a otra molécula enlazadora de una pareja de unión, por ejemplo, un ligando o analito, puede ser reversible.

El término "molécula enlazadora específica" se refiere a una molécula para la cual existe al menos una molécula enlazadora complementaria separada. Una molécula enlazadora específica es una molécula que se une, vincula, o se asocia de otra forma a una molécula específica. El enlace, unión, o asociación puede ser química o física. Una molécula específica a la cual se une una molécula enlazadora puede ser cualquiera de una variedad de moléculas, incluyendo, pero no se limitan a, antígenos, haptenos, proteínas, hidratos de carbono, secuencias de nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, enzimas, y similares. Además, una molécula enlazadora específica de un tipo concreto se unirá a un tipo particular de molécula. En dichos casos, las moléculas enlazadoras específicas se denominan "pareja de unión específica". Por consiguiente, un anticuerpo se unirá específicamente a un antígeno. Otras parejas de unión específicas incluirán avidina y biotina, hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, secuencias peptídicas complementarias, enzimas y cofactores enzimáticos, y similares.

Se describen con más detalle a continuación en el presente documento moléculas enlazadoras específicas representativas de una pareja de unión.

2. Nanopartículas activas en SERS que tienen una molécula enlazadora específica de una pareja de unión unida directamente a la anterior

En algunas realizaciones, una molécula enlazadora de una pareja de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, se puede unir directamente a la superficie de la nanopartícula o a la superficie externa de la nanopartícula o a la superficie de una envuelta que encapsula la nanopartícula. En una realización ilustrativa, una molécula enlazadora específica de una pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, se puede tratar con el enlazador, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), y unirse directamente a la nanopartícula a través del enlazador de PEG. El uso de un enlazador, tal como un enlazador de PEG, permite que se retengan las propiedades y la estructura naturales de las moléculas enlazadoras y aumenta la especificidad de las nanopartículas funcionalizadas impidiendo estéricamente la unión no específica de otras especies con la nanopartícula. Se describen con más detalle en el presente documento las nanopartículas activas en SERS que tienen una molécula enlazadora específica unida a través de un enlazador de PEG que tiene una molécula enlazadora específica unida a través de un enlazador de PEG (véase la Sección I.D., a continuación en el presente documento).

Dependiendo de la molécula enlazadora, un experto en la técnica reconocerá tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud que se pueden usar enlazadores diferentes de PEG. Por ejemplo, se pueden usar alcanotioles como enlazadores para anticuerpos y péptidos. Alcanotioles de cadena corta, incluyendo, pero no se limitan a, se pueden usar el N-succinimidil-S- acetiltioacetato (SATA) y el N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) como enlazadores tras la desprotección del sulfidrido. Otras propiedades pueden determinar también la elección del enlazador, tal como la longitud de la cadena enlazadora. Por ejemplo, Puede ser deseable PEG por que actúa también para proteger la superficie del reactivo y es flexible, que puede potenciar la capacidad del reactivo para unirse al analito de interés.

Las nanopartículas que tienen una o más moléculas indicadoras activas en SERS y pueden disponerse moléculas enlazadoras unidas a la anterior en un medio adecuado, por ejemplo, una solución tamponada, para proporcionar un reactivo activo en SERS.

3. Moléculas enlazadoras representativas

En algunas realizaciones, la molécula enlazadora conjugada con las nanopartículas activas en SERS actualmente descrita, tanto a través de la molécula indicadora activa en SERS como directamente unida a una superficie externa de la propia nanopartícula, comprende un polipéptido o proteína. Las proteínas de unión representativas adecuadas para su uso con las nanopartículas activas en SERS actualmente descrita, incluyen, pero no se limitan a proteínas de unión periplásmicas (PBP), Los ejemplos de PBP incluyen, pero no se limitan a, proteína de unión a glucosa-galactosa (GGBP), proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a ribosa (RBP), proteína de unión a arabinosa (ABP), proteína de unión a dipéptido (DPBP), proteína de unión a glutamato (GluBP), proteína de unión a hierro (FeBP), proteína de unión a histidina (HBP), proteína de unión a fosfato (PhosBP), proteína de unión a glutamina (QBP), proteína de unión a oligopéptido (OppA), o derivados de la misma, así como otras proteínas que pertenecen a las familias de proteínas conocidas como proteína de unión periplásmica de tipo I (PBP-de tipo I) y proteína de unión periplásmica de tipo II (PBP de tipo II). Para otras proteínas de unión adecuadas para su uso con las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, véase la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N^{os} 2006/0078908 y 2006/0280652 de Pitner et al y la solicitud de patente de los EE.UU. N^o 11/738.442, presentada el 20 de abril de 2007, cada una de ellas incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Otros ejemplos de proteínas que pueden comprender las moléculas enlazadoras incluyen, pero no se limitan a proteínas de unión a ácidos grasos intestinales (FABP). Las FABP son una familia de proteínas que se expresan al menos en el hígado, intestino, riñón, pulmones, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, piel anómala, adiposo, células endoteliales, glándulas mamarias, cerebro, estómago, lengua, placenta, testículos, y retina. La familia de FABP es, hablando de manera general, una familia de pequeñas proteínas intracelulares (aproximadamente 14 kDa) que se unen a ácidos grasos y a otros ligandos hidrófobos a través de interacciones no covalentes. Véase Smith, E. R. y Storch, J., J. Biol. Chem., 274 (50):35325-35330 (1999), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Los miembros de la familia FABP de proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteínas codificadas por los genes FABP1, FABP2, FABP3, FABP4, FABP5, FABP6, FABP7, FABP(9) y MP2. Proteínas que pertenecen a la familia FABP incluyen I-FABP, F-FABP, H-FABP, A-FABP, KLBP, mal-1, E-FABP, PA-FABP, C-FABP, S-FABP, FE-EBP, DA11, FP2, Inhibidor melanogénico, y similares.

Otras moléculas enlazadoras incluyen moléculas enlazadoras específicas que tienen una afinidad por un analito diana, incluyendo anticuerpos para los analitos diana, tales como el antígeno específico de próstata (PSA), la isoenzima creatina quinasa MB (CKMB), la proteína troponina I cardíaca (cTnl), hormona estimuladora del tiroides (TSH), antígeno de la gripe A (Flu A), antígeno de la gripe B (Flu B), y antígeno del virus sincitial respiratorio (RSY). Se conocen en la técnica los anticuerpos para dichos analitos diana.

Como se emplea en esta memoria, un "derivado" de una proteína o polipéptido es una proteína o polipéptido que comparte una identidad de secuencia sustancial con la proteína natural. Las proteínas o los polipéptidos derivados de la materia objeto descrita en la presente solicitud se pueden fabricar o preparar mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis y síntesis directa.

Se pueden modificar también las proteínas derivadas, tanto mediante procesos naturales, tal como un procesamiento posterior a la traducción, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en los textos básicos y en las monografías más detalladas, así como en una importante bibliografía de investigación. Se pueden producir modificaciones en cualquier momento en la cadena polipeptídica, incluyendo la estructura peptídica principal, las cadenas secundarias de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en sitios diferentes de un polipéptido o proteína dado. Asimismo, un polipéptido o proteína dado puede contener más de una modificación. Los ejemplos de proteínas derivadas incluyen, pero no se limitan a, proteínas mutantes y de fusión.

Se usa una "proteína mutante" en el presente documento como se conoce en la materia. En general, se puede crear una proteína mutante mediante adición, delección o sustitución de la estructura primaria natural de la proteína o polipéptido. Las mutaciones incluyen, por ejemplo, la adición o sustitución de grupos cisteína, aminoácidos que no se

producen naturalmente, y sustitución de aminoácidos sustancialmente no reactivos con aminoácidos reactivos. Se puede mutar una proteína mutada para unirse a más de un analito de una manera específica. De hecho, las proteínas mutantes pueden poseer especificidad hacia su analito natural y otro ligando diana. Del mismo modo, una proteína mutante puede ser capaz de unirse solo a un analito o analitos a los que la proteína de unión natural no se una. Los métodos para generar proteínas mutantes son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, Looser, L. L. et al. Nature 423, (6936), 185-190 (2003), que se han incorporado por referencia en el presente documento, describen métodos para rediseñar sitios de unión con proteínas de unión periplásmica que proporcionan a las proteínas nuevas propiedades de unión a analitos. Estas proteínas de unión mutantes retienen la capacidad de experimentar cambios conformacionales, que pueden producir una señal generada directamente tras su unión al analito. Al introducir entre 5 y 17 cambios de aminoácidos, Looser, et al. construyeron varias proteínas mutantes, cada una de ellas con nuevas selectividades para el TNT (trinitrotolueno), L-lactato, o serotonina.

La mutación puede servir a uno o más de varios fines. Por ejemplo, una proteína natural se puede mutar para cambiar su estabilidad a largo plazo, incluyendo la estabilidad térmica, de la proteína, para conjugar la proteína con una matriz o polímero de encapsulación particular, para proporcionar sitios de unión para grupos indicadores detectables, para ajustar su constante de unión con respecto a un analito particular, o combinaciones de los mismos.

El analito y la proteína mutada pueden actuar como moléculas enlazadoras. El término "se asocia" o "se une" como se emplea en esta memoria se refiere a moléculas enlazadoras que tienen una constante de unión relativa (Kd) lo suficientemente fuerte para permitir la detección de la unión a la proteína mediante un medio de detección. El Kd se puede calcular como la concentración de analito libre al que se une la mitad de la proteína, o viceversa. Cuando el analito de interés es glucosa, los valores de Kd para las moléculas enlazadoras están comprendidos entre aproximadamente 0,0001 mM y aproximadamente 50 mM.

La molécula indicadora activa en SERS descrita en la presente solicitud se puede unir a una proteína mutada, por ejemplo a GGBP, por cualquier medio convencional conocido en la técnica. Por ejemplo, la molécula indicadora se puede conjugar a la proteína mediante aminas o restos carboxilo de la proteína. Las realizaciones ilustrativas incluyen el acoplamiento covalente mediante grupos tiol sobre restos cisteína de la proteína natural mutada. Por ejemplo, para la GGBP mutada, las cisteínas se pueden localizar en la posición 10, en la posición 11, posición 14, en la posición 15, posición 19, en la posición 26, en la posición 43, en la posición 74, en la posición 92, en la posición 93, posición 107, posición 110, posición 112, en la posición 113, en la posición 137, en la posición 149, en la posición 152, en la posición 154, en la posición 182, en la posición 183, en la posición 186, en la posición 211, en la posición 213, en la posición 216, en la posición 238, en la posición 240, en la posición 242, en la posición 255, en la posición 257, en la posición 287, en la posición 292, en la posición 294, y en la posición 296.

C. Nanopartículas activas en SERS encapsuladas

Las nanopartículas metálicas activas en SERS muestran tendencia a agregarse en solución acuosa y, una vez agregadas, son difíciles de redispersar. Además, la composición de algunas moléculas activas en Raman es incompatible con las químicas usadas para unir otras moléculas, como las proteínas, a las nanopartículas metálicas. Estas características pueden limitar la elección de moléculas activas en Raman, químicas de unión, y otras moléculas a unirse a la nanopartícula metálica.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el colorante activo en SERS descrito en la presente solicitud de Fórmula A-Y cuando se fija por ejemplo, tanto se adsorbe o se une covalentemente a una nanopartícula, se puede revestir o encapsular, por ejemplo, en una envoltura de un material diferente, incluyendo un polímero, vidrio, o material cerámico. Dichas realizaciones se refieren en la presente memoria como "nanopartículas activas en SERS compuestas". Los métodos para preparar las nanopartículas activas en SERS compuestas se describen en la patente de los Estados Unidos nº 6.514.767 de Natan, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Los colorantes activos en SERS compuestas descritas en la presente solicitud pueden incluir una nanopartícula metálica, una submonocapa, monocapa, o multicapa de uno o más colorantes descritos en la presente solicitud en proximidad de la superficie de la nanopartícula metálica. Se pretende que el término "proximidad" signifique en aproximadamente 50 nm o menos de una superficie externa de la nanopartícula. Una nanopartícula que tenga una submonocapa, monocapa, o multicapa de uno o más colorantes descritos en la presente solicitud unidos a una superficie externa del núcleo de la nanopartícula también puede incluir una envoltura encapsulante. En dichas realizaciones, el colorante descrito en la presente solicitud se coloca en una interfase entre la superficie externa de la nanopartícula metálica y una superficie interna de la envoltura encapsulante.

El núcleo de la nanopartícula que comprende la nanopartícula compuesta puede ser una esfera metálica, por ejemplo, una esfera de oro, plata o cobre que tenga un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, el núcleo de la nanopartícula comprende un esferoide oblongo o achatado metálico. El diámetro del núcleo de la nanopartícula se puede seleccionar basándose, en parte, en la longitud de onda de la luz incidente. Por ejemplo, en SERS que utiliza luz roja incidente, es decir, luz incidente que tiene una longitud de onda de aproximadamente 600 nm, la respuesta SERS óptima se obtiene con núcleos de nanopartículas de oro que tienen un diámetro de aproximadamente 60 nm.

En algunas realizaciones, la envoltura encapsulante comprende un material dieléctrico, tal como un polímero, vidrio, metal, óxidos metálicos, tales como TiO_2 y SnO_2 , sulfuros metálicos o un material cerámico. En algunas realizaciones, el encapsulante es vidrio, por ejemplo, SiO_x . Para encapsular en vidrio las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, los núcleos de las nanopartículas metálicas se pueden tratar con un cebador de vidrio, es decir, un material que puede producir el crecimiento de un revestimiento uniforme de vidrio, o puede mejorar la adhesión del revestimiento de vidrio a la partícula, o ambas cosas. A continuación el vidrio puede crecer sobre la nanopartícula metálica mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica.

El proceso de encapsulación se lleva a cabo después, o durante, la unión o adsorción de uno o más colorantes descritos en la presente solicitud al núcleo de la nanopartícula. De este modo, el colorante se secuestra del disolvente circundante en forma de un revestimiento sobre la superficie del núcleo de la nanopartícula metálica. Dicha configuración proporciona al núcleo de la nanopartícula metálica una actividad SERS estable. El colorante puede formar una submonocapa, una monocapa completa, o un conjunto multicapa sobre la superficie del núcleo de la nanopartícula metálica. La capa de colorante puede comprender un solo colorante o ser una mezcla de diferentes colorantes.

Por tanto, en algunas realizaciones, la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A -Y forma una capa sobre la superficie externa de la nanopartícula, en donde la capa cubre al menos parcialmente la superficie externa del núcleo de la nanopartícula y está definida por una superficie interna y una superficie externa. El encapsulante se coloca en al menos una de la superficie externa de la nanopartícula y la superficie externa de la capa de la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y para rodear al menos parcialmente el núcleo de la nanopartícula, que está al menos parcialmente revestida con una capa de la molécula indicadora activa en SERS.

Preferentemente, el encapsulante no altera de forma mensurable la actividad SERS de las nanopartículas activas en SERS compuestas. Se siguen consiguiendo los beneficios de la materia objeto descrita en la presente solicitud, sin embargo, incluso si el encapsulante tiene cierto efecto mensurable, siempre que no interfiera con la actividad SERS, o no añada complejidad significativa al espectro SERS observado.

Además, en algunas realizaciones, el encapsulante se puede modificar, por ejemplo, derivatizarse mediante técnicas normalizadas conocidas en la técnica, para unir moléculas, incluyendo biomoléculas, a su superficie externa. Esta característica permite que los colorantes activos en SERS compuestas descritas en la presente solicitud se conjuguen a moléculas, incluyendo biomoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, o a soportes sólidos sin interferir con la actividad Raman del colorante. El vidrio y otros materiales adecuados para su uso como envoltura encapsulante contienen grupos funcionales adecuados para unión molecular. Por ejemplo, la inmersión de vidrio en una base adecuada permite la unión covalente de alquil triclorosilanos o alquil trialcoxisilanos, con funcionalidad adicional disponible en el extremo del grupo alquilo del alquil triclorodilano o del grupo alquil trialcoxisilano. Por tanto, las superficies de vidrio se pueden modificar con muchas formas de biomoléculas y superestructuras biomoleculares, incluyendo células, así como óxidos, metales, polímeros, y similares. Del mismo modo, las superficies de vidrio se pueden modificar con monocapas moleculares bien organizadas. Por consiguiente, los revestimientos de vidrio soportan muchos tipos de funcionalización química (que también se denomina en la presente memoria como "derivatización"). Otras formas de encapsulantes también pueden estar funcionalizadas. Por consiguiente, las nanopartículas descritas en la presente solicitud se pueden fijar a cualquier especie conocida en la técnica que tenga una funcionalidad químicamente reactiva.

El espesor del encapsulante puede variar dependiendo de las propiedades físicas requeridas para la nanopartícula activa en SERS. Dependiendo de la combinación particular del núcleo de la nanopartícula, encapsulante, y colorante, los revestimientos gruesos de encapsulante, por ejemplo, revestimiento de aproximadamente un micrómetro o más, podrían atenuar, potencialmente, la señal Raman. Además, un revestimiento fino llevará a la interferencia en el espectro Raman del analito por las moléculas de la superficie encapsulante. Al mismo tiempo, las propiedades físicas, como el coeficiente de sedimentación pueden verse afectadas por el espesor del encapsulante. En general, cuanto más espeso sea el encapsulante, más eficaz es el secuestro de los colorantes activos en SERS sobre el núcleo de la nanopartícula metálica desde el disolvente circundante.

En realizaciones en donde el encapsulante es vidrio, el espesor del vidrio puede estar típicamente comprendido de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm. En realizaciones ilustrativas no limitantes, las nanopartículas activas en SERS encapsuladas comprenden nanopartículas de oro que tienen un diámetro comprendido entre aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm encapsuladas en una esfera de vidrio que tienen un espesor comprendido entre aproximadamente, en algunas realizaciones, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm; en algunas realizaciones, de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm; y, en algunas realizaciones, de aproximadamente 35 nm. El experto en la técnica puede realizar la optimización de las dimensiones de las nanopartículas activas en SERS encapsuladas descritas en la presente solicitud. Por ejemplo, es conocido en la técnica que las nanopartículas núcleo-envoltura (por ejemplo, nanopartículas de Au/AuS) soportan SERS y tienen diferentes propiedades ópticas si se comparan con las nanopartículas metálicas puras. Del mismo modo, es conocido en la técnica que el SERS procedente de esferoides de prolato se puede potenciar con respecto a las esferas con el mismo eje mayor. Además, es conocido que las potenciaciones de partículas individuales sean dependientes de la longitud de onda. Por tanto, el tamaño de partícula se puede "ajustar" para conseguir una señal SERS máxima para una longitud de onda de excitación dada. Por consiguiente, la composición de la partícula, o su tamaño o forma se

pueden alterar de acuerdo con la materia objeto descrita en la presente solicitud para optimizar la intensidad de la señal SERS.

5 Las nanopartículas activas en SERS compuestas descritas en la presente solicitud son fáciles de manipular y almacenar. Además, también son resistentes a la agregación, estabilizadas frente a la descomposición del colorante en disolventes y aire, son químicamente inertes, y se pueden centrifugar, concentrar, por ejemplo, mediante técnicas de desplegado magnético, y redispersarse sin pérdida de la actividad SERS. A diferencia de las nanopartículas metálicas, las nanopartículas activas en SERS compuestas descritas en la presente solicitud se pueden evaporar a sequedad, y después redispersarse completamente en disolvente.

D. Enlazadores de polietilenglicol (PEG)

10 En algunas realizaciones, puede usarse un enlazador de polietilenglicol (PEG) para unir una molécula enlazadora específica a una nanopartícula activa en SERS, una partícula de captura magnética (en ensayos de captura magnética), o a un soporte sólido (en ensayos heterogéneos). El uso de un enlazador de PEG puede reducir la unión no específica en los ensayos descritos en la presente solicitud. La eliminación de la adsorción no específica puede suponer un desafío importante para el rendimiento del ensayo. Por ejemplo, en los ensayos de captura magnética, la unión no específica puede incluir el proceso por el que las proteínas u otras biomoléculas de la solución se adhieren a las superficies de la partícula de captura magnética o la nanopartícula activa en SERS, presentando de esta forma las moléculas enlazadoras al analito diana o el proceso mediante el cual las superficies de la partícula de captura magnética y la nanopartícula activa en SERS se adhieren entre sí mediante interacciones no específicas.

20 De forma más general, unión no específica se refiere a la unión entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales. La unión no específica puede distinguirse de la unión específica, que implica el reconocimiento específico de una de las dos moléculas diferentes por la otra molécula, comparado con el reconocimiento sustancialmente inferior de otras moléculas. La naturaleza de la molécula o moléculas que resultan de la unión no específica en ensayos en medio líquido depende de la naturaleza de la muestra, el medio de ensayo, la superficie de la nanopartícula, y similares.

25 La unión no específica puede atribuirse al menos a dos mecanismos diferentes, cada uno de los cuales interfiere con el ensayo. En primer lugar, la adsorción no específica de materiales biológicos a una nanopartícula activa en SERS o a una nanopartícula de captura magnética puede impedir estéricamente la asociación entre la molécula enlazadora y el analito, lo que produce un resultado negativo falso o una infraestimación de la concentración del analito en un ensayo cuantitativo. Por "adsorción" se entiende la acumulación de solutos, compuestos biológicos u otros materiales sólidos sobre la superficie de un sólido o la adhesión de una capa de moléculas de cierta sustancia sobre la superficie de un sólido.

30 En segundo lugar, la asociación no específica entre las partículas de captura magnéticas y las nanopartículas activas en SERS, especialmente las que se han funcionalizado, puede aumentar los niveles iniciales del ensayo en ausencia del analito, llevando a una reducción en el nivel de sensibilidad del ensayo y a limitar el intervalo dinámico. Este aumento en el nivel inicial puede ser resultado de una reducción en el nivel mínimo de analito que se puede detectar en una muestra. Esta asociación no específica entre las nanopartículas, especialmente las nanopartículas en solución, también puede llevar a la agregación no específica de las partículas.

35 Las estrategias conocidas en la técnica para bloquear la unión no específica implican por lo general uno de tres enfoques. En un enfoque, la superficie se puede tratar con proteínas, por ejemplo, albúmina, ovoalbúmina, gelatina de pescado, y caseína, leche en polvo, y/o tampón de bloqueo. Los inconvenientes de este enfoque incluyen una falta de bloqueo completo de la adsorción no específica, véase, por ejemplo, Taylor, S. et al., "Impact of Surface Chemistry and Blocking Strategies on DNA Microarrays," *Nucleic Acids Research*, 31(16), e87 (2003), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad; la necesidad de optimizar las condiciones de bloqueo para cada nuevo ensayo; y una variación en el rendimiento entre lotes de agente de bloqueo. Dichas etapas de bloqueo también añaden una etapa adicional al ensayo, lo que aumenta la complejidad y la duración del ensayo.

40 Un segundo enfoque implica la adición de detergentes u otros agentes químicos al tampón de ensayo. Este enfoque también tiene el inconveniente de necesitar optimizar las condiciones y reactivos para cada nuevo ensayo y puede interferir con las interacciones biomoleculares específicas que el ensayo pretende detectar.

45 Otro enfoque implica revestir la superficie del soporte sólido, nanopartículas, o partículas magnéticas con un polímero, tal como polietilenglicol. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que la reducción de la adsorción no específica conseguida mediante las superficies revestidas con PEG es el resultado de que las moléculas de PEG tienen propiedades hidrófilas y que tienen muchos grados de libertad de rotación. En un entorno acuoso, las cadenas de PEG están rodeadas por moléculas de agua. Estas condiciones dan como resultado un nivel elevado de entropía de las moléculas de PEG. La adsorción de una biomolécula, por ejemplo, una proteína, sobre una superficie revestida con PEG comprime las cadenas de PEG, desplazando de esta forma las moléculas de agua y transmitiendo orden a las cadenas de PEG. Esta ordenación puede resultar en una disminución de la entropía termodinámicamente desfavorable que da como resultado la resistencia a la adsorción de la biomolécula sobre superficies revestidas con PEG. Aunque el revestimiento de superficies bidimensionales mediante un polímero, como PEG, puede ser eficaz para

reducir la unión no específica, ninguno de los enfoques anteriormente utilizados es eficaz para reducir la agregación no específica de las partículas tridimensionales en solución. Véase [Dubertret, B. et al. "In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles," *Science*, 298, 1759-1762 \(2002\)](#), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

5 La materia objeto descrita en la presente solicitud demuestra que la adsorción no específica de materiales biológicos en las nanopartículas o asociaciones de nanopartículas, o ambos, se puede reducir mediante el uso del enlazador de PEG descrito en la presente invención (véase el Ejemplo experimental 3). El método descrito en el presente documento es general para bloquear la unión no específica. Por tanto, se ha eliminado en gran medida la necesidad de optimizar las condiciones de bloqueo para los ensayos individuales. Como las moléculas basadas en polietilenglicol (PEG) son no iónicas, se cree que el efecto perjudicial del pH y la concentración de sales sobre la capacidad del PEG para soportar la adsorción no específica de proteína se mínimo.

10 En algunas realizaciones, el enlazador de PEG comprende una molécula PEG bifuncional que tiene un grupo funcional en cada extremo de la molécula lineal, separado por dos o más subunidades de etilenglicol. En algunas realizaciones, la molécula de PEG comprende entre 2 y aproximadamente 1000 subunidades de etilenglicol, incluyendo, pero sin limitación, 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, o al menos 1000 subunidades de etilenglicol. En determinadas realizaciones, la molécula de PEG comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 subunidades de etilenglicol, y en determinadas realizaciones, al menos 12 subunidades de etilenglicol.

15 El enlazador de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero sin limitación, aproximadamente 200, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, y aproximadamente 100.000 Da. También debe entenderse, sin embargo, que se pueden utilizar enlazadores de PEG de pesos moleculares mayores o menores en la materia objeto descrita en la presente solicitud dependiendo de la aplicación concreta. En determinadas realizaciones, el enlazador de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 Da o superior. Para una densidad superficial dada de moléculas de PEG, las cadenas de PEG más largas, por ejemplo, un enlazador de PEG con un peso molecular igual o superior a aproximadamente 5.000 Da puede ser más eficaz en la reducción de la adsorción no específica en los ensayos de unión que las cadenas más cortas. Las cadenas de PEG más largas también pueden colocar una molécula enlazadora, por ejemplo, un anticuerpo o sonda de ADN más lejos de la superficie de la partícula. Dichas realizaciones pueden minimizar el "replegado" de los anticuerpos sobre la superficie de la partícula, lo que puede reducir el número de sitios disponibles para la unión del analito (por ejemplo, antígeno).

20 El enlazador de PEG bifuncional comprende grupos funcionales en cada extremo de la molécula, y estos grupos funcionales se pueden utilizar para unir una molécula enlazadora específica a un extremo de la molécula de PEG y una nanopartícula activa para SERS (o una partícula de captura magnética) al otro extremo. La molécula enlazadora específica se puede unir en primer lugar al enlazador de PEG bifuncional, seguido por la unión del conjugado molécula enlazadora específica-PEG a la nanopartícula. Como alternativa, el enlazador de PEG bifuncional se puede unir a la nanopartícula antes de unir la molécula enlazadora específica a la nanopartícula PEGilada.

25 Se debe resaltar que también se puede usar un enlazador de PEG para unir un colorante activo en SERS a la superficie de la nanopartícula o para unir una molécula enlazadora específica a una partícula de captura magnética, tal como una partícula magnética utilizada en un ensayo SERS basado en un líquido de captura magnética.

30 Los grupos funcionales de cada extremo de los enlazadores PEG se pueden seleccionar en función de la química superficial de la nanopartícula y de la funcionalidad deseada para la unión de la molécula enlazadora específica (o colorante activo en SERS). Los ejemplos no limitantes de los grupos funcionales útiles en los enlazadores de PEG incluyen ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, especialmente aquellos cuyos grupos salientes sean N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2- nitrobenzeno-4-sulfonato. Los grupos reactivos con tiol, incluyendo los grupos maleimido o haloacetilo son útiles para modificar los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas o para reaccionar con los grupos tiol, tal como los que deberían estar presentes sobre la superficie de las nanopartículas activas en SERS.

35 Además, los grupos aminohidrazina o hidrazida de las moléculas de PEG son útiles para su reacción con los aldehídos generados mediante la oxidación de los grupos carbohidrato con peryodato. Esta química de unión es especialmente útil para la unión de anticuerpos dirigida a un sitio de la partícula. Por ejemplo, un enlazador de PEG bifuncional que comprende un grupo hidrazina o hidrazida en un extremo se puede utilizar para unir un anticuerpo a la nanopartícula activa en SERS a través de los restos oligosacáridos del anticuerpo, que están principalmente presentes en la parte Fc de las moléculas de IgG. De este modo, se puede diseñar una nanopartícula funcionalizada que maximice la

presentación de la región de unión al antígeno a la solución de ensayo, aumentando potencialmente de esta forma la sensibilidad del ensayo. De hecho, se ha demostrado que la inmovilización de moléculas de IgG dirigida al sitio mediante los restos oligosacárido en soportes sólidos derivatizados con hidrazida potencia la afinidad antigénica en aproximadamente tres veces comparado con las moléculas de IgG inmovilizadas mediante otros tipos de químicas de unión, tal como mediante los restos lisina de IgG, que están presentes en la totalidad de la molécula del anticuerpo. Véase O'Shannessv, D. J. y Hoffman, W. L., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 488-496 (1987); Hoffman, W. L. y O'Shannessv, D. J., *J. Immunol. Method*, 112, 113-120 (1988).

La molécula enlazadora de PEG bifuncional puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Como se emplea en esta memoria, el término "homobifuncional" se refiere a una molécula enlazadora de PEG cuyos grupos funcionales de los extremos son iguales. El término "heterobifuncional" se refiere a una molécula enlazadora de PEG cuyos grupos funcionales de los extremos son diferentes entre sí. Por tanto, en algunas realizaciones, la molécula enlazadora de PEG comprende una molécula de PEG heterobifuncional que comprende un primer grupo funcional en un primer extremo y un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la molécula de PEG. En algunas de estas realizaciones, el primer grupo funcional del primer extremo de la molécula de PEG heterobifuncional comprende un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). En determinadas realizaciones, el segundo grupo funcional del segundo extremo de la molécula de PEG heterobifuncional comprende un grupo maleimida. Por tanto, en determinadas realizaciones, la molécula de PEG heterobifuncional comprende un éster de NHS en el primer extremo y un grupo maleimida en el segundo extremo.

En aquellas realizaciones en las que la molécula enlazadora específica comprende un polinucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido), el polinucleótido se puede unir a la molécula de PEG mediante un grupo amina en el extremo 5' o en el extremo 3' del polinucleótido, que puede reaccionar con una molécula de PEG que comprende un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina para formar una unión éster de amino (péptido) con el polinucleótido y el enlazador de PEG.

En algunas realizaciones, los grupos tiol de la superficie de una nanopartícula activa en SERS se hacen reaccionar con un grupo maleimida reactivo con tiol del enlazador de PEG para formar un enlace carbono-azufre. En algunas de estas realizaciones, el enlazador de PEG comprende un enlazador de PEG heterobifuncional que comprende un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina en un extremo y un grupo maleimida en el otro extremo.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un enlazador de PEG bifuncional para unir moléculas enlazadoras específicas a las nanopartículas activas en SERS o a partículas magnéticas y los restantes grupos funcionales de la superficie de la nanopartícula o partícula magnética se pueden unir a moléculas de PEG adicionales (por ejemplo, moléculas de PEG monofuncionales) para proteger estos grupos de la interacción no específica con otras moléculas de la muestra de ensayo o con otras partículas. Un experto en la técnica, tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud, reconocerá que cualquier arquitectura de PEG, incluyendo, pero no se limitan a, polímeros lineales, polímeros en forma de estrella o copolímeros que implican PEG, se podrían usar con este fin.

Además, las moléculas de PEG monofuncionales se pueden utilizar para revestir nanopartículas o partículas magnéticas que comprenden una molécula enlazadora específica que se ha unido a las anteriores mediante otras químicas de inmovilización conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la química de acoplamiento de estreptavidina-biotina para unir moléculas enlazadoras específicas a la superficie de la partícula, mientras que las moléculas de PEG, por ejemplo, moléculas de PEG activadas con maleimida, se pueden utilizar para bloquear la adsorción no específica en la superficie de una partícula de SERS tiolada.

II. Aplicaciones de las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud

En algunas realizaciones, se puede utilizar una nanopartícula activa en SERS que comprende las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud en un ensayo diagnóstico para determinar la presencia o la cantidad de un analito o ligando de interés en una muestra biológica. Los métodos y ensayos diagnósticos representativos en los que son aplicables las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se describen en la solicitud de patente internacional PCT n° PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al. presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona métodos de ensayo, composiciones, y kits que incluyen nanopartículas activas en SERS que comprenden las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud.

En algunas realizaciones, se puede usar una nanopartícula activa en SERS que comprende las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud para detectar uno o más de un ácido nucleico, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN), un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, y similares. En general, el método comprende poner en contacto uno o más de un ácido nucleico, un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, con una nanopartícula activa en SERS descrita en la presente solicitud que tiene un oligonucleótido unido a la anterior y detectar la presencia o un cambio en el espectro SERS de la misma.

Además, en algunas realizaciones, se puede usar una nanopartícula activa en SERS que comprende las moléculas indicadoras descritas en la presente solicitud en la obtención de imágenes de células. En dichas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, por ejemplo, una nanopartícula activa en SERS marcada con una molécula enlazadora de un par de unión específico, se puede incorporar a las células o tejidos, y se puede utilizar SERS para caracterizar la distribución de las nanopartículas en los anteriores. Dichas realizaciones se pueden usar para distinguir entre células normales y anómalas, por ejemplo, células cancerosas.

A. Ensayos diagnósticos

En algunas realizaciones, las nanopartículas que tienen una o más moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud unidas a las mismas se pueden usar en ensayos diagnósticos.

Por ejemplo, Rohr et al demostraron un inmunoensayo con detección SERS que incluía múltiples componentes y etapas de lavado. Véase Rohr, T. E., et al. "Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy", *Anal. Biochem.*, 182:388 (1989). Asimismo, M et al demostraron la unión de una molécula indicadora a un porta de oro en un ensayo de detección heterogéneo que incluía etapas de incubación y de lavado. Véase Ni, J. et al, "Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids", *Anal. Chem.*, 71:4903 (1999). El ensayo SERS descrito por Rohr et al y por Ni et al., así como otros conocidos en la técnica, necesitan etapas prolongadas de incubación y lavado.

Otro ejemplo de un ensayo que utiliza SERS se describe en la patente de los Estados nº 5.266.498 de Tarcha et al. que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Tarcha et al. describen el uso de un sistema de reactivos múltiples en el que una marca o un anticuerpo se une a una superficie SERS. Un segundo reactivo comprende la pareja complementaria de la marca o del anticuerpo.

En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar en lo que se denomina un "ensayo en medio líquido". Los enfoques de ensayos en medio líquido usando nanopartículas activas en SERS se han descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, Hirsch et al. "A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells", *Anal. Chem.*, 75 (10), 2377- 2381 (2003), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Hirsch et al describen la detección óptica de la agregación de partículas en presencia de un analito de interés por medida de los cambios en la absorción óptica debido a las interacciones entre partículas. La agregación de las nanopartículas en el ensayo descrito por Hirsch et al. detecta la disminución en la resonancia de plasmón que se produce como resultado de la agregación de las partículas. Hirsch et al. sin embargo, no describen el uso de señales Raman para la detección.

En una realización de los ensayos descritos en la presente solicitud, las partículas activas en SERS se pueden utilizar en lo que se denomina un ensayo "sin lavado" u "homogéneo". En este tipo de ensayo, se recoge una muestra en un recipiente, por ejemplo, un recipiente para recogida de especímenes, un recipiente de ensayo, u otro recipiente para muestras adecuados para su uso en los ensayos descritos en la presente solicitud, y el ensayo se realiza sin necesidad de sacar la muestra del recipiente, por ejemplo, un recipiente de ensayo. De manera ventajosa, la muestra se puede recoger en un recipiente que ya contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo. En algunas realizaciones, sin embargo, se pueden añadir uno o más reactivos al recipiente después de la recogida del espécimen.

En los ensayos en medio líquido, de forma típica la muestra se incuba, por ejemplo, en condiciones ambientales, pero también es posible proporcionar condiciones controladas, tales como una temperatura específica o agitación de la muestra. Después del periodo de incubación, el recipiente se puede colocar en un lector para obtener una señal de las una o más partículas activas en SERS que pueden estar precargadas o añadirse posteriormente al recipiente. Se produce una señal Raman, que se detecta tras interrogación mediante una radiación incidente a una radiación de onda concreta, por ejemplo, radiación láser.

En otras realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar en ensayos heterogéneos. Como se emplea en esta memoria, la expresión "ensayo heterogéneo" se refiere de manera general a un ensayo en el que uno o más componentes del ensayo se añaden o se retiran secuencialmente del ensayo. Más particularmente, un ensayo heterogéneo se puede basar, en parte, en la transferencia de un analito desde una muestra líquida a una fase sólida mediante la unión del analito a la superficie de la fase sólida durante el ensayo. En alguna etapa del ensayo, cuya secuencia varía dependiendo del protocolo del ensayo, la fase sólida y la fase líquida se separan, y se realiza la determinación que conduce a la detección y/o cuantificación del analito en una de las dos fases individuales. Por tanto, un ensayo heterogéneo, por ejemplo, puede incluir un soporte sólido revestido con un antígeno o un anticuerpo que se une a un analito de interés y por de esta forma separa o retira el analito del resto de componentes de la muestra en ensayo. Estos componentes restantes se pueden eliminar selectivamente de la muestra mediante una o más etapas de lavado y permanecer el analito unido al soporte sólido, donde se detecta, o se puede eliminar mediante una etapa de lavado adicional y detectarse posteriormente.

En general, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar en inmunoensayos cuando se conjugan de un anticuerpo dirigido contra una molécula diana de interés.

En algunas realizaciones, los colorantes descritos en la presente solicitud se pueden unir, por ejemplo, unirse covalentemente a una nanopartícula, tal como se usa en un ensayo diagnóstico donde la intensidad de la señal SERS

que procede del colorante cambia en función de la cantidad de analito, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, y metabolitos, a detectar. Además, en algunas realizaciones, las nanopartículas marcadas con los colorantes descritos en la presente solicitud también se pueden marcar con otras especies, tal como un miembro específico de un par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, para facilitar la detección de uno o más analitos en una muestra a ensayar. Las nanopartículas que tienen los colorantes descritos en la presente solicitud asociados o unidos a las anteriores se pueden utilizar en ensayos, por ejemplo, ensayos biológicos o químicos, donde se requiere una marca detectable.

5

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia o uno o más analitos en una muestra biológica, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una muestra biológica que se sospecha que contiene uno o más analitos;

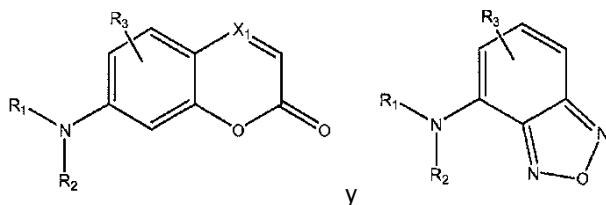
10

(b) poner en contacto la muestra biológica con un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociado con la misma al menos una molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el uno o más analitos y al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula:

A-Y

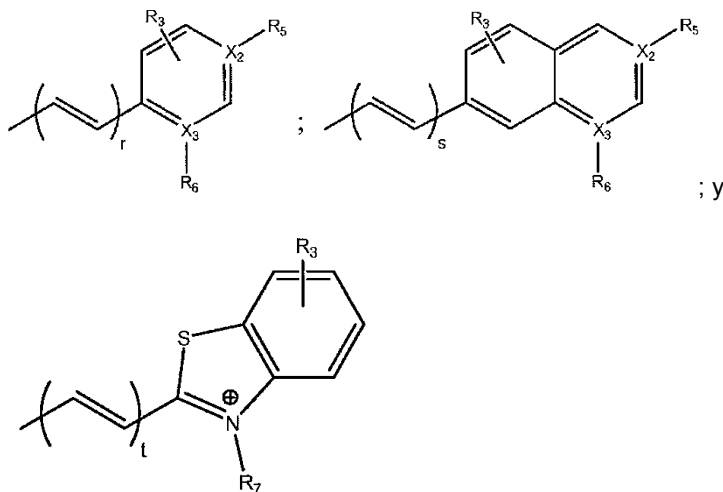
en donde:

15 A se selecciona del grupo que consiste en:



en donde X₁ es CR₄ o N;

Y se selecciona del grupo que consiste en:



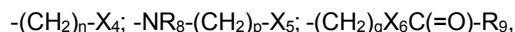
20

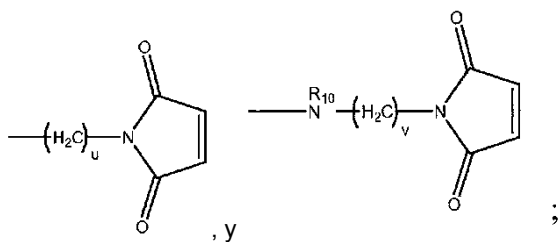
en donde:

r, s, y t son independientemente un número entero de 1 a 8;

25

cada X₂ y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, S, y N, con la condición de que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆ está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z', en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:





en donde:

n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

cada uno de X₄ y X₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol;

5 X₆ es 0 o NR₁₁;

en donde:

10 cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀, R₁₁, y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxicicloalquilo, alcoxicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcocarbonilo;

R₇ es Z';

R₉ es -(CH₂)_m-X₇ o -(CH₂)_m-B, en donde

m es un número entero de 1 a 8;

15 X₇ es halógeno; y

B es un miembro de unión que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar;

(c) iluminar la muestra biológica con radiación incidente a una longitud de onda para inducir a la molécula indicadora activa en SERS a producir una señal SERS; y

(d) medir la señal SERS para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos de la muestra biológica.

20 En algunas realizaciones, el método comprende además de una forma continuada:

(a) poner en contacto el miembro de unión con la muestra que se sospecha que contiene uno o más analitos; (b) irradiar la muestra con radiación electromagnética; y (c) detectar la señal SERS. Por consiguiente, la detección se realiza de forma continuada o intermitente en momentos predeterminados. Por tanto, se pueden realizar detecciones continuadas o episódicas de analito(s) de interés.

25 *1. Analito(s) diana de interés inmovilizado(s) a una superficie*

En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar como etiquetas ópticas en ensayos biológicos. EN determinados ensayos, una molécula diana, por ejemplo, un antígeno, a detectar se captura mediante una superficie sólida. Una molécula enlazadora, como un ligando, por ejemplo, un anticuerpo, específico de la molécula diana se puede unir a una nanopartícula activa en SERS. Cuando se pone en contacto con la superficie sólida que tiene la molécula diana unida a la anterior, la nanopartícula activa en SERS que tiene la molécula enlazadora específica unida a la anterior se puede unir a la molécula diana. La observación de una señal SERS en el soporte sólido indica la presencia de la molécula diana. En general, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden conjugar con cualquier molécula que se puede usar para detectar la presencia de una molécula diana específica en un ensayo.

35 Más particularmente, el analito o analitos diana de interés se puede inmovilizar, por ejemplo, una zona localizada de un soporte sólido, tal como una superficie inerte de un recipiente de ensayo, por ejemplo, un recipiente para recogida de especímenes. Como alternativa, en un ensayo en sándwich, el analito o analitos de interés se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido de forma indirecta mediante la unión del analito a una molécula enlazadora específica que se ha inmovilizado sobre el soporte sólido. El analito o analitos de interés inmovilizados se pueden poner seguidamente en contacto con un reactivo de detección que comprende las nanopartículas activas en SERS conjugadas con al menos una molécula enlazadora específica, por ejemplo, un anticuerpo, que tenga afinidad por el analito o analitos de interés. En el ensayo en sándwich, la molécula enlazadora específica inmovilizada interactúa una superficie, sitio o secuencia del analito de interés independiente del que utiliza la molécula enlazadora específica que está unida a la nanopartícula activa en SERS, dando como resultado un analito intercalado entre el soporte sólido y la nanopartícula,

generando de esta forma una señal SERS detectable. En algunas de estas realizaciones, la molécula enlazadora específica se puede inmovilizar sobre el soporte sólido o a la nanopartícula activa en SERS a través de un enlazador, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

5 Las nanopartículas activas en SERS pueden interactuar o asociarse, por ejemplo, unirse de forma reversible o irreversible, con al analito o analitos inmovilizados de interés. Después de un tiempo de incubación adecuado, esta interacción entre la nanopartícula activa en SERS y el analito o analitos de interés inmovilizados se puede detectar iluminando la zona localizada del soporte sólido con radiación incidente de la longitud de onda adecuada y medir la señal SERS emitida por la molécula indicadora activa en SERS. Además, como cada tipo de molécula indicadora activa en SERS muestra un espectro SERS único, se puede utilizar un espectro SERS individual para detectar una pluralidad de analitos de interés incluyendo nanopartículas activas en SERS que comprendan moléculas indicadoras activas en SERS diferentes en el reactivo de detección. Por consiguiente, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden utilizar en formatos de ensayo múltiples.

2. *Nanopartículas activas en SERS funcionalizadas inmovilizadas en una superficie.*

15 En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, conjugadas con una molécula enlazadora específica que tenga afinidad por el analito o analitos de interés, se puede inmovilizar en una zona localizada de un soporte sólido, por ejemplo, la superficie interna de un recipiente para recogida de muestra. Las nanopartículas activas en SERS inmovilizadas se pueden poner en contacto con una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, de la que se sospecha que contiene uno o más analito(s) diana de interés. Las nanopartículas activas en SERS inmovilizadas pueden interactuar o asociarse, por ejemplo, unirse de forma reversible o irreversible, con el analito o analitos diana de interés presentes en la muestra. Después de un tiempo de incubación adecuado, esta interacción entre la nanopartícula activa en SERS inmovilizada y el analito o analitos de interés se puede detectar iluminando la zona localizada del soporte sólido con radiación incidente de la longitud de onda correcta y medir la señal SERS emitida por la molécula indicadora activa en SERS. Además, como cada tipo de molécula indicadora activa en SERS muestra un espectro SERS único, se puede utilizar un espectro SERS individual para detectar una pluralidad de analitos de interés inmovilizando nanopartículas activas en SERS que comprendan moléculas indicadoras activas en SERS en una o más zonas localizadas de la superficie sólida. La una o más zonas localizadas de la superficie sólida se pueden iluminar con radiación incidente de la longitud de onda adecuada y la señal SERS emitida por las moléculas indicadoras activas en SERS se puede medir para proporcionar un ensayo diagnóstico múltiple.

3. *Ensayos SERS en medio líquido*

30 En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar en lo que se denomina un ensayo en medio líquido. En estos ensayos, se pueden preparar nanopartículas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas sólidas, nanopartículas huecas, o nanopartículas encapsuladas que comprenden un núcleo de nanopartícula sólida o hueca y una cubierta encapsulante, como se describe en el presente documento. Las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden adsorber en su superficie o unirse, por ejemplo, unirse covalentemente mediante un enlazador químico, por ejemplo, un enlazador de polietilenglicol (PEG), a la superficie exterior de la nanopartícula o del núcleo de la nanopartícula. Las moléculas de unión de un par de unión específico se pueden unir a una superficie exterior de la nanopartícula, conjugarse con la molécula indicadora adsorbida o unida a la superficie exterior de la nanopartícula, o unirse a la superficie exterior de la cubierta encapsulante. En algunas realizaciones de los ensayos descritos en la presente memoria, la molécula enlazadora es un anticuerpo. La nanopartícula activa en SERS que tiene una molécula enlazadora de un par de unión específico unido a la misma se puede poner posteriormente en contacto con una muestra biológica que contiene uno o más analitos o ligandos diana de interés. La molécula enlazadora específica se puede asociar, por ejemplo, unirse con, el uno o más analitos o ligandos de interés.

45 En algunos ensayos en medio líquido, se puede utilizar un análisis en sándwich para amplificar la señal SERS tal como se describe en la solicitud de patente internacional nº PCT/US2005/000171 de Wang et al, presentada el 6 de enero de 2005, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. En estos ensayos, un analito concreto puede unirse simultáneamente a través de múltiples superficies, sitios, o secuencias en o dentro del analito a más de una molécula enlazadora, donde más de una molécula enlazadora está unida a las nanopartículas activas en SERS. En los casos en donde las nanopartículas activas en SERS que están unidas simultáneamente al analito a través de más de una molécula enlazadora estén unidos a colorantes idénticos activos en SERS o colorantes activos en SERS que tengan espectros solapantes, la señal de SERS se puede amplificar.

55 Se cree que esta estructura en sándwich o agrupación de las nanopartículas activas en SERS alrededor de una molécula de analito genera un efecto amplificado de SERS a través de un aumento en el tamaño de la superficie eficaz de las partículas metálicas agrupadas, una potenciación del campo magnético en el punto intermedio de partículas metálicas muy juntas, y mecanismos adicionales de potenciación del campo local que surge de los bordes afilados, dobleces, u otras estructuras fractales proporcionadas por la estructura en clúster.

Además, los colorantes descritos en la presente solicitud presentan espectros Raman relativamente simples con anchos de línea estrechos. Esta característica permite la detección de varias especies activas en Raman diferentes en el mismo volumen de muestra. Por consiguiente, este rasgo permite que se fabriquen múltiples nanopartículas activas

en SERS, incluyendo cada una de ellas colorantes diferentes, de forma que el espectro Raman de cada colorante se puede distinguir en una mezcla de diferentes tipos de nanopartículas. Este rasgo permite la detección de varias especies diana diferentes en un pequeño volumen de muestra. Por tanto, las nanopartículas que tienen los colorantes descritos en la presente solicitud asociados o unidos a las anteriores también son adecuadas para su uso en ensayos químicos múltiples, donde la identidad de la nanopartícula activa en SERS codifica la identidad de la diana del ensayo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se puede unir a la nanopartícula más de un tipo de molécula enlazadora. Por ejemplo, el tipo de molécula enlazadora unida a la nanopartícula se puede variar para proporcionar múltiples reactivos que tengan diferentes afinidades por diferentes analitos diana. De este modo, el ensayo puede detectar más de un analito de interés o presentar varias selectividades o sensibilidades para más de un analito. La nanopartícula activa en SERS se puede ajustar para muestras en las que puede variar la presencia de uno o más analitos, o las concentraciones de uno o más analitos.

Los colorantes descritos en la presente solicitud de Fórmula A-Y, cuando se asocian o se unen a las nanopartículas activas en SERS, proporcionan una diversidad espectral y capacidad de resolución en ensayos múltiples. Cada nanopartícula activa en SERS, cuando se acopla a un reactivo específico de la diana, puede codificar la identidad de dicha molécula diana concreta. Además, la intensidad de una señal Raman concreta puede revelar la cantidad de dicha molécula diana concreta. Por ejemplo, tal como se describe anteriormente en el presente documento para los ensayos en sándwich, la identidad de las diferentes dianas capturadas en un soporte sólido se puede determinar mediante el uso de cada nanopartícula activa en SERS diana que tengan colorantes de Fórmula A-Y asociados o unidos a la anterior. Por consiguiente, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar en ensayos multiplexados para obtener información cualitativa y/o cuantitativa relativa a una molécula diana sin necesitar la localización de reactivos sensible de la posición.

Un reactivo para un ensayo SERS en medio líquido puede incluir más de un tipo de marca, por ejemplo, más de un tipo de molécula indicadora activa en SERS, dependiendo de los requisitos del ensayo. Por ejemplo, se pueden usar moléculas indicadoras activas en SERS que tengan una señal Raman a diferentes longitudes de onda para crear una "huella digital" Raman única de un analito de interés específico, aumentando de esta forma la especificidad del ensayo. Se pueden unir diferentes moléculas indicadoras a diferentes moléculas enlazadoras específicas para proporcionar un único reactivo de detección que pueda detectar más de un analito de interés, por ejemplo, una pluralidad de analitos de interés. Además, se pueden usar múltiples moléculas indicadoras para crear una señal interna de referencia que se puede usar para distinguir el ruido de fondo de la detección de la señal, especialmente en muestras que presentan, o se prevé que presenten, una señal relativamente débil. Adicionalmente, se puede usar más de una molécula indicadora de SERS para evitar o superar la radiación no específica emitida desde la solución en muestra en ensayo, es decir, radiación emitida desde la solución de la muestra que no se puede atribuir a una medida directa o indirecta de un analito de interés.

Además, los métodos para amplificar una señal SERS en un ensayo en medio líquido, tal como se describe en la solicitud de patente internacional PCT n° PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, también son de aplicación para su uso con las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud.

4. Ensayos SERS en medio líquido con captura magnética

En algunas realizaciones, los reactivos de ensayo SERS en medio líquido de la presente memoria se pueden utilizar en un ensayo de captura magnética. En dichas realizaciones, los componentes del ensayo, incluyendo las partículas, marcas, y moléculas enlazadoras específicas, se introducen en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene uno o más analitos de interés. Tras dejar que el reactivo interactúe con la solución de complejo, las nanopartículas se pueden localizar usando las propiedades magnéticas de las partículas. En algunas realizaciones, se puede usar un reactivo de captura magnética para facilitar la localización de las nanopartículas activas en SERS. En dichas realizaciones, las partículas magnéticas se pueden marcar con una molécula enlazadora que tenga afinidad por uno o más analitos de interés. Las propiedades magnéticas de las partículas magnéticas se pueden usar para localizar el complejo de nanopartícula activa en SERS-analito para detectar la señal SERS. Los métodos representativos para realizar ensayos SERS en medio líquido con captura magnética se han descrito en la solicitud de patente internacional PCT n° PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al, presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Dichos métodos pueden incluir métodos de referenciación y control para compensar las variaciones en el tamaño, forma o colocación del aglomerado magnético, y los métodos para generar espectros de referencia Raman y análisis espectral mejorados en ensayos magnéticos en medio líquido con despliegue magnético también se describen en el documento PCT/US2008/057700.

En algunas realizaciones, el complejo de nanopartícula activa en SERS-analito se localiza en una zona predeterminada del recipiente de la muestra, por ejemplo, un tubo de recogida de muestra. A continuación, se puede dirigir radiación a la zona de localización y la señal puede detectarse. La localización del agente de detección único puede aumentar la interacción entre la molécula indicadora y la superficie, y aumentar la señal al concentrar el efecto SERS en una zona concreta del recipiente de la muestra.

La captura magnética de las partículas se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no se limitan a, colocar un imán fuerte o introducir un campo magnético en una zona localizada del recipiente de recogida de la muestra.

5 Más particularmente, en algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, conjugadas con una molécula enlazadora específica que tenga afinidad por el analito o analitos de interés se puede colocar en un recipiente de recogida de muestra antes de, concurrente con, o posterior a disponer en su interior una muestra biológica que se sospecha que contiene uno o más analitos diana de interés. Las partículas magnéticas, también conjugadas con una molécula enlazadora específica que tenga afinidad por el analito o analitos de interés, se pueden introducir en el recipiente de recogida de muestra. El analito o analitos diana de interés presentes en la muestra se pueden unir a las nanopartículas activas en SERS y a las partículas magnéticas, formando de esta manera un complejo en donde el analito o analitos diana están intercalados entre la nanopartícula activa en SERS y la partícula magnética. Los complejos en sándwich se pueden concentrar en una zona localizada del recipiente de recogida de muestra por aplicación de un campo magnético. Después de un tiempo de incubación adecuado, los complejos en sándwich se puede detectar iluminando la zona localizada del recipiente de recogida de muestras con radiación incidente de la longitud de onda adecuada y medir la señal SERS emitida por la molécula indicadora activa en SERS.

20 Tal como se describe en el presente documento, un enlazador de PEG puede unir la molécula enlazadora específica a la superficie de la nanopartícula activa en SERS para reducir la unión no específica de moléculas a la nanopartícula. En algunas realizaciones en donde se realiza un ensayo de captura magnética, puede unirse una molécula enlazadora específica a la superficie de la partícula magnética mediante un enlazador. En algunas de estas realizaciones, la molécula enlazadora comprende un enlazador de PEG. El enlazador de PEG puede variar en su longitud, peso molecular, y grupos funcionales útiles para unir la molécula enlazadora específica a la partícula magnética, tal como se describe en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, la molécula de PEG o el conjugado PEG-molécula enlazadora específica se une a la partícula magnética mediante la reacción de grupos maleimida reactivos con tiol de la molécula de PEG con los grupos tiol de la superficie de la partícula magnética para formar un enlace carbono-azufre. La superficie de la partícula magnética se puede funcionalizar con un grupo tiol tratando una partícula magnética carboxilada con una molécula terminada en amina que contiene un disulfuro interno. El disulfuro se puede escindir con ditiotreitil u otro agente adecuado, exponiendo un grupo tipo reactivo. En algunas de estas realizaciones, el enlazador de PEG comprende un enlazador de PEG heterobifuncional con un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo con amina en un extremo y un grupo maleimida en el otro extremo.

5. *Analitos diana de interés representativos*

35 Los métodos descritos en la presente solicitud se pueden usar para evaluar o medir la presencia o la cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica. El término "analito", tal como se usa en el presente documento, se refiere de forma general a una sustancia a detectar, que puede estar presente, o se sospecha su presencia en una muestra de ensayo. Más particularmente, un "analito" puede ser cualquier sustancia para la que existe una molécula enlazadora específica natural, tal como una proteína de unión o un receptor, o para el que se puede preparar una molécula enlazadora específica. Por consiguiente, un "analito" es una sustancia que se puede unir a una o más moléculas enlazadoras específicas en un ensayo. En algunas realizaciones, el analito puede ser cualquier compuesto, tal como un metabolito, a detectar o medir y que tiene al menos un sitio de unión.

40 Los analitos diana pueden ser cualquier molécula o compuesto, cuya presencia o cantidad se va a determinar en una muestra que se va a ensayar. Los ejemplos de las clases de analitos que se pueden medir mediante los métodos descritos en la presente solicitud incluyen, pero no se limitan a aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos grasos, lípidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, glucoproteínas, tal como el antígeno prostático específico (PSA), proteoglicanos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fármacos, metabolitos de fármacos, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas y polímeros naturales o sintéticas. Los ejemplos de analitos diana incluyen, pero sin limitación, glucosa, ácidos grasos libres, ácido láctico, proteína C reactiva y mediadores anti-inflamatorios, tales como citoquinas, eicosanoides, o leucotrienos. En algunas realizaciones, los analitos diana se seleccionan del grupo que consiste en ácidos grasos, proteína C reactiva, y leucotrienos. En otra realización, los analitos diana se seleccionan del grupo que consiste en glucosa, ácido láctico y ácidos grasos.

50 Más particularmente, en algunas realizaciones, el analito puede incluir glucosa, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, antígeno específico de próstata (PSA), isoenzima creatina quinasa MB (CKMB), proteína troponina I cardíaca (cTnl), hormona estimuladora del tiroides (TSH), antígeno de la gripe A (Flu A), antígeno de la gripe B (Flu B), y antígeno del virus sincitial respiratorio (RSV).

55 El antígeno específico de próstata (PSA) es una proteína producida por las células de la glándula protática y de forma típica está presente en pequeñas cantidades en el suero de hombres normales. PSA puede estar elevado en hombres afectados por cáncer de próstata u otros trastornos prostáticos. Se considera que los niveles normales de PSA en sangre están comprendidos de aproximadamente 0,0 a 4,0 ng/ml, mientras que niveles de PSA de 4 a 10 ng/ml (nanogramos por mililitro) se consideran sospechosos.

La creatina quinasa (CK), también conocida como fosfocreatina quinasa o creatina fosfoquinasa (CPK) es una enzima que se encuentra predominantemente en el corazón, cerebro, y músculo esquelético. La creatina quinasa comprende tres enzimas que difieren ligeramente en su estructura: CK-BB (también denominada como CPK-1) se concentra en el cerebro y los pulmones; CK-MB (también denominada como CPK-2) se encuentra principalmente en el corazón; y CK-MM (también denominada como CPK-3) se encuentra principalmente en el músculo esquelético. Se realizan ensayos diagnósticos de las isoenzimas específicas de CPK cuando el nivel total de CPK es elevado, y puede ayudar a diferenciar el origen del tejido dañado. Por ejemplo, una lesión al cerebro, por ejemplo, un ictus, o pulmones, por ejemplo, una embolia pulmonar, pueden estar asociados con niveles elevados de CK-BB. Además, CK-MM es normalmente responsable de casi toda la actividad enzimática de CPK en sujetos sanos. Cuando esta isoenzima concreta es elevada, usualmente indica lesión o estrés en el músculo esquelético.

Los niveles de CK-MB se pueden medir en sujetos que tienen dolor torácico para diagnosticar si tienen un infarto de miocardio y/o es una indicación de lesión de miocardio durante los infartos de miocardio. Normalmente, los valores CK-MB muestran un aumento significativo en los valores de CK-MB en las primeras dos a tres horas después de un infarto de miocardio. Si no hay daño adicional al músculo cardíaco, el nivel aumenta en las 12-24 horas posteriores y vuelve a la normalidad 12-48 horas después de la muerte tisular. Los niveles de CK-MB no suelen aumentar en el caso de dolor torácico causado por angina, embolia pulmonar (coágulo de sangre en el pulmón), o insuficiencia cardíaca congestiva. También se pueden observar niveles elevados de CK-MB en sujetos que padecen miocarditis (inflamación del músculo cardíaco, por ejemplo, debido a esfuerzos), lesiones eléctricas, traumatismo en el corazón, desfibrilación cardíaca, y cirugía a corazón abierto. Los valores de CK-MB en suero sanguíneo medidos en este tipo de ensayos suelen estar comprendidos entre aproximadamente 0,0 y aproximadamente 10 ng/ml. Los valores de CK-MB mayores de aproximadamente 5 ng/ml confirman de forma típica un diagnóstico de infarto de miocardio.

La proteína troponina I cardíaca (cTnI) también es un predictor independiente de eventos cardíacos principales. Véase, por ejemplo, Polancvzk. C. A., et al. "Cardiac troponin I as a predictor of major cardiac events in emergency department patients with acute chest pain", *J Am. Coll. Cardiol.*, 32, 8-14 (1998). Los valores de cTnI en suero sanguíneo medidos en sujetos con sospecha de tener un infarto de miocardio están en un intervalo de aproximadamente 0,4 ng/ml a aproximadamente 1,5 ng/ml. Id. Los ensayos de cTnI con límites de detección de 0,1 ng/ml tienen el potencial, sin embargo, de ser más sensibles para detectar una lesión en el miocardio. Id.

La hormona estimuladora del tiroides (TSH) se sintetiza y se secreta mediante las células tirotropas en la glándula pituitaria anterior que regula la función endocrina de la glándula tiroides. Los niveles de TSH se ensayan en la sangre de los sujetos con sospecha de padecer un exceso (hipertiroidismo) o deficiencia (hipotiroidismo) de la hormona tiroidea. Los niveles de TSH normales en adultos están comprendidos entre 0,4 miliunidades internacionales por litro (mIU/l) a aproximadamente 4,5 mIU/l. Los ensayos actuales de TSH incluyen un ELISA en sándwich para la medida de TSH en suero sanguíneo o plasma, en el que TSH de la muestra está unido por anticuerpos monoclonales dirigidos contra TSH y después detectarse mediante espectrofotometría o colorimetría.

Los ensayos descritos en la presente solicitud también se pueden usar para detectar los virus de la gripe. Existen tres tipos de virus de la gripe: Virus de la gripe A; Virus de la gripe B; y Virus de la gripe C. La Gripe A (Flu A) y Gripe C (Flu C) infectan múltiples especies, mientras que la gripe B (Flu B) infecta casi exclusivamente a seres humanos. Los virus de tipo A son los patógenos humanos más virulentos entre los tres tipos de gripe, y de forma típica causan la enfermedad más grave. El virus de la gripe A se puede subdividir en diferentes serotipos en función de la respuesta de anticuerpos a estos virus, e incluyen H5N1 (es decir, "gripe española"); H2N2 (es decir, "gripe de Hong Kong"); H5N1 (es decir, cepa de gripe aviar o "gripe aviar"); H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3, y H10N7. La gripe B es un patógeno casi exclusivamente humano, y es menos frecuente que la gripe A y solo incluye un serotipo. El virus de la gripe C infecta seres humanos y cerdos y puede causar enfermedades graves y epidemias locales, pero es menos frecuente que los otros tipos.

Los ensayos diagnósticos disponibles para la gripe incluyen un inmunoensayo rápido, ensayo por inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología, y cultivo vírico. Los ensayos de inmunofluorescencia conllevan la tinción de especímenes inmovilizados en portas de microscopio usando anticuerpos con marcas fluorescentes para su observación al microscopio de fluorescencia. Los métodos de cultivo utilizan el asilamiento vírico inicial en cultivo celular, seguido por inhibición por ensayos de hemoadsorción, inmunofluorescencia, o neutralización para confirmar la presencia del virus de la gripe. Los ensayos de detección de anticuerpos para diagnosticar la infección por gripe incluyen los kits de ensayo DIRECTIGEN™ EZ Flu A o DIRECTIGEN™ EZ Flu A+B, (disponible de BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland). Dichos inmunoensayos cromatográficos rápidos se pueden usar para la detección directa de la gripe A o la gripe B y los antígenos del virus B a partir de lavados/aspirados nasofaríngeos, frotis nasofaríngeos y frotis de garganta de pacientes sintomáticos. Además, dichos ensayos diagnósticos se pueden utilizar para distinguir entre la gripe A y la gripe B.

El virus sincitial respiratorio (RSV) es la causa más frecuente de bronquiolitis y neumonía entre bebés y niños menores de 1 año de edad. RSV es un virus encapsulado de ARN de sentido contrario. El diagnóstico de la infección por RSV se puede realizar mediante aislamiento de virus, detección de antígenos virales, detección de ARN viral, demostración de un aumento en los anticuerpos séricos, o una combinación de estos enfoques. Los métodos tradicionales para la detección de los virus respiratorios incluyen cultivos celulares y anticuerpo fluorescente directo (DFA). Los inmunoensayos enzimáticos (EIA) y los sistemas manuales rápidos están disponibles para virus específicos tales

como Gripe A/B y RSY. Actualmente, la mayoría de laboratorios clínicos utilizan ensayos de detección de antígenos para diagnosticar la infección por RSY, tales como el ensayo DIRECTIGEN™ EZ RSV (disponible de BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland), que es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección directa y cualitativa del antígeno RSV en lavados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, frotis nasofaríngeos y frotis/lavados nasofaríngeos de sujetos con sospecha de tener una infección respiratoria vírica.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia o la cantidad de un analito diana en una muestra biológica, por ejemplo, suero sanguíneo, en donde el analito diana incluye glucosa, antígeno específico de próstata (PSA), isoenzima creatina quinasa MB (CKMB), proteína troponina I cardíaca (cTnI), hormona estimuladora del tiroides (TSH), antígeno de la gripe A (Flu A), antígeno de la gripe B (Flu B), y antígeno del virus sincitial respiratorio (RSV), comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociado con la misma al menos una molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el analito, por ejemplo, una proteína de unión específica o un anticuerpo monoclonal o policlonal para el analito de interés, y al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A-Y; iluminar la muestra biológica con radiación incidente a una longitud de onda para inducir a la molécula indicadora activa en SERS a producir una señal SERS; y medir la señal SERS para detectar la presencia o la cantidad de analito en la muestra biológica.

Como se emplea en esta memoria, el término "carbohidrato" incluye, pero no se limita a monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. "Carbohidrato" también incluye, pero no se limita a, moléculas que comprenden carbono, hidrógeno y oxígeno y no están comprendidos en la definición tradicional de un sacárido, es decir, un derivado de aldehído o cetona de un alcohol polihidroxilado de cadena lineal, que contiene al menos tres átomos de carbono. Por tanto, por ejemplo, un carbohidrato tal como se usa en el presente documento puede contener menos de tres átomos de carbono.

El término "ácidos grasos", tal como se usa en el presente documento, incluyen ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos libres (FFA) y ácidos grasos esterificados con otras moléculas. Los ejemplos de ácidos grasos específicos incluyen, pero sin limitación, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, y araquidonato. El término "ácido graso libre" se usa en el presente documento tal como es conocido en la técnica en que los FFA no forman parte de otras moléculas, tales como triacilglicéridos o fosfolípidos. Los ácidos grasos libres también incluyen ácidos grasos no esterificados que están unidos o adsorbidos en albúmina. Como se emplea en esta memoria, el término "ácido graso no unido" (FFA no unido) se utiliza para denotar un ácido graso libre o ácidos grasos libres que no están unidos o adsorbidos sobre albúmina u otras proteínas séricas.

Como se emplea en esta memoria, el término "lípidos" se utiliza como tal en la técnica, es decir, una sustancia de origen biológico que está hecha principal o exclusivamente de grupos químicos no polares de forma que son fácilmente solubles en la mayoría de disolventes orgánicos, pero solamente ligeramente soluble en disolventes acuosos. Los ejemplos de lípidos incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos, triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, colesterol, esteroides y derivados de los mismos. Por ejemplo, "lípidos" incluyen pero no se limitan a, ceramidas, que son derivados de esfingolípidos y derivados de ceramidas, tales como esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos. "Lípidos" también incluye, pero sin limitación, las clases habituales de glicerofosfolípidos (o fosfolípidos), tales como ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, y similares.

Como se emplea en esta memoria, un "fármaco" puede ser un fármaco conocido o un fármaco candidato, cuya actividad o efectos sobre un tipo de célula concreta aún no se conocen. Un "metabolito de fármaco" es cualquiera de los subproductos o productos de descomposición de un fármaco que se transforman químicamente en otro compuesto o compuestos. Como se emplea en esta memoria, "moléculas orgánicas pequeñas" incluyen, pero no se limita a, una molécula o compuesto orgánico que no encaja precisamente en otras clasificaciones destacadas en el presente documento. Más particularmente, la expresión "molécula orgánica pequeña", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos, tanto de origen natural como de creación artificial (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente pequeño y que no son proteínas, polipéptidos, o ácidos nucleicos. Normalmente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1500 g/mol. Asimismo, las moléculas pequeñas suelen tener múltiples enlaces carbono-carbono.

Además, en algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar uno o más de un ácido nucleico, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN), un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, y similares. En general, el método comprende poner en contacto uno o más de un ácido nucleico, un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, con una nanopartícula activa en SERS descrita en la presente solicitud que tiene un oligonucleótido unido a la anterior y detectar la presencia o un cambio en el espectro SERS de la misma. En realizaciones ilustrativas, los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud tienen una secuencia o secuencias complementarias con partes de la secuencia del ácido nucleico diana, fragmento de ADN, nucleótido, polinucleótido, u oligonucleótido. Un espectro SERS detectable, y/o un cambio en el espectro SERS, se pueden observar como un resultado de la hibridación del oligonucleótido unido a la nanopartícula activa en SERS y el ácido nucleico diana, fragmento de ADN, nucleótido, polinucleótido, u oligonucleótido.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, los oligonucleótidos, o ambos se pueden funcionalizar para unir los oligonucleótidos a las nanopartículas. Dichos métodos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos funcionalizados con alcanotioles en el extremo 3' o el extremo 5' se unen fácilmente a las nanopartículas, incluyendo el oro y otras nanopartículas metálicas. Véase, por ejemplo, Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, Tex., pp. 109-121 (1996); véase también, Mucic et al. Chem. Commun. 555-557 (1996) (que describe un método para unir el tiol en 3' de ADN a superficies de oro planas que también se puede usar para unir oligonucleótidos a nanopartículas).

Otros grupos funcionales adecuados para unir oligonucleótidos a superficies sólidas incluyen los grupos fosforotioato (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 5.472.881 de Beebe et al., que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, para la unión de oligonucleótido-fosforotioatos a superficies de oro), alquilsiloxanos sustituidos (véase, por ejemplo, Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981) para la unión de oligonucleótidos a superficies de sílice y de vidrio, y Grabar et al. Anal. Chem., 67, 735-743 (1995) para la unión de aminoalquilsiloxanos y para la unión similar de mercaptoalquilsiloxanos). Los oligonucleótidos que terminan con un 5' tiónucleósido o un 3' tiónucleósido también pueden usarse para unir los oligonucleótidos a las superficies sólidas.

Se conocen en la técnica otros métodos para unir oligonucleótidos a nanopartículas. Tales métodos se describen en las siguientes referencias representativas. Nuzzo et al. J. Am. Chem. Soc., 109, 2358 (1987) (disulfuros sobre oro); Allara y Nuzzo, Langmuir, 1, 45 (1985) (ácidos carboxílicos sobre aluminio); Allara y Tomnkins, J. Colloid Interface Sci, 49, 410-421 (1974) (ácidos carboxílicos sobre cobre); Her. The Chemistry Of Silica, Capítulo 6, John Wiley & Sons, Nueva York (1979) (ácidos carboxílicos sobre sílice); Timmons y Zisman, J. Phys. Chem., 69, 984-990 (1965) (ácidos carboxílicos sobre paladio); Soriaga y Hubbard, J. Am. Chem. Soc., 104, 3937 (1982) (compuestos de anillo aromático sobre platino); Hubbard, Acc. Chem. Res., 13, 177 (1980) (sulfolanos, sulfóxidos y otros disolventes funcionalizados sobre platino); Hickman et al. J. Am. Chem. Soc., 111, 7271 (1989) (isonitrilos sobre platino); Maoz y Sagiv, Langmuir, 3, 1045 (1987) (silanos sobre sílice); Maoz y Sagiv, Langmuir, 3, 1034 (1987) (silanos sobre sílice); Wasserman et al, Langmuir, 5, 1074 (1989) (silanos sobre sílice); Eltekova y Eltekov, Langmuir, 3, 951 (1987) (ácidos carboxílicos aromáticos, aldehídos, alcoholes y grupos metoxi sobre dióxido de titanio y sílice); Lee et al, J. Phys. Chem., 92, 2597 (1988) (fosfatos rígidos sobre metales).

Además, los oligonucleótidos funcionalizados con un disulfuro cíclico, por ejemplo, disulfuros cíclicos que tengan un anillo de 5 a 6 miembros que incluyen al menos dos átomos de azufre, también son adecuados para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud. Los disulfuros cíclicos adecuados están comercialmente disponibles o se pueden sintetizar mediante procedimientos conocidos. También se puede usar la forma reducida de los disulfuros cíclicos. En algunas realizaciones, el disulfuro cíclico puede incluir adicionalmente un enlazador, por ejemplo, un resto hidrocarburo, tal como un resto esteroide, unido a la anterior.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos) están unidos a la superficie exterior de una nanopartícula activa en SERS a través de una molécula enlazadora. En realizaciones particulares, la molécula enlazadora comprende un enlazador de PEG. El enlazador de PEG se puede unir al polinucleótido y a la nanopartícula mediante cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en otra parte del presente documento.

Cada nanopartícula puede tener una pluralidad de oligonucleótidos unidos a la misma. Como resultado, cada conjugado nanopartícula-oligonucleótido se puede unir a una pluralidad de oligonucleótidos o ácidos nucleicos que tengan una secuencia complementaria. Los métodos para preparar oligonucleótidos de una secuencia predeterminada son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y F. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1ª Ed. (Oxford University Press, Nueva York, 1991). Pueden usarse métodos de síntesis en fase sólida para los oligonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos (los métodos conocidos para sintetizar ADN también son útiles para sintetizar ARN). Los oligonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos también se pueden preparar enzimáticamente.

Por consiguiente, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar ácidos nucleicos. Mediante el método descrito en la presente solicitud puede detectarse cualquier tipo de ácido nucleico. Por tanto, los métodos descritos en la presente solicitud pueden usarse en varias aplicaciones que requieren la detección de un ácido nucleico, por ejemplo, en el diagnóstico de una enfermedad y en la secuenciación de ácidos nucleicos. Los ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden detectar mediante los métodos descritos en la presente solicitud incluyen, pero sin limitación, genes (por ejemplo, un gen asociado con una enfermedad concreta), ARN y ADN vírico, ADN bacteriano, ADN fúngico, ADNc ARNm, fragmentos de ARN y ADN, oligonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos modificados, ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios, ácidos nucleicos naturales y sintéticos, y similares.

Los ejemplos representativos de los usos de los métodos para detectar ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades víricas (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis, virus del herpes, citomegalovirus, y virus de Epstein-Barr), enfermedades bacterianas (por ejemplo, tuberculosis, enfermedad de Lyme, *H. pylorii*, infecciones por *Escherichia coli*, infecciones por Legionella, infecciones por Mycoplasma, infecciones por Salmonella), enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, gonorrea), trastornos heredados (por ejemplo, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchene, fenilcetonuria, anemia de células

falciformes), y cánceres (por ejemplo, genes asociados con el desarrollo de cáncer); en medicina forense; en la secuenciación de ADN; para pruebas de paternidad; para autenticar líneas celulares; para seguimiento de la terapia génica; y para otros muchos fines.

- 5 El ácido nucleico a detectar se puede aislar por métodos conocidos, o se puede detectar directamente en células, muestras de tejidos, fluidos biológicos (por ejemplo, saliva, orina, sangre, suero, y similares), soluciones que contienen componentes de la PCR, soluciones que contienen importantes excesos de oligonucleótidos o ADN de elevado peso molecular, y otras muestras, tal como es también conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins. Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995). Los métodos para preparar ácidos nucleicos para su detección con sondas de hibridación son también bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins. Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995). Si un ácido nucleico está presente en pequeñas cantidades, se pueden aplicar por métodos conocidos en la técnica, incluyendo la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins. Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995).
- 10
- 15 Un método descrito en la presente solicitud para detectar ácido nucleico comprende poner en contacto un ácido nucleico con una o más de las nanopartículas descritas en la presente solicitud que tengan oligonucleótidos unidos a la misma. El ácido nucleico a detectar puede tener al menos dos partes. Las longitudes de estas partes y las distancia(s), en su caso, entre ellas se seleccionan de forma tal que, cuando los oligonucleótidos de las nanopartículas se hibridan con el ácido nucleico, se puede observar una señal SERS detectable. Estas longitudes y distancias se pueden determinar empíricamente y dependen del tipo de partícula utilizada y de su tamaño y del tipo de electrolito presente en las soluciones usadas en el ensayo (como es conocido en la técnica, algunos electrolitos afectan a la conformación de los ácidos nucleicos).
- 20

- 25 Asimismo, cuando se debe detectar un ácido nucleico en presencia de otros ácidos nucleicos, las partes del ácido nucleico a las que se unen los oligonucleótidos de las nanopartículas se seleccionan de tal forma que contengan suficiente secuencia única para que la detección del ácido nucleico sea específica. Se conocen bien en la técnica las directrices para hacer esto. La puesta en contacto de los conjugados de nanopartícula-oligonucleótido con el ácido nucleico se produce en condiciones eficaces para la hibridación de los oligonucleótidos de las nanopartículas con la(s) secuencia(s) diana del ácido nucleico. Estas condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y se pueden optimizar fácilmente para el sistema concreto utilizado. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989). En algunas realizaciones, se utilizan condiciones de hibridación rigurosas.
- 30

Los métodos representativos para detectar ácidos nucleicos mediante el uso de las nanopartículas activas en SERS que tengan oligonucleótidos unidos a las mismas se describe en la patente de los Estados Unidos nº 7.169.556 de Park et al. que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

6. Instrumentación representativa para detectar una señal SERS emitida por una muestra de ensayo

- 35 En algunas realizaciones, un láser sirve como fuente de excitación de la radiación incidente utilizada para detectar uno o más analitos diana de interés. Un experto en la técnica, tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud, podrá discernir el tipo de láser, incluyendo la intensidad y la longitud de onda de excitación, adecuadas para su uso con las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en el presente documento. La radiación dispersada o emitida desde la muestra se puede detectar usando sistemas de detección conocidos en la técnica.
- 40 En algunas realizaciones, puede usarse más de un tipo de fuente de radiación o más de una longitud de onda de excitación. Por ejemplo, en realizaciones en donde se van a detectar dos analitos de interés, el único reactivo de detección puede incluir dos tipos diferentes de moléculas indicadoras activas en SERS y/o dos tipos diferentes de moléculas enlazadoras específicas. Por consiguiente, puede usarse radiación incidente de diferentes longitudes de onda para producir diferentes señales Raman de cada analito de interés. Como reconocerá un experto en la técnica, tras la revisión de la materia objeto descrita en la presente solicitud, la selección de longitud(es) de onda concretas a utilizar dependen del analito de interés, las moléculas enlazadoras específicas usadas, y la molécula indicadora activa particular usada en SERS.
- 45

- 50 El ensayo descrito en la presente solicitud se puede realizar con cualquier espectrómetro Raman adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un espectrómetro Raman de tipo espectrómetro múltiple multimodo (Centice, Morrisville, Carolina del Norte, Estados Unidos de América), tal como el sistema Raman descrito en la patente de los Estados Unidos Nº 7.002.679 de Brady et al. que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. La instrumentación adicional adecuada para su uso con las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se describe en la solicitud de patente internacional PCT nº PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al. presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

- 55 Los dispositivos de detección, tales como detectores ópticos, fuentes de radiación, y sistemas informáticos, microprocesadores, y programas y algoritmos informáticos, pueden usarse en cualquier combinación para llevar a la práctica los métodos descritos en el presente documento. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un programa informático, u otras instrucciones legibles por un ordenador puede usarse para interpretar, analizar, compilar, u

obtener de otra forma los datos de salida relacionados con el ensayo óptico descrito en la presente solicitud. Se puede usar un programa informático u otro sistema informático para visualizar, almacenar, o transmitir los datos de salida, tanto en forma digital como en otras formas a uno o más usuarios.

7. Recipiente de recogida de muestra

5 En algunas realizaciones, el recipiente de muestra se selecciona del grupo que consiste en una cubeta, un tubo, tal como un tubo para extraer la sangre, o cualquier otro recipiente de recogida de muestra compatible con la muestra objeto de ensayo y las mediciones SERS. En algunas realizaciones, el recipiente de recogida de muestra, por ejemplo, un tubo, puede tener una presión interna inferior a la presión atmosférica del entorno circundante. Dichos recipientes de recogida de muestras se describen en las patentes de los Estados Unidos con números 5.860.937 de Cohen; 10 5.906.744 de Carroll et al.; y 6.821.789 de Augello et al., cada una de ellas se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Los recipientes de ensayo adicionales adecuados para su uso con las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud, en particular para su uso en ensayos de captura magnética, se describen en la solicitud de patente internacional PCT n° PCT/US2008/057700 de Weidemaier et al. presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Además, en algunas realizaciones, el recipiente de recogida de muestra incluye un único reactivo de detección que comprende las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud. En dichas realizaciones, el recipiente de recogida de muestra tiene un único reactivo de detección dispuesto en su interior antes de que el usuario, por ejemplo, un paciente o un técnico sanitario, recoja la muestra biológica, por ejemplo, sangre, a detectar. El reactivo de detección único, por ejemplo, se puede inmovilizar en una superficie interna, por ejemplo, una pared interna, del recipiente de 20 recogida de muestra o simplemente disponerse de otra forma en el interior del recipiente para muestras.

El recipiente de recogida de muestra, por ejemplo, un tubo para extraer la sangre, se puede enviar al usuario con el reactivo de detección único dispuesto en su interior. Como alternativa, el usuario puede seleccionar un reactivo de detección adecuado e introducir el reactivo de detección en el dispositivo de recogida antes de recoger el espécimen de la muestra. Además, la materia objeto descrita en la presente solicitud puede incluir un kit que comprende uno o 25 más de un recipiente de recogida de muestra, tal como un tubo para extraer la sangre, uno o más reactivos, tal como uno o más reactivos de detección individuales que comprenden nanopartículas que tienen una molécula indicadora activa en SERS unida a las anteriores, partículas de captura magnética, y los componentes individuales de las mismas. Dichos kits pueden incluir cualquier número de los componentes del ensayo, incluyendo, pero no se limitan a, varias moléculas indicadoras o varias moléculas enlazadoras específicas tanto unidas a una nanopartícula o 30 envasadas separadamente de las anteriores.

Como se emplea en esta memoria, el término "muestra" incluye cualquier muestra de líquido o fluido, incluyendo una muestra derivada de una fuente biológica, tal como un fluido fisiológico, incluyendo sangre completa o componentes de la sangre completa, tal como eritrocitos, leucocitos, plaquetas, suero y plasma; ascites; orina; saliva; sudor; leche; fluido sinovial; fluido peritoneal; fluido amniótico; fluido pericardial; fluido pericardial; extractos de tejidos; y otros 35 componentes del organismo con sospecha de contener el analito de interés. Además de los fluidos fisiológicos, otras muestras líquidas, tales como agua, productos alimenticios y similares, para la realización de ensayos de comportamiento ambiental o de producción de alimentos son adecuados para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud. También se puede usar como muestra de ensayo un material sólido que se sospecha que contiene la muestra de ensayo. En algunos casos podría ser beneficioso modificar una muestra de ensayo sólida para formar un medio líquido o para liberar el analito. 40

En algunas realizaciones, la muestra se puede pretratar antes de su uso, tal como preparar plasma a partir de la sangre, diluir fluidos viscosos, o similares. Dichos métodos de tratamiento pueden implicar la filtración, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes, y la adición de reactivos.

45 La muestra puede ser cualquier muestra obtenida de un sujeto. El término "sujeto" se refiere a un organismo, tejido, o célula del que se puede obtener una muestra. Un sujeto puede incluir un sujeto humano para fines médicos, tales como el diagnóstico y/o el tratamiento de una dolencia o enfermedad, o un sujeto animal para fines médicos, veterinarios, o fines de desarrollo. Un sujeto también puede incluir material de muestra procedente de cultivo tisular, cultivo celular, replicación de órgano, producción de citoblastos y similares. Los sujetos animales adecuados incluyen mamíferos y aves. El término "ave", como se emplea en esta memoria, incluye pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, y faisanes. El término "mamífero", como se emplea en esta memoria, incluye pero no se limita a, los primates, por ejemplo, seres humanos, monos, simios, y similares; bovinos, por ejemplo, ganado, bueyes, y similares; ovinos, por ejemplo, ovejas y similares; caprinos, por ejemplo, cabras y similares; porcinos, por ejemplo, cerdos, porcinos, y similares; equinos, por ejemplo, caballos, monos, cebras, y similares; felinos, incluyendo gatos salvajes y domésticos; cánidos, incluyendo perros; lagomorfos, incluyendo conejos, liebres, y similares; y roedores, incluyendo ratones, ratas, y similares. Preferentemente, el sujeto es un mamífero o una célula de mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un sujeto es un ser humano o una célula humana. Los sujetos humanos incluyen, pero sin limitación, sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos. Además, un "sujeto" puede incluir un paciente afectado o con sospecha de estar afectado por una dolencia o enfermedad. Por tanto, los términos "sujeto" y "paciente" 60 se utilizan de forma indistinta en el presente documento. Un sujeto también puede referirse a células o colecciones de células en cultivos de laboratorio o de bioprocésamiento en ensayos de viabilidad, diferenciación, producción de

marcadores, expresión, y similares.

Los métodos descritos en la presente solicitud se pueden usar en el diagnóstico, pronóstico, o la monitorización de una patología o dolencia. Como se emplea en esta memoria, el término "diagnóstico" se refiere a un proceso predictivo en el que se evalúa la presencia, ausencia o evolución del tratamiento de una enfermedad, trastorno u otra patología médica. Para los fines del presente documento, el diagnóstico también incluye los procesos predictivos para determinar el resultado derivado de un tratamiento. Del mismo modo, el término "diagnosticar" se refiere a la determinación de si un espécimen de muestra presenta una o más características de una dolencia o enfermedad. El término "diagnosticar" incluye establecer la presencia o ausencia de, por ejemplo, un antígeno diana o dianas unidas a un reactivo, o establecer, o determinar de otra forma una o más características de una dolencia o enfermedad, incluyendo el tipo, grado, estadio, o estado similar. Como se emplea en esta memoria, el término "diagnosticar" puede incluir distinguir una forma de una enfermedad de otra forma. El término "diagnosticar" abarca el diagnóstico inicial o la detección, pronóstico, y el seguimiento de una dolencia o enfermedad.

El término "pronóstico" y sus derivados se refieren a la determinación o predicción de la evolución de una enfermedad o dolencia. La evolución de una enfermedad o dolencia se puede determinar, por ejemplo, en función de la esperanza de vida o la calidad de vida. "Pronóstico" incluye la determinación de la evolución temporal de una enfermedad o dolencia, con o sin un tratamiento o tratamientos. En el caso en el que se contempla(n) tratamiento(s), el pronóstico incluye la determinación de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad o dolencia.

Como se emplea en esta memoria, el término "riesgo" se refiere a un proceso predictivo en el que se evalúa la probabilidad de obtener un resultado concreto.

El término "seguimiento" tal como en "n "seguimiento de la evolución de una enfermedad o dolencia" se refiere al diagnóstico continuado de muestras obtenidas de un sujeto que padece, o se sospecha que tiene una enfermedad.

El término "marcador" se refiere a una molécula, tal como una proteína, incluyendo un antígeno, que cuando se detecta en una muestra es característico, o indica la presencia de una enfermedad o dolencia.

La materia objeto descrita en la presente solicitud también proporciona métodos para seguir patologías en un sujeto, incluyendo las enfermedades crónicas, tales como, pero no se limitan a, enfermedad cardíaca, enfermedad de las arterias coronarias, diabetes, trastornos metabólicos, enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, y cáncer. Los trastornos metabólicos pueden incluir, pero sin limitación, hiperlipidemia, hipolipidemia, hipertiroidismo, e hipotiroidismo.

Además, los métodos descritos en la presente solicitud se pueden usar para seguimiento de marcadores específicos de una enfermedad crónica. Mediante el seguimiento de las concentraciones de artefactos moleculares, metabolitos, y moléculas perjudiciales y/o beneficiosas de una patología, se puede evaluar la evolución, regresión o estabilidad de un sujeto, y los tratamientos pueden, a su vez, ajustarse o revisarse de acuerdo con ello. Por ejemplo, los marcadores de enfermedades cardíacas que se pueden controlar *in vivo* usando los biosensores descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos totales, lactato, glucosa, ácidos grasos libres y diferentes agentes cardiotónicos, tales como, pero no se limitan a cardioglicósidos y simpaticomiméticos. Los marcadores de la diabetes incluyen, pero sin limitación, glucosa, lactato y ácidos grasos. Del mismo modo, los marcadores de la enfermedad de las arterias coronarias incluyen, pero sin limitación, péptido C reactivo y ácidos grasos libres. En general, los marcadores de varios trastornos metabólicos incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos específicos.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud son también adecuadas para su uso en dispositivos para seguimiento de tratamientos farmacológicos. De hecho, la nanopartícula activa en SERS se puede diseñar para unirse específicamente a un fármaco, fármaco candidato o metabolito de fármaco. De esta manera, se puede seguir la concentración plasmática del fármaco y se pueden ajustar las dosificaciones, o bien mantenerse, basándose en las mediciones de la concentración proporcionadas mediante el método SERS. Por consiguiente, se podría individualizar un régimen farmacéutico para un sujeto concreto, incluyendo el uso de una nanopartícula activa en SERS que se puede unir de forma específica y reversible al fármaco o metabolito de fármaco para determinar las concentraciones plasmáticas del fármaco. Las concentraciones proporcionadas por el método SERS se pueden usar a continuación para determinar la biodisponibilidad del fármaco en el sujeto. La dosis del fármaco administrado al sujeto se puede alterar después para aumentar o disminuir la biodisponibilidad del fármaco en el sujeto para proporcionar el máximo beneficio terapéutico y evitar la toxicidad.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud también pueden usarse para seguir simultáneamente una variedad de metabolitos, cuya medición puede usarse para perfilar el estado físico o metabólico del sujeto. Por ejemplo, durante periodos prolongados de ejercicio extenuante, la glucosa se descompone mediante un proceso anaerobio en ácido láctico. Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar para determinar los umbrales de lactato de los atletas para maximizar los beneficios del ejercicio y disminuir el tiempo de recuperación. De manera similar, las nanopartículas activas en SERS pueden usarse to determine los niveles de lactato en soldados para prevenir la fatiga y el agotamiento y para disminuir el tiempo de recuperación. Con este fin, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden usarse para seguir los niveles de glucosa, niveles de ácido láctico y de otros metabolitos durante el ejercicio o el estrés físico.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden usarse también para seguir una dolencia de un paciente en una instalación de cuidados intensivos, tal como una sala de urgencias o una habitación de cuidados post-operatorios o un hospital. Por ejemplo, en las realizaciones que proporcionan un método para seguir los niveles de glucosa en un sujeto, los estudios han demostrado que la mortalidad se puede disminuir hasta en un 30 % en los pacientes postquirúrgicos cuando los niveles de glucosa se controlan y se mantienen en la normalidad. Por tanto, los ensayos diagnósticos basados en SERS descritos en la presente memoria pueden usarse en situaciones en las que el seguimiento de glucosa o de otros metabolitos es esencial para la recuperación o la salud general del sujeto.

La cantidad de uno o más analitos presentes en una muestra a ensayar puede representarse como una concentración. Como se emplea en esta memoria, el término "concentración" tiene su significado habitual en la técnica. La concentración puede expresarse como un valor cualitativo, por ejemplo, como un resultado de tipo positivo o negativo, por ejemplo, una respuesta "SÍ" o "NO", que indica la presencia o ausencia de un analito diana, como un valor cuantitativo. Además, la concentración de un analito dado se puede notificar como una cantidad relativa o una cantidad absoluta, por ejemplo, como "valor cuantitativo". Los ensayos descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, pueden detectar un analito de interés a un intervalo de concentración de aproximadamente 5 fg/ml a aproximadamente 500 ng/ml; en algunas realizaciones, a un intervalo de concentración de aproximadamente 10 fg/ml a aproximadamente 100 ng/ml; en algunas realizaciones, a un intervalo de concentración de aproximadamente 50 fg/ml a aproximadamente 50 ng/ml.

La cantidad (concentración) de un analito puede ser igual a cero, lo que indica la ausencia del analito concreto deseado o que la concentración del analito concreto está por debajo de los límites de detección del ensayo. La cantidad medida puede ser la señal SERS sin ninguna medición o manipulación adicional. Como alternativa, la cantidad medida se puede expresar como una diferencia, porcentaje o cociente del valor medido del analito particular y un valor medido de otro compuesto, incluyendo, pero no se limitan a, un patrón u otro analito. La diferencia puede ser negativa, lo que indica una disminución en la cantidad de analito(s) medido(s). Las cantidades también se pueden expresar como una diferencia o cocientes del analito o analitos respecto de sí mismo, medido en un punto temporal diferente. Las cantidades de analitos se pueden determinar directamente a partir de la señal generada, o la señal generada puede usarse en un algoritmo, donde el algoritmo está diseñado para correlacionar el valor de las señales generadas con la cantidad de analito(s) en la muestra.

Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud son adecuadas para su uso con dispositivos que pueden medir las concentraciones de uno o más analitos continuamente. Como se emplea en esta memoria, el término "continuamente", junto con la medición de un analito se utiliza para significar el dispositivo que bien genera o bien puede generar una señal detectable en cualquier momento durante la vida útil del dispositivo. La señal detectable puede ser constante, en que el dispositivo siempre está generando una señal, incluso aunque la señal no se detecte. Como alternativa, el dispositivo puede usarse episódicamente, de forma que puede generarse una señal que se detecta en cualquier momento deseado.

B. Obtención de imágenes celulares

El pequeño tamaño de las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud permite que las nanopartículas se incorporen al interior de las células. Por ejemplo, se ha demostrado el uso de SERS para estudiar la complejación de un agente quimioterapéutico con el ADN. Véase Nabiev, I. R. et al. "Selective analysis of antitumor drug interactions with living cancer cells as probed by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Eur. Biophys. J.*, 19, 311-316 (1991); Morani, H. et al. "Molecular and cellular interactions between intopicine, DNA, and topoisomerase II studied by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy," *Cancer Res.*, 53, 4784-4790 (1993). También se ha utilizado el SERS para investigar el mecanismo de la resistencia de determinados cánceres a las sustancias quimioterapéuticas. Véase Breuzard, G. et al. "Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 320, 615-621 (2004). Además, se ha utilizado el SERS para caracterizar la distribución de sustancias químicas concretas en el interior de las células y para distinguir entre el citoplasma y el núcleo de la célula. Véase Kneipp, K. et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles," *Appl. Spectrosc.*, 56(2), 150-154 (2002).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las nanopartículas marcadas con los colorantes descritos en la presente solicitud se pueden utilizar para obtención de imágenes celulares, por ejemplo, para distinguir entre células anómalas, por ejemplo, una célula que presenta una anomalía, como una célula cancerosa, comparada con las células normales de una muestra biológica. En dichas realizaciones, la intensidad de la señal Raman que procede del colorante es proporcional a la densidad de las células detectadas. Además, en algunas realizaciones, las nanopartículas marcadas con los colorantes descritos en la presente solicitud también se pueden marcar con otras especies, tal como una molécula enlazadora específica de un par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, para facilitar la unión a una célula de interés. El uso de las nanopartículas activas en SERS para la obtención de imágenes celulares se describe en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos con números 2006/0054506 y 2006/0046313, cada una de ellas incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para detectar la presencia de una o más estructuras diana en una célula de muestra, comprendiendo el método:

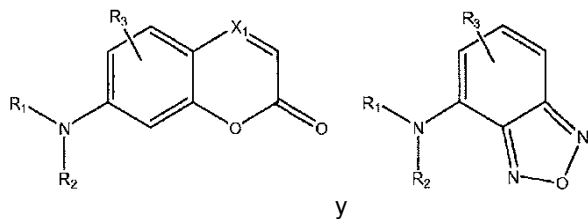
- (a) poner en contacto una o más células de la muestra con una o más nanopartículas activas en SERS marcadas con una o más moléculas enlazadoras en condiciones adecuadas para la unión de la una o más moléculas enlazadoras a la una o más estructuras diana en una célula de muestra, en donde la nanopartícula activa en SERS tiene asociado con la misma un colorante de Fórmula A-Y que puede producir una señal distinguible en Raman:

5

A-Y

en donde:

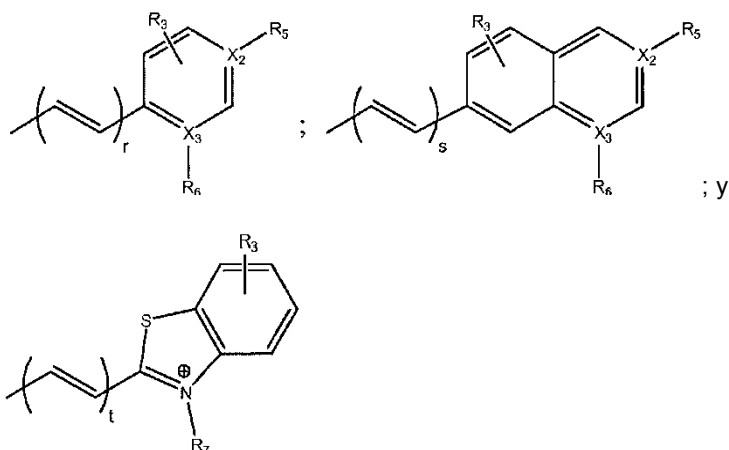
A se selecciona del grupo que consiste en:



10

en donde X₁ es CR₄ o N;

Y se selecciona del grupo que consiste en:



en donde:

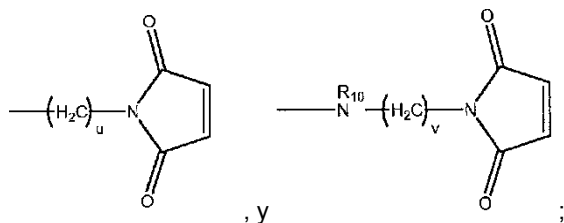
15

r, s, y t son cada uno independientemente un número entero de 1;

cada X₂ y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, S, y N, con la condición de que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆ está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z', en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:

20

-(CH₂)_n-X₄; -NR₈-(CH₂)_p-X₅; -(CH₂)_qX₆C(=O)-R₉,



en donde:

n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

25

cada uno de X₄ y X₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol;

X_6 es O o NR_n ;

en donde:

5 cada $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_8, R_{10}, R_{11}$, y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxícicloalquilo, alcóxicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcóxicarbonilo;

R_7 es Z';

R_9 es $-(CH_2)_m-X_7$ o $-(CH_2)_m-B$, en donde

m es un número entero de 1 a 8;

10 X_7 es halógeno; y

B es una molécula enlazadora que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar; y

(b) detectar una o más señales distinguibles en SERS de la célula de muestra para indicar la presencia de la una o más estructuras diana de la célula de muestra.

15 En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto la una o más nanopartículas activas en SERS con una o más células de referencia. En algunas realizaciones, el método comprende además analizar la una o más señales distinguibles en SERS detectadas a partir de la célula de muestra para construir un perfil de la una o más estructuras diana de la célula de muestra. En algunas realizaciones, el método comprende además analizar la una o más señales distinguibles en SERS detectadas a partir de la célula de referencia para construir un perfil de la una o más estructuras diana de la célula de referencia. En algunas realizaciones, el método comprende además comparar el perfil de la una o más estructuras diana de la célula de muestra con el perfil de la una o más estructuras diana de la célula de referencia. En algunas realizaciones, una diferencia entre el perfil de la célula de muestra comparado con el perfil de la célula de referencia es indicativo de una anomalía en la célula de muestra.

25 En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden usar para teñir microestructuras en el interior de una célula. En dichas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS se pueden marcar con al menos un ligando que se une específicamente a una microestructura o receptor diana conocido. En algunas realizaciones, puede usarse un conjunto de sondas de nanopartículas activas en SERS, en donde cada elemento del conjunto comprende una combinación de un ligando que se une específicamente a una diana o receptor conocido y uno o más colorantes activos en SERS que pueden producir una señal distinguible en SERS tras su unión con la diana.

30 En las condiciones adecuadas, las nanopartículas activas en SERS marcadas se pueden unir específicamente a receptores y otras microestructuras del interior celular. Después, se puede obtener una imagen de la célula "teñida", por ejemplo, usando un microscopio de barrido Raman para determinar la presencia y la ubicación de receptores y microestructuras específicos en las células. Además, las señales SERS procedentes de colorantes activos en Raman individuales asociados con un ligando particular pueden usarse para distinguir entre receptores y microestructuras específicos de la célula, y crear un perfil de los receptores y microestructuras de la célula. El perfil de una célula diana sometida a ensayo según el método descrito en la presente memoria se puede comparar con un perfil obtenido de forma similar a partir de una célula normal del mismo tipo para determinar la presencia de una anomalía en la célula diana. La célula diana puede estar tanto viva como muerta.

40 Como se emplea en esta memoria, el término "microestructura" incluye, pero no se limita a, moléculas de la matriz extracelular, tales como fibronectina y laminina; estructuras intracelulares, tales como filamentos y microtubos de actina; estructuras del núcleo celular, como histonas; y similares. Los ligandos adecuados para su unión a dichas microestructuras se pueden seleccionar entre los ligandos descritos en el presente documento, e incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, tales como anticuerpos dirigidos contra fibronectina y contra actina, y otros ligandos naturales, como una proteína anti-histona.

45 Pueden obtenerse imágenes de células que contienen información espectral Raman mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede acoplar un microscopio a una cámara de tipo carga acoplada (CCD) de forma que se puedan obtener imágenes completas de la muestra. Normalmente, en dichas realizaciones, se puede instalar un dispositivo de filtración por número de onda (o longitud de onda) tal como un monocromador o un filtro de cristal líquido ajustable, entre la muestra y la cámara CCD. El dispositivo de filtración permite que solo un ancho de banda estrecho de la radiación dispersada alcance la cámara CCD en cualquier punto temporal. La cámara CCD puede obtener múltiples imágenes, en donde cada imagen cubre un intervalo espectral concreto de la radiación dispersada. El espectro de cada punto de la imagen se puede ensamblar mediante un programa informático. Como alternativa, la luz de un solo punto de una imagen se puede dispersar a través de un monocromador y adquirirse el espectro completo del punto mediante una matriz de detectores. Se puede hacer un barrido de la muestra de forma que cada punto de la imagen se adquiera por separado. Después, la imagen Raman se ensambla en un programa

55

informático. En otro enfoque, se puede construir un instrumento de barrido en línea que excite la muestra con una línea de radiación. Se obtienen imágenes de la línea espacialmente a lo largo de un eje de la cámara CCD mientras que, simultáneamente, se dispersa espectralmente a lo largo del eje ortogonal. Cada lectura de la cámara adquiere el espectro completo de cada pixel espacial de la línea. Para completar la imagen, se hace un barrido de la línea a través de la muestra. Un ejemplo de un instrumento Raman adecuado para obtención de imágenes se describe en Talley, et al., "Nanoparticle Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy," NATO Advanced Study Institute: Biophotonics, Ottawa, Canadá (6 de enero de 2005).

En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden incorporarse al interior de una célula o tejido mediante un mecanismo de captación pasiva. Otro mecanismo para incorporar las nanopartículas al interior de las células es mediante el uso de un péptido pequeño, que se puede unir a los receptores endocíticos de la superficie celular y extraer las nanopartículas al interior de la célula mediante endocitosis. Véase Tkachenko, A. G., et al., "Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains," *Bioconjugate Chem.*, 15, 482-490 (2004). Además, las nanopartículas activas en SERS pueden introducirse en las células mediante microinyección, transfección, electroporación, y enfoques mediados por endocitosis, incluyendo el uso de péptidos anfifílicos tales como PEP-1, el uso de reactivos catiónicos de tipo lípido como LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, Estados Unidos de América), y el uso de micelas y reactivos de transfección tales como transferrina, manosa, galactosa, y Arg-Gly-Asp (RGD), y otros reactivos tales como el reactivo de tipo dendrímero SUPERFECT™ (Qiagen, Inc., Valencia, California, Estados Unidos de América). Intracelularmente, pueden usarse métodos indirectos para mostrar que las partículas se han unido a las dianas deseadas. Un método adecuado para demostrar la especificidad de las sondas es la inmunofluorescencia, que puede usarse para verificar la ubicación de las nanopartículas activas en SERS. Numerosas sondas comercialmente disponibles son útiles para marcar estructuras celulares (tales como las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico) en células vivas. Cuando se conjuga un anticuerpo que se dirige a la misma estructura, se puede determinar la fracción de nanopartículas que marcan de forma activa su diana. Del mismo modo, también se puede determinar el porcentaje de nanopartículas que se unen de forma no específica. Otro enfoque para comprobar la ubicación de las nanopartículas activas en SERS es utilizar proteínas de fusión fluorescentes, tal como GFP y sus análogos.

En algunas realizaciones, se proporcionan para su uso en diagnóstico médico agentes para la obtención de imágenes que comprenden las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente memoria. Los agentes para la obtención de imágenes descritos en la presente memoria son útiles de forma general en la obtención de imágenes de un paciente, y/o de forma específica, para diagnosticar la presencia de un tejido enfermo en un paciente. Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, mediante la selección del tamaño, forma, y composición del núcleo de la nanopartícula; la identidad del colorante; y la composición y espesor del encapsulante, si se desea, se puede ajustar las frecuencias de excitación y emisión óptimas de las nanopartículas activas en SERS para que estén comprendidas entre aproximadamente 630 nm y aproximadamente 1000 nm, es decir, la región mínima para la absorción y dispersión mediante los tejidos.

Se puede llevar a cabo un proceso de obtención de imágenes administrando un agente de obtención de imágenes que comprende una o más partículas activas en SERS descritas en la presente solicitud a una célula, una muestra de tejido, o a un sujeto, tal como un paciente, y después realizar un barrido de la célula, muestra de tejidos, o sujeto usando cualquier sistema conocidos en la técnica para realizar la obtención de imágenes espectrales, incluyendo, pero sin limitación los microscopios de barrido confocal de punto, sistemas de barrido lineales, y sistemas tomográficos que utilicen coherencia óptica. La presencia de la nanopartícula activa en SERS descrita en la presente memoria en una célula, muestra de tejidos, o sujeto también se puede observar mediante cualquier sistema de obtención de imágenes que detecte una banda individual de determinada longitud de onda, así como cualquier sistema de obtención de imágenes de fluorescencia que incluya una fuente de luz de excitación y una detección de imágenes filtrada. Otros sistemas de obtención de imágenes adecuados para su uso con las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se han descrito en Tuchin, V. Y. *Handbook of optical biomedical diagnostics*, Bellingham, Wash., EE.UU.: SPIE Press, 2002, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Otros métodos de obtención de imágenes, incluyendo métodos de dominio de tiempo, tales como espectroscopia y tomografía de dispersión dinámica de luz, obtención de imágenes por tiempo de vuelo, espectroscopia de dispersión casi elástica de luz, espectroscopia de correlación de protones, espectroscopia Doppler, y espectroscopia de difusión de ondas también son adecuados para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud. Todas estas técnicas permiten la diferenciación entre fotones, y donde se han basado en sus firmas temporales. Puesto que las nanopartículas activas en SERS tienen firmas temporales diferentes a las sustancias fluorescentes y similares, mediante estos métodos se pueden discriminar al compararse con tejidos y otras marcas. Los parámetros útiles de la instrumentación también incluyen una fuente de luz modulada y un detector sensible al tiempo. La modulación puede ser pulsada o continua.

El barrido de la célula, muestra de tejidos, o sujeto proporciona espectros o imágenes de una región interna de la célula, muestra de tejidos, o sujeto y pueden usarse para detectar o diagnosticar la presencia de una dolencia o una patología. Por región de una célula, muestra de tejidos, o sujeto, se entiende la totalidad de la célula, muestra de tejidos, o sujeto, o una zona o parte concreta de la célula, muestra de tejidos, o sujeto. Cuando el sujeto es un paciente, los agentes de obtención de imágenes descritos en la presente memoria pueden usarse para proporcionar imágenes de órganos internos del paciente, incluyendo la vasculatura, corazón, hígado, y bazo, y en la obtención de imágenes

de la región gastrointestinal o de otras cavidades del cuerpo, o de otras formas que serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica, tal como en la caracterización de tejidos, obtención de imágenes de sangre combinada, y similares.

5 La materia objeto descrita en la presente solicitud también proporciona, en algunas realizaciones, un método para diagnosticar una patología anómala *in vivo*, incluyendo el método introducir una pluralidad de nanopartículas activas en SERS dirigidas a una molécula implicada en la patología anómala en un fluido corporal que está en contacto con la patología anómala, en donde las nanopartículas activas en SERS pueden quedar asociadas con las molécula implicadas en la patología anómala, y obtener imágenes de las nanopartículas activas en SERS asociadas *in vivo*. El método descrito en la presente memoria es aplicable de forma general a cualquier órgano accesible a las sondas de
10 nanopartículas activas en SERS, incluyendo el tracto gastrointestinal, corazón, pulmón, hígado, cuello del útero, mama, y similares.

En algunas realizaciones, las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud pueden introducirse en un sujeto mediante una endoscopia, como es el caso de una colonoscopia, o una aguja, o usarse con una punta o manguito desechable, o mediante endocitosis, transfección, microinyección, y similares. En otras realizaciones, las sondas de nanopartículas activas en SERS se pueden introducir directamente introduciendo la propia sonda de obtención de imágenes. En algunas realizaciones, se pueden introducir fibras ópticas individuales, o haces de fibras ópticas, en los organismos vivos para obtención de imágenes. Se han demostrado dichos métodos para la obtención de imágenes de nervios, cerebro, microvasos, células, así como para caracterizar la biodistribución. Las fibras ópticas revestidas con gel son bien conocidas en la bibliografía de sensores. Las nanopartículas activas en SERS descritas en
20 la presente solicitud se pueden unir no covalentemente al gel, en donde las nanopartículas pueden difundirse al tejido tras su introducción en el tejido. Una variedad de otros métodos para inmovilizar las nanopartículas activas en SERS sobre la superficie externa de las fibras de forma que puedan difundirse a las fases líquidas con las que entran en contacto son adecuadas para su uso con la materia objeto descrita en la presente solicitud.

En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un método para marcar un animal con una nanopartícula activa en SERS, comprendiendo el método introducir una nanopartícula activa en SERS en el animal. Las nanopartículas activas en SERS descritas en la presente solicitud se pueden introducir en un animal mediante cualquier método adecuado, incluyendo, pero no se limitan a, cualquier método de implante subcutáneo o bien por vía intravenosa. La nanopartícula activa en SERS se puede detectar usando instrumentación adecuada. En algunas realizaciones, la materia objeto descrita en la presente solicitud proporciona un sistema de identificación para animales, incluyendo ganado y mascotas domésticas, en donde la nanopartícula activa en SERS se implanta bajo la piel (o escondido) del animal para permitir su identificación.

III. Definiciones químicas

Aunque se cree que los siguientes términos son bien entendidos por una persona experta en la técnica, se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la explicación de la materia objeto descrita en la presente memoria. Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona experta en la técnica a la cual pertenece la materia objeto descrita en la presente memoria.

En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula o nombre químico dado deberá abarcar todos los estereoisómeros e isómeros ópticos, así como las mezclas racémicas en el caso que existan dichos isómeros y mezclas.

Cuando se utiliza el término "independientemente seleccionado", los sustituyentes que se citan (por ejemplo, los grupos R, tales como los grupos R₁, R₂, y similares, o grupos X₁ y X₂), pueden ser idénticos o diferentes. Por ejemplo, ambos R₁ y R₂ pueden ser alquilos sustituidos, o R₁ puede ser hidrógeno y R₂ puede ser un alquilo sustituido, y similares.

45 Un grupo "R" o "X" citado tendrá por lo general la estructura que se reconoce en la técnica como correspondiente al grupo que tiene dicho nombre, salvo que se especifique de otra forma en el presente documento. Para los fines de ilustración, algunos grupos representativos "R" y "X" tal como se ha definido anteriormente se definen a continuación. Estas definiciones están previstas para complementar e ilustrar, y no impedir, las definiciones que serán evidentes para una persona experta en la técnica tras la revisión de la presente divulgación.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a cadenas de hidrocarburo C₁₋₂₀ inclusive, lineales (es decir, "cadena lineal"), ramificadas, o cíclicas, saturadas o al menos parcialmente y en algunos casos completamente insaturadas (es decir, alqueno y alquino), incluyendo por ejemplo, los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo, y alenilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C₁₋₈, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o

20 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena lineal. En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena ramificada.

Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes del grupo alquilo, que pueden ser iguales o diferentes. El término "sustituyente del grupo alquilo" incluye, pero no se limita a alquilo, alquilo sustituido, halo, arilamino, acilo, hidroxilo, ariloxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquilo, aralquiltio, carboxilo, alcoxycarbonilo, oxo, y cicloalquilo. A lo largo de la cadena de alquilo se puede insertar uno o más átomos de oxígeno, azufre o átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos, en donde el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también denominado en el presente documento como "alquilaminoalquilo"), o arilo.

Por tanto, como se emplea en esta memoria, el término "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, como se define en la presente memoria, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se han sustituido por otro átomo o grupo funcional, incluyendo por ejemplo, los grupos alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, y mercapto.

"Cíclico" y "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente parcialmente insaturado. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido también con un sustituyente del grupo alquilo tal como se define en la presente memoria, oxo, y/o alquilenilo. A lo largo de la cadena de alquilo cíclico se puede insertar uno o más átomos de oxígeno, azufre o átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos, en donde el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, proporcionando de esta forma un grupo heterocíclico. Los anillos de cicloalquilo monocíclicos representativos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, y cicloheptilo. Los anillos de cicloalquilo multicíclicos incluyen adamantilo, octahidronaftilo, decalina, alcanfor, canfano, y noradamantilo.

El término "cicloalquilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cicloalquilo tal como se define anteriormente en el presente documento, que está unido al resto molecular precursor a través de un grupo alquilo, también tal como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen cicloalquilalquilo y ciclopropiletilo.

Los términos "cicloheteroalquilo" o "heterocicloalquilo" se refieren a un sistema de anillo no aromático, tal como un sistema de anillo cicloalquilo de 3 a 7 miembros sustituido o no sustituido, incluyendo uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes, y se han seleccionado del grupo que consiste en N, O, y S, y opcionalmente pueden incluir uno o más dobles enlaces. El anillo heterocicloalquilo puede estar opcionalmente condensado o unido de otra forma a otros anillos de heterocicloalquilo y/o anillos de hidrocarburo no aromáticos. Los sistemas representativos de anillos de cicloheteroalquilo incluyen, pero no se limitan a pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperidilo, piperazinilo, indolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiadiazinanilo, tetrahidrofurano, y similares.

El término "alqueniilo" como se emplea en esta memoria se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado de un número designado de átomos de carbono que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de alqueniilo incluyen vinilo, alilo, 2-metil-3-hepteno, y similares.

El término "cicloalqueniilo" como se emplea en esta memoria se refiere a un hidrocarburo cíclico que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos cicloalqueniilo incluyen ciclopropeniilo, ciclobuteniilo, ciclopenteniilo, ciclopentadieno, ciclohexeniilo, 1,3-ciclohexadieno, ciclohepteniilo, cicloheptatrieniilo, y cicloocteniilo.

El término "alquinilo" como se emplea en esta memoria se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado de un número designado de átomos de carbono que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de "alquinilo" incluyen propargilo, propino, y 3-hexino.

"Alquilenilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático bivalente lineal o ramificado que tiene de 1 aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 átomos de carbono. El grupo alquilenilo puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquilenilo también puede estar opcionalmente insaturado y/o estar sustituido con uno o más "sustituyentes del grupo alquilo". A lo largo de la cadena de alquilenilo se puede insertar uno o más átomos de oxígeno, azufre o átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos (también denominados en el presente documento como "alquilaminoalquilo"), en donde el sustituyente nitrógeno es alquilo como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilenilo ilustrativos incluyen metileno (-CH₂-); etileno (-CH₂-CH₂-); propileno (-CH₂)₃-; ciclohexileno (-C₆H₁₀-); -CH=CH-CH=CH-; -CH=CH-CH₂-; -(CH₂)_q-N(R)- (CH₂)_r-, en donde cada uno de q y r es independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y R es hidrógeno o alquilo inferior; metilendioxilo (-O-CH₂-O-); y etilendioxilo (-O-(CH₂)₂-O-). Un grupo alquilenilo puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono y puede tener adicionalmente 6-20 átomos de carbono.

El término "arilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un sustituyente aromático que puede ser un anillo aromático sencillo, o bien múltiples anillos aromáticos que están condensados entre sí, unidos covalentemente, o unidos a un grupo común, tales como, pero no se limitan a, un resto metileno o etileno. El grupo enlazador común también puede ser un carbonilo, como en benzofenona, u oxígeno, como en difenil éter, o nitrógeno, como en

5 difenilamina. El término "arilo" abarca específicamente compuestos heterocíclicos aromáticos. El anillo o anillos aromáticos pueden comprender fenilo, naftilo, bifenilo, difenil éter, difenilamina y benzofenona, entre otros. En realizaciones particulares, el término "arilo" significa un hidrocarburo cíclico aromático que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono, y que incluye hidrocarburos de 5 y 6 miembros y anillos heterocíclicos aromáticos.

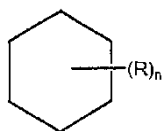
10 El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes del grupo arilo, que pueden ser iguales o diferentes, en donde "sustituyente del grupo arilo" incluye alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralquioxilo, carboxilo, acilo, halo, nitro, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcoxycarbonilo, aciloxilo, acilamino, aroilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, ariltio, alquiltio, alquileo, y -NR'R", en donde cada uno de R' y R" puede ser independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, y aralquilo.

15 Por tanto, como se emplea en esta memoria, el término "arilo sustituido" incluye grupos arilo, como se define en la presente memoria, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo arilo se han sustituido por otro átomo o grupo funcional, incluyendo por ejemplo, los grupos alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, y mercapto.

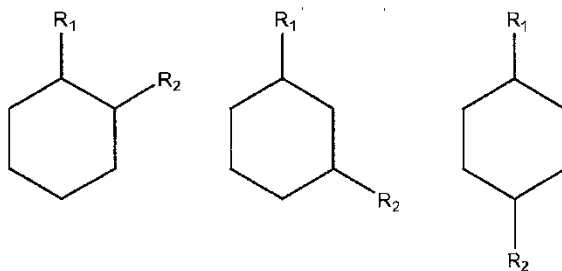
Los ejemplos específicos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentadienilo, fenilo, furano, tiofeno, pirrol, pirano, piridinina, imidazol, bencimidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina, triazina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, indol, carbazol, y similares.

20 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático, tales como, pero sin limitarse a sistemas de anillo de 5 o 6 miembros, incluyendo uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes, y se han seleccionado del grupo que consiste en N, O, y S. El anillo de heteroarilo puede estar condensado o unido de otra forma a uno o más anillos de heteroarilo, anillos de hidrocarburo aromático y no aromático, o anillos de heterocicloalquilo. Los sistemas de heteroarilo representativos incluyen, pero sin limitación, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, pirazolilo, azolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, imidazolilo, furanilo, tienilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolinilo, indolilo, benzotienilo, benzotiazolilo, enzofuranilo, bencimidazolilo, bencisoxazolilo, benzopirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, y similares.

Una estructura representada de forma general por la fórmula, en donde la estructura del anillo puede ser aromática o no aromática:



30 como se emplea en esta memoria se refiere a una estructura de anillo, por ejemplo, pero no se limita a 3 átomos de carbono, a 4 átomos de carbono, a 5 átomos de carbono, a 6 átomos de carbono, y similares, compuestos cíclicos alifáticos y/o aromáticos, incluyendo una estructura de anillo saturado, una estructura de anillo parcialmente saturado, y una estructura de anillo insaturado como se define en la presente memoria, que comprende un grupo R sustituyente, en donde el grupo R puede estar presente o ausente, y cuando está presente, cada uno de los uno o más grupos R puede estar sustituido en uno o más átomos de carbono disponibles de la estructura de anillo. La presencia o ausencia del grupo R y el número de grupos R viene determinado por el valor del número entero n. Cada grupo R, si hay más de uno, está sustituido en un átomo de carbono disponible en la estructura de anillo en lugar de en otro grupo R. Por ejemplo, la estructura anterior donde n es de 0 a 2 comprendería grupos de compuestos que incluyen, pero sin limitación:



40 y similares.

Una línea discontinua que representa un enlace en una estructura de anillo cíclico indica que el enlace puede estar ausente o presente en el anillo. Es decir, una línea discontinua que representa un enlace en una estructura de anillo cíclico indica que la estructura de anillo se selecciona del grupo que consiste en una estructura de anillo saturado, una

estructura de anillo parcialmente saturado, y una estructura de anillo parcialmente insaturado.

Cuando un átomo citado de un anillo aromático o un anillo aromático heterocíclico se define como "ausente", el átomo citado está sustituido por un enlace directo.

5 Como se emplea en esta memoria, el término "acilo" se refiere a un grupo ácido orgánico en donde el -OH del grupo carboxilo se ha sustituido por otro sustituyente (es decir, representado por RCO-, en donde R es un grupo alquilo o arilo como se define en la presente memoria. De este modo, el término "acilo" incluye específicamente grupos arilacilo, tal como acetilfurano y el grupo fenacilo. Los ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo y benzoilo.

10 "Alcoxilo" se refiere a un grupo alquil-O- en donde alquilo es como se ha definido anteriormente. El término "alcoxilo" como se emplea en la presente memoria se puede referir a cadenas C₁₋₂₀ inclusive de oxohidrocarburo, lineal, ramificado, o cíclico, saturado o insaturado, incluyendo, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, t-butoxilo, y pentoxilo.

El término "alcoxialquilo" como se emplea en la presente memoria se refiere a un éter alquil-O-alquilo, por ejemplo, un grupo metoxietilo o un grupo etoximetilo.

15 "Ariloxilo" se refiere a un grupo aril-O- en donde el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente, incluyendo un arilo sustituido. El término "ariloxilo" como se emplea en la presente memoria puede referirse a feniloxilo o hexiloxilo, y feniloxilo o hexiloxilo sustituido con alquilo, alquilo sustituido, halo, o alcoxilo.

El término "alquil-tio-alquilo" como se emplea en la presente memoria se refiere a un tioéter alquil-S-alquilo, por ejemplo, un grupo metiltioetil o un grupo metiltioetilo.

20 "Aralquilo" se refiere a un grupo aril-alquilo en donde arilo y alquilo son como se han descrito anteriormente, e incluyen arilo sustituido y alquilo sustituido. Los grupos aralquilo representativos incluyen bencilo, feniletilo, y naftilmetilo.

"Aralquioxilo" se refiere a un grupo aralquil-O- en donde el grupo aralquilo es como se ha descrito anteriormente. Un grupo aralquioxilo ilustrativo es benciloxilo.

25 "Alcoxicarbonilo" se refiere a un grupo alquil-O-CO-. Los grupos alcoxicarbonilo representativos incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, butiloxicarbonilo, y t-butiloxicarbonilo. "Ariloxicarbonilo" se refiere a un grupo aril-O-CO-. Los grupos ariloxicarbonilo ilustrativos incluyen fenoxicarbonilo y naftoxicarbonilo. "Aralcoxicarbonilo" se refiere a un grupo aralquil-O-CO-. Un grupo aralcoxicarbonilo ilustrativo es benciloxicarbonilo.

30 "Carbamoilo" se refiere a un grupo H₂N-CO-. "Alquilcarbamoilo" se refiere a un grupo R'RN-CO- en donde uno de R y R' es hidrógeno y el otro de R y R' es alquilo y/o alquilo sustituido como se ha descrito anteriormente. "Dialquilcarbamoilo" se refiere a un grupo R'RN-CO- en donde cada uno de R y R' es independientemente alquilo y/o alquilo sustituido como se ha descrito anteriormente.

"Aciloxilo" se refiere a un grupo acil-O- en donde acilo es como se ha descrito anteriormente.

35 El término "amino" se refiere al grupo -NH₂ y también se refiere a un grupo que contiene nitrógeno que, como es sabido en la técnica, se han derivado de amoniaco por sustitución de uno o más radicales hidrógeno por radicales orgánicos. Por ejemplo, los términos "acilamino" y "alquilamino" se refieren a radicales orgánicos N-sustituidos específicos con grupos sustituyentes acilo y alquilo respectivamente.

El término "alquilamino" se refiere a un grupo -NHR en donde R es un grupo alquilo y/o un grupo alquilo sustituido como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilamino ilustrativos incluyen metilamino, etilamino, y similares.

40 "Dialquilamino" se refiere a un grupo -NRR' en donde cada uno de R y R' es independientemente un grupo alquilo y/o un grupo alquilo sustituido como se ha descrito anteriormente. Los grupos dialquilamino ilustrativos incluyen etilmetilamino, dimetilamino, y dietilamino.

"Acilamino" se refiere a un grupo acil-NH- en donde acilo es como se ha descrito anteriormente. "Aroilamino" se refiere a un grupo aroil-NH- en donde aroilo es como se ha descrito anteriormente.

El término "carbonilo" se refiere al grupo -(C=O)-.

El término "carboxilo" se refiere al grupo -COOH.

45 Los términos "halo", "haluro", o "halógeno" como se emplean en la presente memoria se refieren a grupos flúor, cloro, bromo, y yodo.

El término "hidroxilo" se refiere al grupo -OH.

El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo -OH.

El término "mercapto" se refiere al grupo -SH.

El término "oxo" se refiere a un compuesto anteriormente descrito en la presente memoria en donde un átomo de carbono se ha sustituido por un átomo de oxígeno.

El término "nitro" se refiere al grupo -NO₂.

5 El término "tio" se refiere a un compuesto anteriormente descrito en la presente memoria en donde un átomo de carbono u oxígeno se ha sustituido por un átomo de oxígeno. Por ejemplo, un grupo "tio" se refiere al grupo -SH.

El término "sulfato" se refiere al grupo -SO₄.

Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar una guía al experto en la técnica para llevar a la práctica las realizaciones representativas de la materia objeto descrita en la presente solicitud. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de conocimientos en la técnica, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos están previstos para ser solamente ilustrativos, y que numerosos cambios, modificaciones, y alteraciones se pueden aplicar sin separarse del alcance de la materia objeto descrita en la presente solicitud. Los siguientes Ejemplos se proporcionan a fines de ilustración y no como limitación.

Ejemplo 1

15 Preparación de nanopartículas que tienen colorantes de infrarrojo cercano unidos a las mismas

20 Se adquirieron nanopartículas esféricas de oro con un diámetro de 60 nm de Ted Pella, Inc. (Redding, California, Estados Unidos de América). El tamaño de la nanopartícula, según informó el fabricante, se confirmó mediante microscopía de transmisión electrónica y dispersión de luz. Para unir especies activas en Raman, por ejemplo, moléculas no fluorescentes y los colorantes del NIR descritos en la presente memoria, a las nanopartículas de oro, las sustancias químicas se mezclaron con las nanopartículas de oro de forma que la concentración de la molécula indicadora Raman fuera de 10 µM en la mezcla final. Las nanopartículas de oro se concentraron cinco veces a partir de su solución inicial para proporcionar una densidad óptica final igual a cinco (5) at 520 nm. La reacción se dejó continuar durante la noche en un agitador.

Ejemplo 2

25 Espectros SERS de los colorantes del infrarrojo cercano

30 El instrumento utilizado para el ensayo de la intensidad SERS de los colorantes activos en SERS descritos en la presente solicitud era un espectrómetro Centice (Morrisville, Carolina del Norte, Estados Unidos de América) con excitación mediante láser a 660 nm. Los resultados de los experimentos para una molécula activa en Raman no fluorescente habitualmente usada, por ejemplo, trans-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE) y un colorante NIR descrito en la presente solicitud, por ejemplo, colorante de cumarina picolinio (CoPic) aparece en la Figura 1. BPE muestra dos picos principales: un pico a aproximadamente 1200 cm⁻¹ y un doblete entre 1600 y 1650 cm⁻¹. De manera similar, CoPic muestra dos picos principales a aproximadamente 1150 y 1550 cm⁻¹. Aunque la intensidad máxima del mayor pico prominente del espectro de BPE es de aproximadamente 47.000, el máximo de CoPic es aproximadamente 160.000. En este ejemplo, el pico máximo de CoPic tiene una intensidad aproximadamente tres veces mayor que el de BPE.

35 Los datos SERS obtenidos a partir de numerosas moléculas y colorantes Raman no fluorescentes comercialmente disponibles se presentan en la Figura 2 y la Tabla 1. En cada caso, se notifica la intensidad del pico Raman más prominente respecto al fondo. Todos los colorantes comerciales, salvo MGITC, no se comportan tan bien como BPE. Se muestra en la Figura 3 la intensidad de los picos Raman mostrados por los colorantes NIR descritos en la presente solicitud determinados en similares condiciones experimentales. Las estructuras de los colorantes aparecen en la Figura 4. Algunos colorantes no muestran ningún pico Raman, mientras que otros colorantes muestran picos intensos. La Figura 3 también compara la intensidad Raman obtenida para algunas moléculas indicadoras Raman comercialmente disponibles y los colorantes NIR descritos en la presente solicitud. En algunas realizaciones, los colorantes descritos en la presente solicitud son de dos a cinco veces más intensos que las moléculas indicadoras conocidas en la técnica para una excitación láser a 660 nm.

Tabla 1. Intensidad Raman observada para el pico más intenso de moléculas y colorantes Raman comercialmente disponibles.					
Nº	Abreviatura	Nombre	Fuente	Unidades arbitrarias de intensidad (u.a.)	Pico principal (cm ⁻¹)
1	MBA	ácido 4-mercaptobenzoico	Sigma†	100	1590
2	ATP	4-aminotiofenol	Sigma†	5500	1528
3	BPE	Trans-1,2-bis(4-piridil)etileno	Sigma†	47000	1608

Nº	Abreviatura	Nombre	Proveedor	Intensidad (u.a.)	Pico principal (cm ⁴)
4	Cy-5	Cianina-5	Amersham‡	100	----
5	Rh6G	Rodamina 6G	Sigma†	1500	1457
6	FIAm	Fluorescamina	Sigma†	1500	1599
7	FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Sigma†	2000	1599
8	RB	Rodamina B	Sigma†	4000	1515
9	RhIOI	Rodamina 101	Sigma†	4500	-
10	CV	Violeta de cresilo	Sigma†	16000	1638
11	TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina	Sigma†	27000	1651
12	RBITC	Isotiocianato de rodamina B	Sigma†	33000	1515
13	XRITC	Isotiocianato de X-rodamina-5-(y - 6)	Sondas moleculares®††	36000	1648
14	MGITC	Isotiocianato de verde de malaquita	Sondas moleculares®††	80000	1623

† Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri; ‡Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey; †† Invitrogen Corporation, Carlsbad, California.

Nº	Abreviatura	Nombre	Intensidad (u.a.)	Pico principal (cm ⁴)
15	ERB	Eno Red B	100	-
18	AZCO	Yodoacetil azacumarina	85000	1650
19	CoBzt	Cumarina	119000	1560
20	CoPic	Cumarina picolinio	162000	1573
21	BDCY	Benzodioxazol cianina	235000	1555

Ejemplo 3

Reducción de la unión no específica en ensayos SERS en medio líquido con captura magnética

5 Se unieron oligonucleótidos de ADN a la superficie de nanopartículas activas en SERS (partículas de oro revestidas con moléculas indicadoras activas en SERS, por ejemplo, varios colorantes de biperidilo, y se encapsularon en un revestimiento de vidrio tiofuncionalizado) a través de una molécula enlazadora de polietilenglicol (PEG). Un ejemplo representativo de una realización de la materia objeto descrita en la presente solicitud se ilustra en la Figura 5, que
10 representa gráficamente la inmovilización de ADN sobre la superficie de nanopartículas activas en SERS y partículas de captura magnética mediante un PEG enlazador heterobifuncional de 5 nm.

Los oligonucleótidos terminados en amina se hicieron reaccionar con el resto éster de N-hidroxi-succinimida (NHS) de una molécula de polietilenglicol heterobifuncional que comprende un éster NHS separado de un grupo maleimida reactivo con tiol mediante doce subunidades de etilenglicol. La inmovilización del ADN PEGilado sobre las
15 nanopartículas activas en SERS se realizó mediante reacción de los grupos maleimida del enlazador PEG con los grupos tiol presentes sobre la superficie de la nanopartícula activa en SERS.

Los oligonucleótidos de ADN conjugados con una molécula de PEG heterobifuncional se acoplaron con partículas magnéticas a través de un acoplamiento tradicional con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)- carbodiimida (EDC) por

tratamiento de las partículas magnéticas carboxiladas con una molécula terminada en amina que contiene un disulfuro interno. El disulfuro se escindió después con ditioneitol, exponiendo un grupo tiol reactivo que reacciona con el resto maleimida del conjugado oligonucleótido-PEG.

5 Para medir la unión no específica entre la nanopartícula activa en SERS revestida de oligonucleótido y la partícula magnética revestida de oligonucleótido, 10 μ l de una solución de 1 mg/ml de oligonucleótido-partículas magnéticas revestidas se mezclaron con 100 μ l de una solución 10 pM de oligonucleótidos-partículas SERS revestidas y 100 μ l de tampón en un tubo pequeño. El tubo se invirtió durante 30 a 120 minutos, seguido por la concentración de las partículas magnéticas con un imán para formar un aglomerado. A continuación, el aglomerado fue interrogado con un láser para determinar el nivel de señal SERS, que es proporcional al número de moléculas indicadoras activas en SERS asociadas con las partículas magnéticas del aglomerado.

10 La Figura 6A muestra un espectro de un tubo de muestra en blanco y otro con nanopartículas activas en SERS y partículas magnéticas mezcladas entre sí, en donde se ha unido directamente un ADN oligonucleótido (sin enlazador PEG) a la nanopartícula activa en SERS y la partícula magnética mediante una estreptavidina biotina-estreptavidina. Debido a la falta de ADN diana (analito) en la solución, la señal observada en SERS se debe a la asociación no específica de la nanopartícula activa en SERS con las partículas magnéticas. Las Figuras 6B y 6C muestran resultados de un ensayo similar realizado con nanopartículas activas en SERS revestidas con oligonucleótido y partículas magnéticas revestidas con oligonucleótido, en donde los oligonucleótidos se han unido mediante un enlazador de PEG y se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las Figuras 6A y 6B se representaron gráficamente sobre la misma escala. La Figura 6C presenta los mismos datos que la Figura 6B, pero con un intervalo de señal más estrecho. La Figura 6C destaca la similitud entre la señal procedente del tubo solo y la señal del ensayo, lo que demuestra que la unión no específica entre los dos conjuntos de partículas se ha eliminado casi por completo.

15 Aunque la materia objeto anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar algunos cambios y modificaciones comprendidos en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25

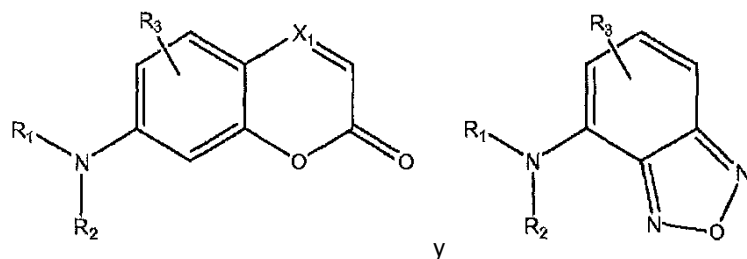
REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende una molécula indicadora activa en SERS de la fórmula:

A-Y

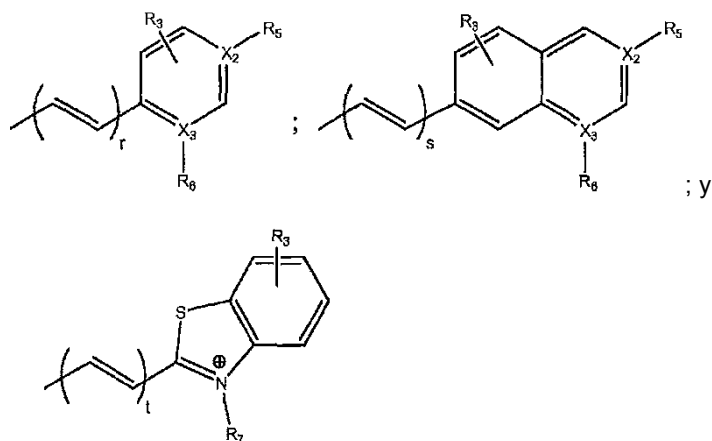
en donde:

5 A se selecciona del grupo que consiste en:



en donde X₁ es CR₄ o N;

Y se selecciona del grupo que consiste en:



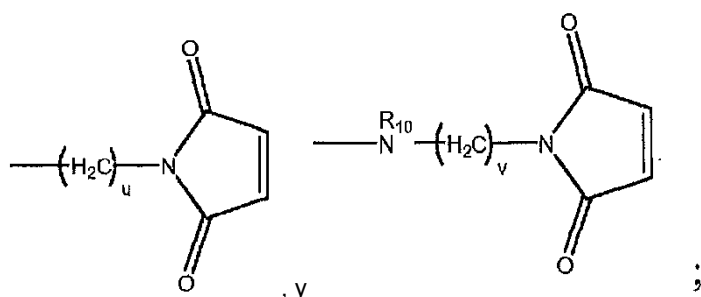
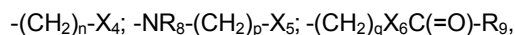
10

en donde:

r, s, y t son cada uno independientemente un número entero de 1;

15

cada X₂ y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, S, y N, con la condición de que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆ está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z', en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:



20

en donde:

n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

cada uno de X₄ y X₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol;

X₆ es O o NR₁₁;

en donde;

- 5 cada R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀, R₁₁, y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxicicloalquilo, alcoxicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcoxicarbonilo;

R₇ es Z';

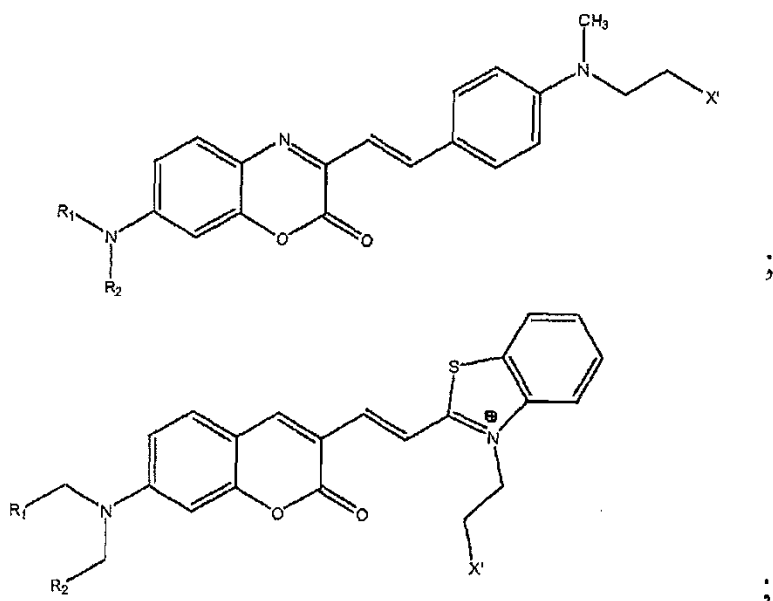
- 10 R₉ es -(CH₂)_m-X₇ o -(CH₂)_m-B, en donde

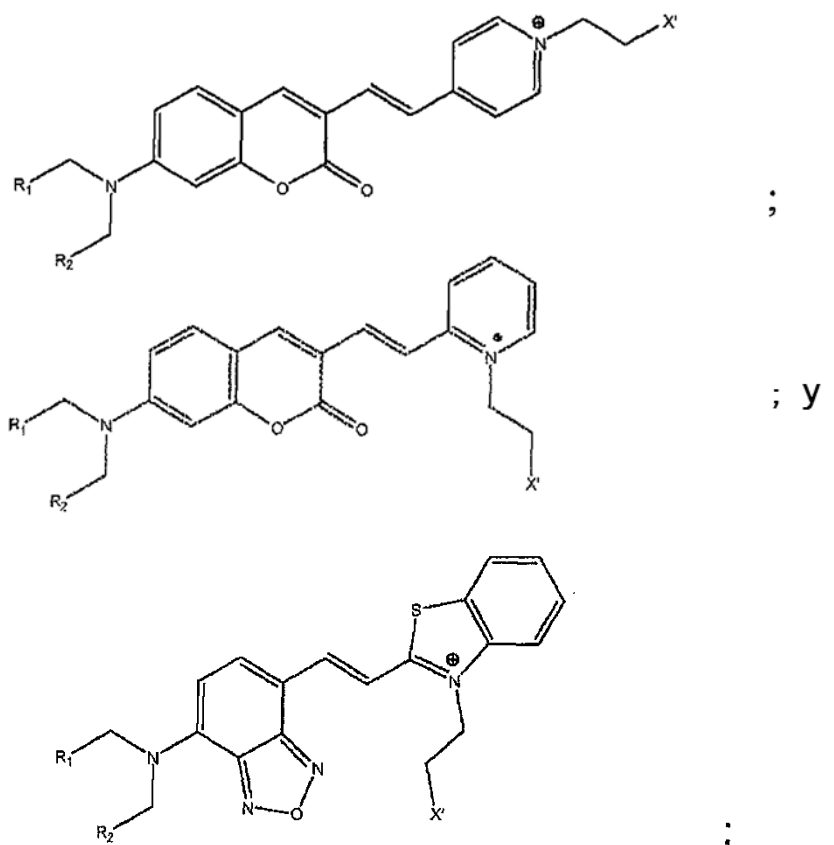
m es un número entero de 1 a 8;

X₇ es halógeno; y

B es una molécula enlazadora que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar.

- 15 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y se selecciona del grupo que consiste en:





en donde:

- 5 X' se selecciona del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tiol; y cada R₁ y R₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxi), hidroxialquilo, hidroxicicloalquilo, alcocicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcocarbonilo.
- 10 3. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y se adsorbe en la superficie externa de la nanopartícula, o en donde la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y se une covalentemente a la superficie externa de la nanopartícula.
- 15 4. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en Au, Ag, Cu, Na, Al, y Cr, o en donde la nanopartícula comprende una aleación de al menos dos metales seleccionados entre el grupo que consiste de Au, Ag, Cu, Na, Al, y Cr.
- 20 5. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula tiene un diámetro inferior a 200 nm, o en donde la nanopartícula tiene un diámetro entre 40 nm y 100 nm.
6. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y forma una capa sobre una superficie externa de la nanopartícula, en donde la capa cubre al menos parcialmente la superficie externa de la nanopartícula y está definida por una superficie interna y una superficie externa, y en donde la capa de la molécula activa en SERS se selecciona del grupo que consiste en una submonocapa, una monocapa, y una multicapa.
7. La nanopartícula de la reivindicación 6, que comprende además un encapsulante, en donde el encapsulante se coloca en al menos una de la superficie externa de la nanopartícula y la superficie externa de la capa de la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y, y en donde el encapsulante comprende uno o más materiales seleccionados entre el grupo que consiste de un vidrio, un polímero, un metal, un óxido metálico, y un sulfuro metálico.
- 25 8. La nanopartícula de la reivindicación 7, en donde el vidrio comprende SiO_x.
9. La nanopartícula de la reivindicación 7 en donde el encapsulante tiene un espesor de 1 nm a 40 nm.
10. Un método para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica, comprendiendo el método:

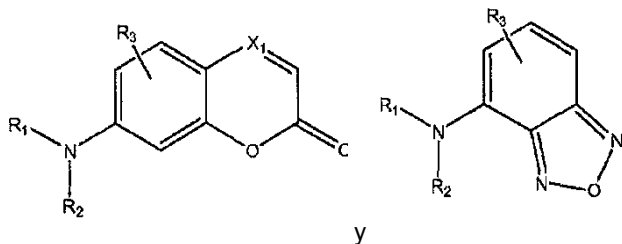
- (a) proporcionar una muestra biológica que se sospecha que contiene uno o más analitos;
- (b) poner en contacto la muestra biológica con un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociado con la misma al menos una molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el uno o más analitos y al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula:

5

A-Y

en donde:

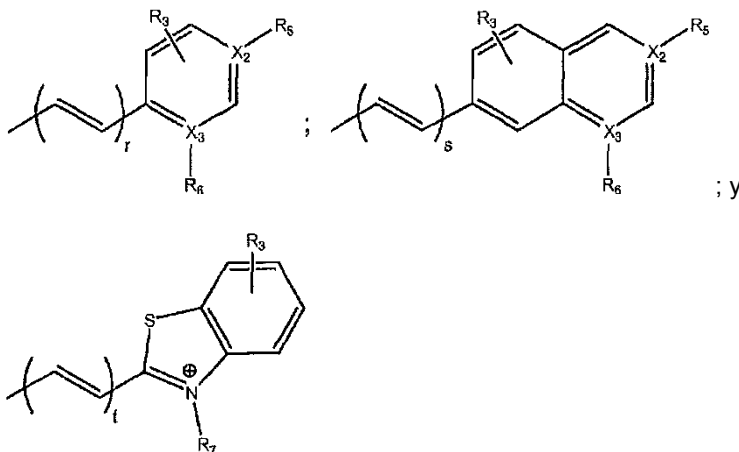
A se selecciona del grupo que consiste en:



en donde X₁ es CR₄ o N;

10

Y se selecciona del grupo que consiste en:



en donde:

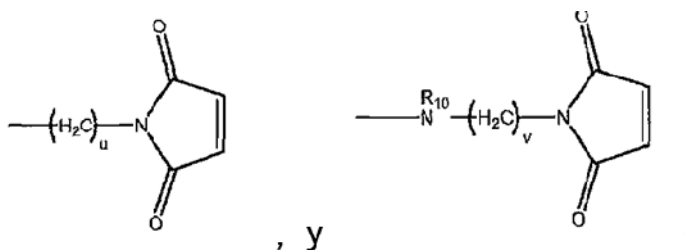
r, s, y t son cada uno independientemente un número entero de 1;

15

cada X₂ y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, S, y N, con la condición de que (i) cuando X₂ es C o S, R₅ es Z, o cuando X₃ es C o S, R₆ es Z, tal como se define Z más adelante en el presente documento; (ii) si ambos X₂ y X₃ son N al mismo tiempo, al menos uno de R₅ y R₆ está ausente; y (iii) cuando X₂ es N, R₅ cuando está presente es Z', o cuando X₃ es N, R₆ cuando está presente es Z', en donde Z' se selecciona del grupo que consiste en:

20

-(CH₂)_n-X₄; -NR₈-(CH₂)_p-X₅; -(CH₂)_qX₆C(=O)-R₉,



en donde;

n, p, q, u, y v son cada uno independientemente un número entero de 1 a 8;

cada uno de X_4 y X_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, amino, y tior;

X_6 es O o NR_{11} ;

en donde;

5 cada R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_8 , R_{10} , R_{11} , y Z se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, hidroxialquilo, hidroxicicloalquilo, alcoxicicloalquilo, aminoalquilo, aciloxilo, alquilaminoalquilo, y alcoxicarbonilo;

10 R_7 es Z' ;

R_9 es $-(CH_2)_m-X_7$ o $-(CH_2)_m-B$, en donde m es un número entero de 1 a 8;

X_7 es halógeno; y

B es una molécula enlazadora que tiene una afinidad de unión por un ligando o analito a detectar;

15 (c) iluminar la muestra biológica con radiación incidente a una longitud de onda para inducir a la molécula indicadora activa en SERS a producir una señal SERS; y

(d) medir la señal SERS para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos de la muestra biológica, con la condición de que se excluya un método diagnóstico realizado sobre el organismo humano o animal.

20 11. El método de la reivindicación 10, en donde el uno o más analitos se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico, un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, o en donde el analito comprende una estructura diana de una célula.

12. El método de la reivindicación 10, en donde el reactivo comprende una nanopartícula que tiene asociado con la misma más de una molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y, en donde cada una o más moléculas indicadoras activas en SERS presenta una señal SERS mensurable y distinta.

25 13. El método de la reivindicación 10, en donde la molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el uno o más analitos está directamente unida a la superficie externa de la nanopartícula, o en donde la molécula enlazadora específica está covalentemente unida a la nanopartícula a través de un enlazador.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el enlazador comprende polietilenglicol (PEG).

30 15. El método de la reivindicación 14, en donde el polietilenglicol comprende al menos 12 subunidades de etilenglicol, o en donde el polietilenglicol comprende una molécula de polietilenglicol (PEG) heterobifuncional, en donde la molécula de PEG heterobifuncional comprende un primer grupo funcional en un primer extremo de la molécula de PEG heterobifuncional y un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la molécula de PEG heterobifuncional.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el primer grupo funcional comprende un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y en donde el segundo grupo funcional comprende una maleimida.

35 17. El método de la reivindicación 16, en donde la molécula de PEG heterobifuncional está unida covalentemente a la nanopartícula activa en SERS a través de un grupo tior de la nanopartícula activa en SERS y el grupo maleimida de la molécula de PEG heterobifuncional.

40 18. El método de la reivindicación 17, en donde la molécula enlazadora específica comprende un polinucleótido, y en donde el polinucleótido está unido covalentemente a la molécula de PEG heterobifuncional a través de un grupo amina en el extremo 5' o 3' del polinucleótido y al éster de NHS de la molécula de PEG heterobifuncional.

19. El método de la reivindicación 10, en donde la molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el uno o más analitos está conjugada con la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y.

45 20. El método de la reivindicación 10, en donde la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y forma una capa sobre una superficie externa de la nanopartícula, en donde la capa cubre al menos parcialmente la superficie externa de la nanopartícula y está definida por una superficie interna y una superficie externa, y en donde la nanopartícula comprende además un encapsulante, en donde el encapsulante se coloca en al menos una de la superficie externa de la nanopartícula y la superficie externa de la capa de la molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y.

21. El método de la reivindicación 10, que comprende además poner en contacto una pluralidad de partículas de captura magnética con la muestra biológica, en donde cada partícula de captura magnética tiene unida sobre la misma

- 5 al menos una molécula enlazadora que tiene afinidad por el uno o más analitos, y en donde la partícula de captura magnética forma un complejo con la nanopartícula activa en SERS que tiene asociada sobre sí misma una molécula indicadora activa en SERS de fórmula A - Y, y que comprende además exponer la muestra biológica a un campo magnético para hacer que el complejo entre la partícula de captura magnética y la nanopartícula activa en SERS migre hacia una zona localizada del dispositivo de recogida de muestra.
22. El método de la reivindicación 21, que comprende además iluminar la zona localizada del dispositivo de recogida de muestra con radiación incidente para detectar la presencia o la cantidad de uno o más analitos asociados con la partícula de captura magnética y la nanopartícula activa en SERS.
- 10 23. El método de la reivindicación 10, en donde el uno o más analitos se inmovilizan sobre un soporte sólido, en donde la una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociado con la misma al menos una molécula enlazadora específica que tiene afinidad por el uno o más analitos y al menos una molécula indicadora activa en SERS de Fórmula A- Y se han inmovilizado en un soporte sólido.
- 15 24. Un kit que comprende un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS) que tiene asociada sobre la misma al menos una molécula indicadora activa en SERS tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9.

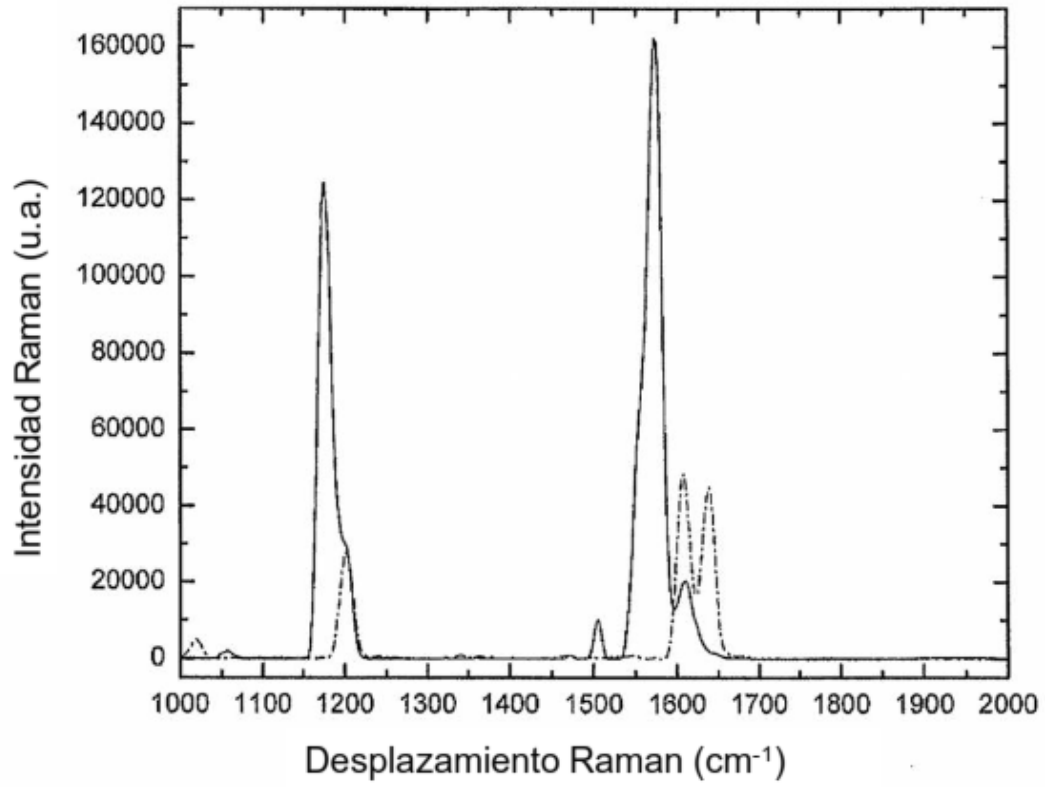
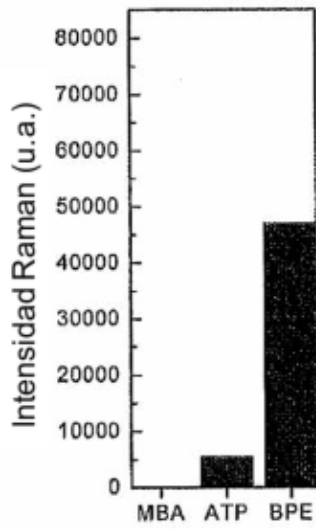
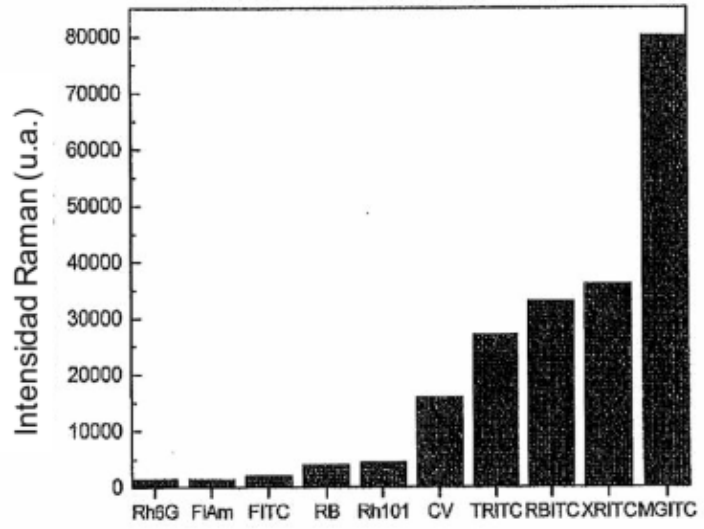


Fig. 1



Moléculas Raman
no fluorescentes

Fig. 2A



Colorantes comerciales

Fig. 2B

Fig. 2

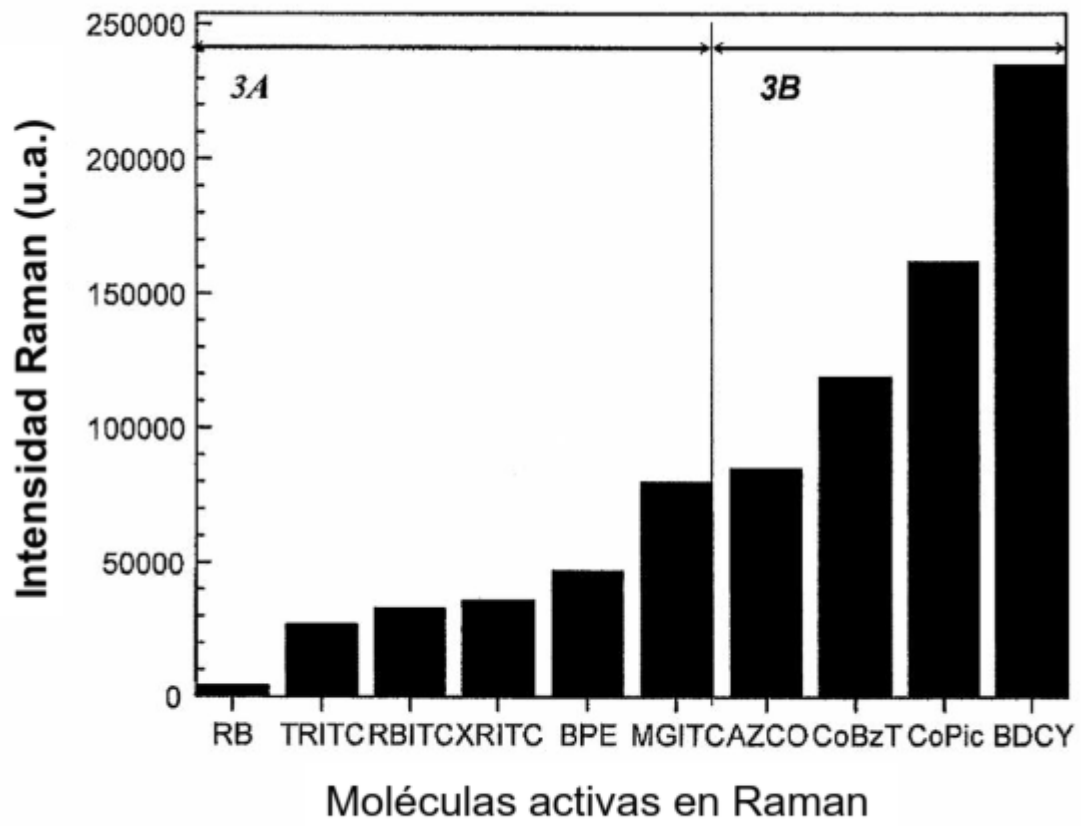


Fig. 3

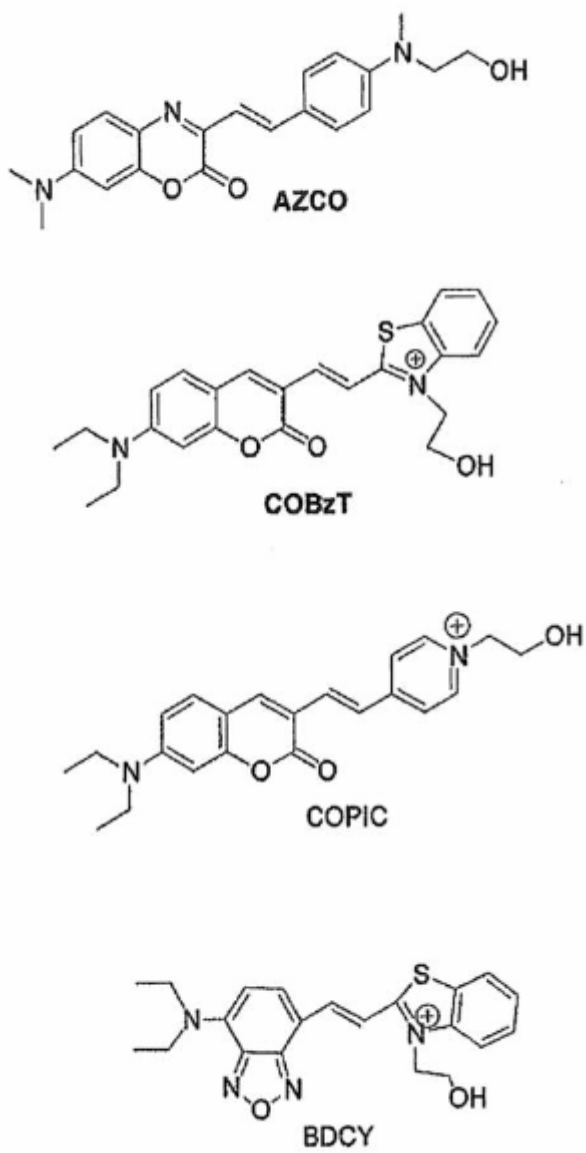


Fig. 4

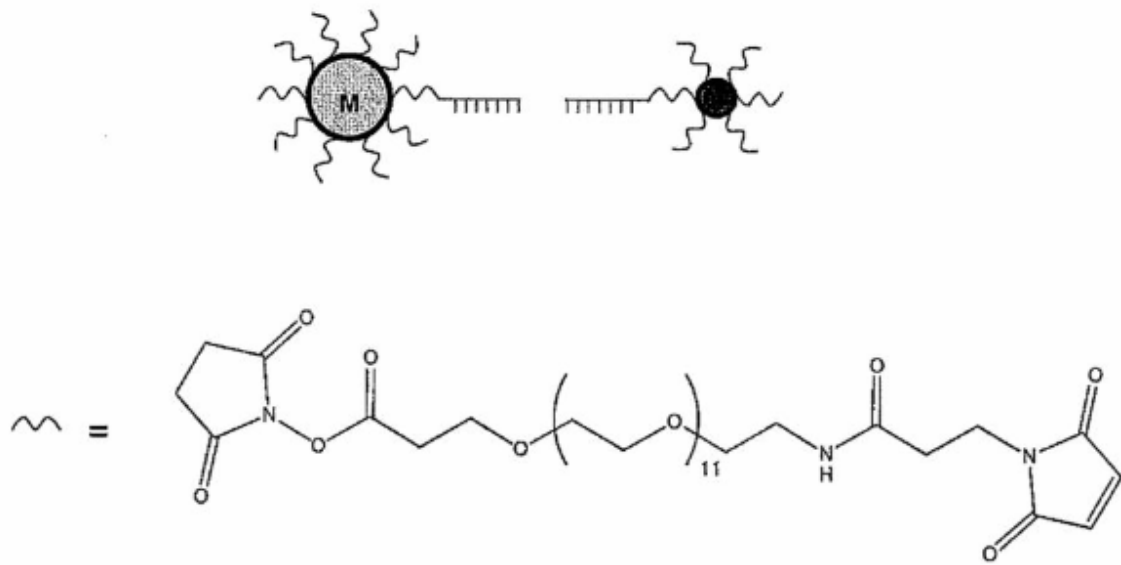


Fig. 5

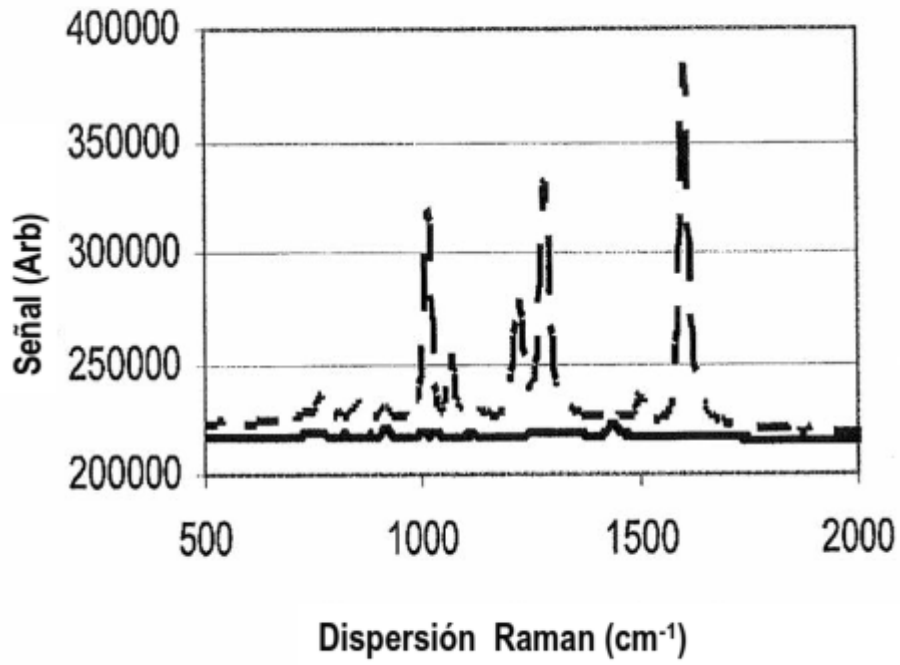


Fig. 6A

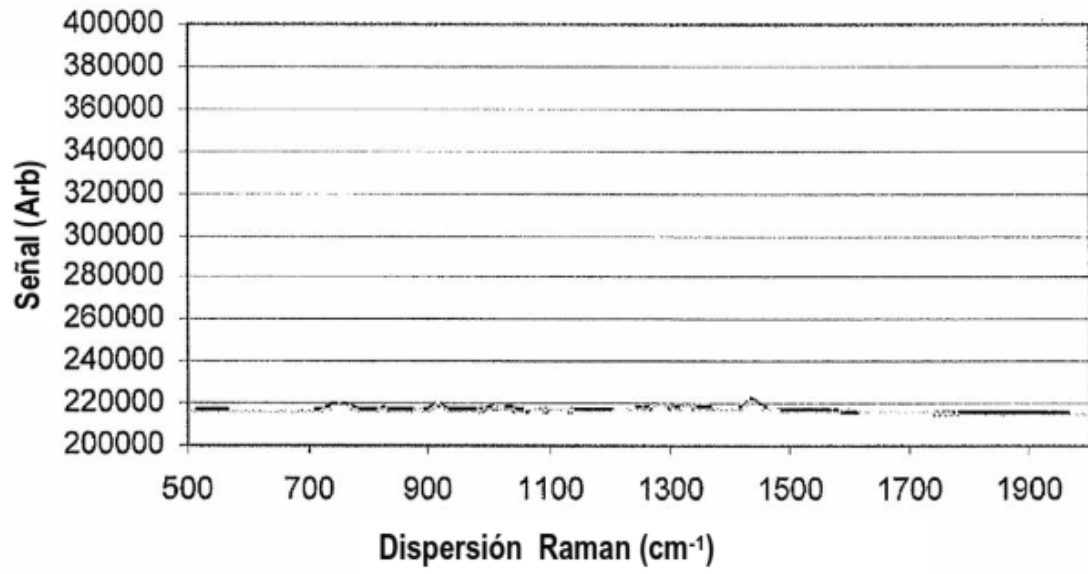


Fig. 6B

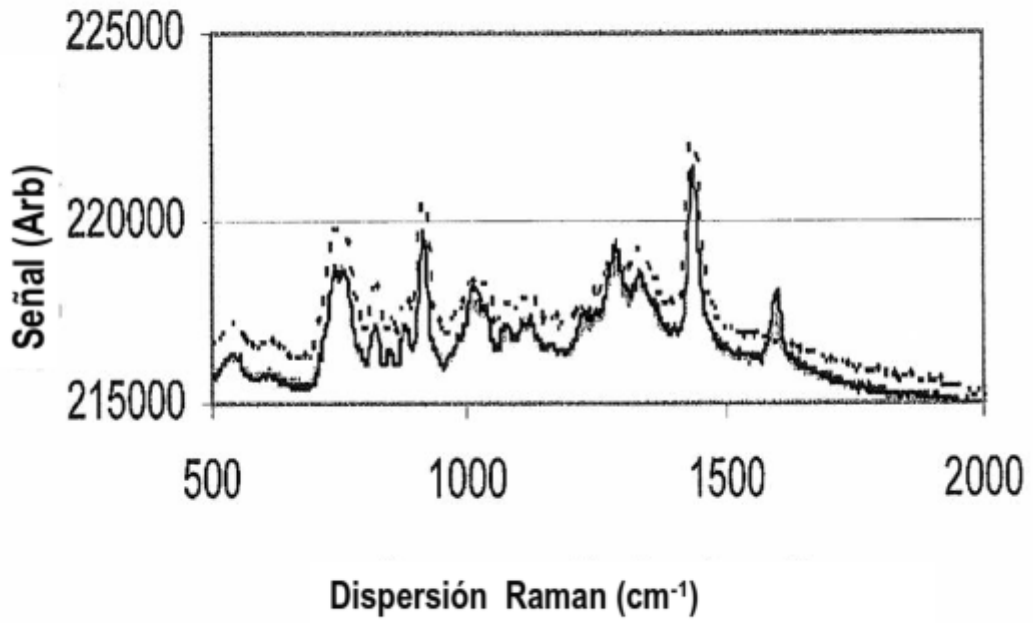


Fig. 6C