

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 257**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09730869 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2271939**

54 Título: **Inmunoensayos sensibles usando nanopartículas recubiertas**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 71035 P

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

28.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEIDEMAIER, KRISTIN;
SANDMANN, CHRISTIAN;
FULCHER, ROBERT A.;
KURODA, MELODY;
ALLPHIN, LORI PEDERSON y
CURRY, ADAM C.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 544 257 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

Inmunoensayos sensibles usando nanopartículas recubiertas

Campo

5 Se proporcionan nanopartículas recubiertas que comprenden un núcleo rodeado por una cubierta que aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en las que la nanopartícula recubierto no necesita, pero puede opcionalmente, incluir una molécula activa de Raman. Las nanopartículas recubiertas divulgadas en el presente documento son útiles en dispositivos y procedimientos de prueba para la determinación cuantitativa y / o cualitativa de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida.

Antecedentes

10 La tecnología del inmunoensayo proporciona un medio sencillo y relativamente rápido para determinar la presencia o ausencia de analitos en muestras biológicas. La información proporcionada por las pruebas diagnósticas de inmunoensayo es a menudo crucial para la atención al paciente. Normalmente, los ensayos se realizan para detectar cualitativa o cuantitativamente la presencia de analitos particulares, por ejemplo, los anticuerpos que están presentes cuando un sujeto humano tiene una enfermedad o afección concreta. Los inmunoensayos practicados en
15 la técnica son numerosos e incluyen ensayos para enfermedades, tales como infecciones causadas por bacterias o virus, o estados, tal como el embarazo.

En la técnica se conocen varios tipos de inmunoensayos. Un tipo de procedimiento de inmunoensayo es el inmunoensayo de flujo lateral. Los ensayos de flujo lateral utilizan un soporte sólido, tal como nitrocelulosa, plástico o vidrio, para llevar a cabo la detección del analito. En lugar de extraer la muestra a través del soporte perpendicularmente, como en el caso de un ensayo de "flujo a través", se permite que la muestra fluya lateralmente a lo largo del soporte por capilaridad y otras fuerzas de una zona de aplicación a una zona de reacción en la superficie. En un ensayo de flujo lateral, los anticuerpos de captura se aplican por raspado sobre el soporte sólido. Los anticuerpos de detección se conjugan con una molécula de detección, que proporciona una señal que es detectable. Una muestra líquida se pone en contacto con los anticuerpos de detección y se permite que la mezcla de muestra/anticuerpo de detección fluya a lo largo del soporte sólido. Si el analito está presente, se forma un complejo de "sándwich" en el lugar sobre el soporte sólido en el que se han aplicado por raspado los anticuerpos de captura. La señal de la molécula de detección localizada en la línea de captura se detecta a continuación, ya sea visualmente o con un instrumento. Un ensayo de flujo lateral se puede configurar para detectar proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos, células, moléculas pequeñas u otros analitos de interés.

30 Otro formato de inmunoensayo es un inmunoensayo de flujo a través. Generalmente, un inmunoensayo de flujo a través usa un material poroso con una matriz que contiene reactivo en capas sobre la mismo o incorporada en la misma. La muestra de ensayo se aplica a al material poroso y fluye a su través, y el analito en la muestra reacciona con el o los reactivos para producir una señal detectable sobre el material poroso. Estos dispositivos generalmente están encerrados dentro de una carcasa o estuche de plástico con calibraciones para ayudar a la detección del analito concreto.
35

Muchos ejemplos de diferentes tipos de moléculas de detección útiles en los inmunoensayos de flujo lateral se conocen en la técnica, tales como fluoróforos, coloides de oro, partículas de látex marcadas y nanopartículas, tales como un punto cuántico o una nanopartícula de dispersión de Raman potenciada en superficie ("SERS"). Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.591.645 describe el uso de moléculas "trazadoras" visibles, tales como oro coloidal, que se pueden ver sin el uso de instrumentación. Adicionalmente, la patente de EE.UU. N° 6.514.767 de Natan divulga nanopartículas compuestas activas en SERS (SACN) que comprenden una nanopartícula de metal que se ha unido o asociado con su superficie una o más moléculas activas en Raman y está encapsulada por una cubierta que comprende un polímero, vidrio o cualquier otro material dieléctrico. La patente de EE.UU. N° 5.714.389 describe procedimientos de inmunoensayo de flujo lateral y dispositivos de ensayo utilizando una partícula coloreada que puede ser un coloide metálico, preferentemente oro. Del mismo modo, la patente de EE.UU. N° 7.109.042 describe dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral que utilizan marcadores directos, tales como soles de oro y soles de colorante, que permiten La producción de un resultado analítico instantáneo sin la necesidad de añadir reactivos adicionales a fin de desarrollar una señal detectable. El documento WO2007/090058 divulga inmunoensayos de flujo lateral usando partículas de metal de encapsulación, en particular nanopartículas de SERS encapsuladas, como la modalidad de detección. Se observó una mejora de la sensibilidad del inmunoensayo de flujo lateral preparado para la lectura visual.
40
45
50

El SERS es uno de los procedimientos más sensibles para la realización de análisis químicos, lo que permite la detección de una sola molécula. Véase Nie, S. y S. R. Emory, "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering", Science, 275.1102 (1997). Un espectro Raman, similar a un espectro de infrarrojos, incluye una distribución de la longitud de onda de las bandas correspondiente a las vibraciones moleculares específicas de la muestra que se está analizando (el analito). En la práctica de la espectroscopia Raman, el haz procedente de una fuente de luz, generalmente un láser, se centra en la muestra para generar con ello la radiación inelásticamente dispersada, que se recoge y dirige ópticamente hacia un espectrómetro dispersivo
55

de longitud de onda o transformada de Fourier en el que un detector convierte la energía de los fotones que impactan en intensidad de señal eléctrica.

La muy baja conversión de la radiación incidente en radiación dispersa inelástica limitó la espectroscopia Raman a aplicaciones que eran difíciles de realizar mediante espectroscopia de infrarrojos, tales como el análisis de las soluciones acuosas. No obstante, en 1974 se descubrió que cuando una molécula en las proximidades de un electrodo de plata rugosa se somete a una fuente de excitación Raman, la intensidad de la señal generada se incrementa por tanto como seis órdenes de magnitud.

(Fleischmann, M., Hendra, P. J., y McQuillan, A. J., "Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode," Chem. Phys. Lett, 26, 123, (1974), y Weaver, M. J., Farquharson, S., Tadayyoni, M. A., "Surface-enhancement factors for Raman scattering at silver electrodes. Role of adsorbate-surface interactions and electrode structure," J. Chem. Phys., 82, 4867-4874 (1985)). En pocas palabras, los fotones del láser incidente se acoplan para conducir libremente los electrones dentro del metal que, confinado por la superficie de la partícula, causan, en conjunto, que la nube de electrones resuene. El campo de plasmón superficial resultante proporciona una vía eficiente para la transferencia de energía a los modos de vibración molecular de una molécula dentro del campo y, por lo tanto, genera fotones Raman. Las nanopartículas SERS se han utilizado como una molécula de detección en inmunoensayos de flujo lateral. Por ejemplo, Oxonica (Kidlington, Reino Unido) ha desarrollado nanopartículas Nanoplex™ para su uso en dichos ensayos. Las nanopartículas constan de un núcleo de nanopartícula de oro, sobre el cual se han adsorbido moléculas indicadoras de Raman capaces de generar una señal de espectroscopia Raman potenciada en superficie. La nanopartícula de oro marcada Raman está recubierta con una cubierta de sílice de aproximadamente 10-50 nm de espesor. La cubierta de sílice protege al indicador de la desorción de la superficie, impide las interacciones plasmón-plasmón entre partículas de oro adyacentes y también evita la generación de señales SERS desde los componentes en la solución. Las nanopartículas SERS que tienen un recubrimiento de polímero en lugar del recubrimiento de sílice se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 2007/0165219. El documento WO00/31538 divulga ensayos de flujo lateral que usan oro coloidal como mediciones del marcador y de reflectancia para la detección.

Al tiempo que aprovecha la alta sensibilidad de SERS, la detección de la señal producida a partir de una nanopartícula SERS requiere el uso de un instrumento capaz de detectar una señal Raman. En algunas circunstancias puede ser ventajoso tener nanopartícula para su uso en un inmunoensayo de flujo lateral que posea una mayor sensibilidad, tal vez comparable a la de una nanopartícula SERS, pero que solo requiera una tecnología relativamente simple y barata para leer reflectancia para la detección.

Sumario

La invención proporciona procedimientos rápidos y precisos para la determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia o ausencia de analitos en muestras y dispositivos biológicos y reactivos para realizar dichos procedimientos.

Los inventores han descubierto que las nanopartículas recubiertas usadas como molécula detectora en un inmunoensayo de flujo lateral o de flujo a través verticales proporcionan significativas ventajas de sensibilidad al ensayo sobre las moléculas detectoras tales como oro coloidal cuando el ensayo se lee con un lector de reflectancia.

Por consiguiente, la invención proporciona

(1) un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

(a) proporcionar un dispositivo de ensayo para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

(i) un miembro receptor de la muestra;

(ii) un vehículo en comunicación fluida con el miembro receptor de la muestra;

(iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, el reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, y en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y

(iv) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;

(b) poner en contacto la muestra líquida con el miembro receptor de la muestra del dispositivo de ensayo;

(c) permitir que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de la muestra para movilizar dicho reactivo marcado de tal manera que la muestra líquida y el reactivo marcado se mueven a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección;

(d) detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección mediante la medición de la

reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

5 (2) un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

- 10 a) proporcionar un dispositivo de ensayo que comprende: (i) un miembro receptor de la muestra; (ii) un vehículo en comunicación fluida con el miembro receptor de la muestra; y (iii) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;
- 15 (b) mezclar la muestra líquida con un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman;
- (c) poner en contacto la mezcla de b) con el miembro receptor de la muestra del dispositivo de ensayo;
- (d) dejar que la mezcla de b) aplicada al miembro receptor de la muestra se mueva a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección;
- 20 e) detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

(3) un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar un ensayo analítico de flujo a través para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, comprendiendo dicho kit:

- 25 (i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y
- 30 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) poner en contacto la muestra líquida con la superficie superior de la membrana porosa;
- (b) dejar que la muestra líquida fluya a través de la membrana porosa de tal manera que al menos una parte del analito, cuando está presente en la muestra líquida, se una al reactivo de unión;
- 35 (c) poner en contacto con el reactivo marcado con la superficie superior de la membrana porosa;
- (d) dejar que el reactivo marcado fluya a través de la membrana porosa de tal forma que al menos una porción del reactivo marcado se una al analito; y
- 40 (e) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

(4) un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar un ensayo analítico de flujo a través para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, comprendiendo dicho kit:

- 45 (i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y
- 50 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) mezclar la muestra líquida con el reactivo marcado de tal manera que el analito, cuando está presente en la muestra de líquido, se une al reactivo marcado;
- 55 (b) poner en contacto la mezcla de (A) con la superficie superior de la membrana porosa;
- (c) dejar que la mezcla de (a) fluya a través de la membrana porosa de tal forma que al menos una porción del analito unido al reactivo marcado se une al reactivo de unión; y
- (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativa de la

presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

(5) Un sistema que comprende

5 (I) un dispositivo de ensayo para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

(i) un miembro receptor de la muestra;

(ii) un vehículo en comunicación fluida con el miembro receptor de la muestra;

10 (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, el reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, y en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y

15 (iv) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo; en el que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de la muestra moviliza el reactivo marcado de tal manera que la muestra y el reactivo marcado se transportan a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección, y en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y

(II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de ensayo; y

20 (6) un sistema que comprende

(I) un kit para realizar un ensayo analítico de flujo a través para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, que comprende:

25 (i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y

30 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman y (II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de ensayo.

Dicha nanopartícula recubierta comprende un núcleo y una cubierta que aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman.

35 En algunas realizaciones, la cubierta comprende sílice, mientras que en otras realizaciones, la cubierta es otro material cerámico, tal como otro óxido, y en otras realizaciones la cubierta está compuesta por un polímero. El polímero puede ser, por ejemplo, polietilenglicol, polimetilmetacrilato, o poliestireno. La cubierta puede rodear el núcleo de forma completamente o incompleta.

40 Las nanopartículas recubiertas pueden tomar cualquiera de diversas formas que tienen diferentes dimensiones, incluidas, entre otras, esferoides, varillas, discos, pirámides, cubos, cilindros, etc. En ciertas realizaciones, la nanopartícula recubierta tiene al menos una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm. En otras realizaciones, el núcleo de la nanopartícula recubierta es esférico. En algunos casos, el diámetro del núcleo es de aproximadamente 10-100 nm, mientras que en otras realizaciones, el diámetro del núcleo es de aproximadamente 20-60 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden agregados de múltiples núcleos, por ejemplo, pero sin limitaciones, dobletes.

45 La cubierta de la nanopartícula está modificada para permitir la conjugación de moléculas a la superficie de la nanopartícula. En realizaciones particulares, la modificación introduce grupos tiol sobre la superficie de la nanopartícula recubierta. En otras realizaciones, un ligando, por ejemplo y sin limitaciones, un anticuerpo, se conjuga con la cubierta de la nanopartícula recubierta a través de los grupos tiol.

50 El ligando puede unirse a cualquier analito de interés que pueden o no estar presentes en una muestra. En ciertas realizaciones, el ligando es un anticuerpo que se une a las proteínas específicas del virus de la gripe A. En ciertas realizaciones, el ligando es un anticuerpo que se une a las proteínas específicas del virus de la gripe A o del virus de la gripe B.

55 En ciertas realizaciones, el reactivo marcado utilizado en el dispositivo de ensayo comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consta de un núcleo y una cubierta que aumenta la reflectancia de la nanopartícula que tiene el ligando unido a la misma, en el que dicho ligando está unido a la superficie de la cubierta.

5 En ciertas realizaciones, el vehículo es, por ejemplo y sin limitaciones, nitrocelulosa, plástico o vidrio. En otras realizaciones, el dispositivo de ensayo comprende además una almohadilla absorbente y / o una zona de control en comunicación fluida con la zona de detección. El dispositivo de ensayo se puede utilizar para detectar cualitativamente o cuantitativamente la presencia o ausencia de cualquier analito de interés, tal como y sin limitaciones, una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, o bacteria. En ciertas realizaciones, el dispositivo de ensayo puede usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de al menos dos reactivos marcados diferentes.

10 En algunas realizaciones se usa un lector de reflectancia para detectar el reactivo marcado en la zona de detección. En algunas realizaciones, el analito se detecta cuantitativamente y en otras realizaciones, el analito se detecta cualitativamente. En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención puede usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de al menos dos reactivos marcados diferentes.

15 En ciertas realizaciones, el dispositivo de ensayo del kit descrito anteriormente comprende además una almohadilla absorbente, en el que la superficie inferior de la membrana porosa y la almohadilla absorbente están en contacto físico y en comunicación fluida, y en el que el reactivo de unión está unido a la superficie superior de la membrana porosa. En otras realizaciones, el dispositivo de ensayo de los kits de la invención comprende, además, un alojamiento para la membrana porosa.

20 Los kits se pueden utilizar para detectar cualitativamente o cuantitativamente la presencia o ausencia de cualquier analito de interés, tal como y sin limitaciones, una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, o bacteria. En ciertas realizaciones, los kits pueden usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de al menos dos reactivos marcados diferentes.

25 En algunas realizaciones se usa un lector de reflectancia para detectar el reactivo marcado en la zona de detección. En algunas realizaciones, el analito se detecta cuantitativamente y en otras realizaciones, el analito se detecta cualitativamente. En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención puede usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de al menos dos reactivos marcados diferentes.

Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra los resultados de una prueba de flujo lateral para el virus de la gripe A de comparación de la sensibilidad del oro coloidal y las nanopartículas de oro recubiertas con sílice cuando se mide con un reflectómetro. Como se ve en la Figura, se observó una respuesta más fuerte para las nanopartículas de oro recubiertas de sílice en comparación con los coloides de oro.

40 La Figura 2 muestra los resultados de una prueba de flujo lateral para el virus de la gripe A de comparación de la sensibilidad de un dispositivo prototipo usando nanopartículas de oro recubiertas de sílice (panel 2A) con la sensibilidad de un producto comercial, BD Directigen™ EZ A + B (Panel 2B), cuando ambos dispositivos se leen con un reflectómetro. El dispositivo usando las nanopartículas de oro recubiertas de sílice es aproximadamente 7 veces más sensible que el BD Directigen™ EZ A + B cuando se lee con un reflectómetro.

Descripción detallada de determinadas realizaciones

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por un experto ordinario en la técnica. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica de las reivindicaciones, más adelante se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

50 En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que específicamente se indique lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere de nuevo a más de una reivindicación precedente independiente o dependiente únicamente en la alternativa. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, menos que específicamente se indique lo contrario.

55 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Con el fin de que la presente solicitud pueda entenderse con mayor facilidad, primero se definen ciertos términos y expresiones. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

El término "nanopartícula" como se usa en el presente documento, se refiere a partículas que comprenden al menos un núcleo y una cubierta que tiene una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nanómetros ("nm"). Las nanopartículas de la invención pueden tener cualquier forma. En ciertas realizaciones, las nanopartículas son esféricas. Las nanopartículas de la invención normalmente no lo hacen, pero pueden, incluir una molécula activa en Raman. En ciertas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender múltiples núcleos y una cubierta.

Como se utiliza en el presente documento, el término "núcleo" se refiere a la porción interna de las nanopartículas usadas en la invención. En la invención, el núcleo es oro.

Las nanopartículas también comprenden una cubierta que mejora la reflectancia de las nanopartículas. La cubierta puede encapsular completamente el núcleo o encapsular incompletamente el núcleo. La cáscara puede estar compuesta por cualquier material o combinación de materiales, siempre que posea la propiedad de potenciar la reflectancia de la nanopartícula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cubierta puede comprender cualquier material transparente en el rango espectral requerido. En ciertas realizaciones, la cubierta comprende sílice, es decir, vidrio. En otras realizaciones, la cubierta comprende otro material cerámico, por ejemplo, pero sin limitaciones, cerámicas transparentes con un alto índice de refracción, tales como perovskita y de ZrO₂. En otras realizaciones, la cubierta se compone de un polímero. En realizaciones particulares, el polímero comprende polietilenglicol, polimetilmetacrilato o poliestireno. En algunas realizaciones, el material que forma la cubierta se trata o derivatiza para permitir la unión de un ligando a la superficie de la nanopartícula. La elección óptima de polímero puede depender del ligando que se esté inmovilizando sobre la superficie de la nanopartícula.

En referencia a la cubierta de la presente divulgación, la frase "aumenta la reflectancia de la nanopartícula" significa que la presencia de la cubierta tiene como resultado una nanopartícula que proporciona una mayor señal o sensibilidad cuando se mide mediante reflectancia en, por ejemplo, un inmunoensayo de flujo lateral, en comparación con una nanopartícula sin la cubierta. Sin desea quedar ligado a teoría alguna, la presencia de la cubierta que rodea el núcleo puede hacer directamente que la partícula refleje más luz. Como alternativa, o además, los ligandos unidos a la superficie de la cubierta pueden orientarse mejor para participar en las reacciones de unión cuando se unen al material de la cubierta a diferencia de cuando son adsorbidos pasivamente a la superficie del núcleo.

Como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula de cualquier tipo que se unirá a un analito de interés. Por ejemplo y sin limitaciones, en ciertas realizaciones, el ligando es un anticuerpo, un antígeno, un receptor, un ácido nucleico o una enzima.

El término "analito" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia de interés que se puede desear detectar usando la invención, incluyendo, sin limitaciones, fármacos, incluidos fármacos terapéuticos y drogas de abuso; hormonas; vitaminas; proteínas, incluidos anticuerpos de todas las clases; péptidos; esteroides; bacterias; hongos; virus; parásitos; componentes o productos de bacterias, hongos, virus o parásitos; alérgenos de todos los tipos; productos o componentes de células normales o malignas; etc. Como ejemplos particulares, se pueden citar la gonadotropina coriónica humana (hCG); la insulina; la hormona luteinizante; organismos causantes o asociados con varias enfermedades, tales como *Streptococcus pyogenes* (grupo A), herpes simple I y II, citomegalovirus, *Chlamydia*, anticuerpos contra la rubéola, gripe A y B; etc. En ciertas realizaciones de la invención, la presencia o ausencia de un analito en una muestra se determina cualitativamente. En otras realizaciones, se determina una determinación cuantitativa de la cantidad o concentración de analito en la muestra.

El término "muestra" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier muestra biológica que puede contener un analito para la detección. En algunas formas de realización, la muestra biológica está en forma líquida, mientras que en otras se puede cambiar en una forma líquida.

La expresión "miembro receptor de la muestra" como se usa en el presente documento significa la parte del dispositivo de ensayo que está en contacto directo con la muestra líquida, es decir, que recibe la muestra que se va a analizar para el analito de interés. El miembro receptor de la muestra puede ser parte de, o separarse de, el vehículo o membrana porosa. La muestra líquida puede después migrar, a través de flujo lateral o vertical, desde el miembro receptor de la muestra hacia la zona de detección. El miembro receptor de la muestra está en contacto de flujo de líquido con la zona de detección del analito. Esto podría ser una conexión solapante, de arriba abajo o de extremo a extremo. En ciertas realizaciones, el miembro receptor de la muestra está hecho de material poroso, por ejemplo, y sin limitaciones, papel.

Como se usa en el presente documento, el término "vehículo", tal como se usa en un ensayo de flujo lateral, se refiere a cualquier sustrato capaz de proporcionar flujo de líquido. Esto incluiría, por ejemplo, sustratos tales como nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin tratar, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio, o nylon. El sustrato puede ser poroso. Típicamente, los poros del sustrato tienen un tamaño suficiente como para que las nanopartículas fluyan a través de la totalidad del vehículo. Un experto

en la técnica conocerá otros materiales que permiten el flujo de líquido. El vehículo puede comprender uno o más sustratos en comunicación fluida. Por ejemplo, la zona de reactivo y la zona de detección pueden estar presentes en el mismo sustrato (es decir, almohadilla) o pueden estar presentes en sustratos distintos (es decir, almohadillas) dentro del vehículo.

5 Como se usa en el presente documento, "membrana porosa," tal como se utiliza en un ensayo de flujo a través, se refiere a una membrana o filtro de cualquier material que se humedece fácilmente con una solución acuosa y tiene poros suficientes para permitir que las nanopartículas recubiertas pasen a través. Materiales adecuados incluyen, por ejemplo, sustratos tales como nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin tratar, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio, o nylon.

10 Como se usa en el presente documento, "material absorbente" se refiere a un material poroso que tiene una capacidad absorbente suficiente para absorber sustancialmente todos los líquidos de los reactivos de ensayo y cualquier solución de lavado y, opcionalmente, para iniciar la acción capilar y extraer los líquidos de ensayo a través del dispositivo de ensayo. Materiales adecuados incluyen, por ejemplo, sustratos tales como nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin tratar, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio, o nylon.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "flujo lateral" se refiere al flujo de líquido a lo largo del plano de un vehículo. En general, los dispositivos de flujo lateral pueden comprender una tira (o varias tiras en comunicación fluida) de material capaz de transportar una solución por acción capilar, es decir, una acción de absorción o cromatográfica, en el que diferentes áreas o zonas de la o las tiras contienen reactivos de ensayo unidos por difusión o de forma no difusiva que producen una señal detectable a medida que la solución se transporta hacia o a través de dichas zonas. Típicamente, dichos ensayos comprenden una zona de aplicación adaptada para recibir una muestra líquida, una zona de reactivos separada lateralmente de y en comunicación fluida con la zona de aplicación, y una zona de detección separada lateralmente de, y en comunicación fluida con, la zona de reactivo. La zona de reactivo puede comprender un compuesto que es móvil en el líquido y capaz de interactuar con un analito en la muestra y/o con una molécula unida en la zona de detección. La zona de detección puede comprender una molécula de unión que está inmovilizada sobre la tira y es capaz de interactuar con el analito y / o el compuesto reactivo para producir una señal detectable. Tales ensayos pueden usarse para detectar un analito en una muestra a través de un ensayo de tipo sándwich directo o unión competitiva. Ejemplos de dispositivos de flujo lateral se proporcionan en las patentes de EE.UU. N° 6.194.220 de Malick y col.; 5.998.221 de Malick y col.; 5.798.273 de Shuler y col.; y RE38.430 de Rosenstein.

En un ensayo de flujo lateral de tipo sándwich, una muestra líquida que puede o no contener un analito de interés se aplica a la zona de aplicación y se deja pasar a la zona de reactivo por acción capilar. El analito, si está presente, interactúa con un reactivo marcado en la zona de reactivo y el complejo analito-reactivo se mueve por acción capilar a la zona de detección. El complejo analito-reactivo queda atrapado en la zona de detección mediante la interacción con una molécula de unión específica del analito y / o el reactivo. La muestra no unida puede moverse a través de la zona de detección por acción capilar a una almohadilla absorbente yuxtapuesta lateralmente y en comunicación fluida con la zona de detección. El reactivo marcado se puede detectar después en la zona de detección por los medios adecuados.

En un ensayo de flujo lateral competitivo, una muestra líquida que puede o no contener un analito de interés se aplica a la zona de aplicación y se deja pasar a la zona de reactivo por acción capilar. La zona de reactivo comprende un reactivo marcado, que puede ser el propio analito, un homólogo o derivado del mismo, o un resto que es capaz de imitar al analito de interés cuando se une a un aglutinante inmovilizado en la zona de detección. El reactivo marcado es móvil en la fase líquida y se mueve con la muestra líquida a la zona de detección por acción capilar. El analito contenido en la muestra líquida compite con el líquido reactivo marcado en la unión al aglutinante inmovilizado en la zona de detección. La muestra no unida puede moverse a través de la zona de detección por acción capilar a una almohadilla absorbente yuxtapuesta lateralmente y en comunicación fluida con la zona de detección. El reactivo marcado se puede detectar después en la zona de detección por los medios adecuados. La presencia o ausencia del analito de interés se pueden determinar a través de la inspección de la zona de detección, en el que cuanto mayor es la cantidad de analito presente en la muestra líquida, menor es la cantidad de receptor marcado unido en la zona de detección.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "flujo vertical" y "flujo a través" se refieren a flujo de líquido transversal al plano de un vehículo. En general, los dispositivos de flujo a través pueden comprender una membrana o capas de membranas apiladas una encima de la otra, que permiten el paso de líquido a través del dispositivo. Las capas pueden contener reactivos de ensayo, unidos de forma difusiva o no difusiva, que producen una señal detectable a medida que la solución es transportada a través del dispositivo. Típicamente, el dispositivo comprende la primera capa que tiene una superficie superior e inferior, en el que dicha superficie superior está adaptada para recibir una muestra líquida, y una capa absorbente yuxtapuesta verticalmente y en comunicación fluida con la superficie inferior de la primera capa que está adaptada para extraer la muestra líquida a través de la primera capa. La primera capa puede comprender un agente de unión unido a la superficie superior de la primera capa que es capaz de interactuar con un analito en la muestra y atrapar del analito en la superficie superior de la primera capa. Los ejemplos de dispositivos de flujo a través se proporcionan en las patentes de EE.UU. N°

4.920.046 de McFarland y col. y 7.052.831 de Fletcher y col.

5 En la práctica, una muestra líquida que puede o no contener un analito de interés se aplica a la superficie superior de una primera capa que comprende un agente de unión específico para un analito de interés. A continuación, la muestra líquida fluye entonces a través de la primera capa y a la capa absorbente. Si el analito está presente en la muestra, interacciona con el agente de unión y queda atrapada en la superficie superior de la primera capa. Después, la primera capa se puede tratar con soluciones de lavado de acuerdo con procedimientos de inmunoensayo convencionales. La primera capa puede después tratarse con un reactivo marcado que se une al analito atrapado por el agente de unión. A continuación, el reactivo marcado fluye a través de la primera capa y a la capa absorbente. La primera capa se puede tratar con soluciones de lavado de acuerdo con procedimientos de inmunoensayo convencionales. Después, el reactivo marcado se puede detectar por medios apropiados. Como alternativa, la muestra líquida puede mezclarse con el reactivo marcado antes de ser aplicada a la superficie superior de la primera capa. Otras variaciones adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica.

15 Los ensayos de flujo lateral y a través pueden usarse para detectar múltiples analitos en una muestra. Por ejemplo, en un ensayo de flujo lateral, la zona de reactivo puede comprender múltiples reactivos marcados, cada uno capaz de unirse a (o imitar) un analito diferente en una muestra líquida, o un solo reactivo marcado capaz de unirse a (o imitar) múltiples analitos. Alternativamente, o además, la zona de detección en un ensayo de flujo lateral puede comprender múltiples moléculas de unión, cada una capaz de unirse a un analito diferente en una muestra líquida, o una única molécula de unión capaz de unirse a múltiples analitos. En un ensayo de flujo a través, la membrana porosa puede comprender múltiples agentes de unión, cada una capaz de unirse a un analito diferente en una muestra líquida, o una única molécula de unión capaz de unirse a múltiples analitos. Como alternativa, o además de, se puede utilizar una mezcla de reactivos marcados en un ensayo de flujo a través, configurado cada uno para unirse a un analito diferente en una muestra líquida, o un único reactivo marcado configurado se une a múltiples analitos. Si se usan varios reactivos marcados en un ensayo de flujo a través, los reactivos pueden estar marcados diferencialmente para distinguir diferentes tipos de analitos en una muestra líquida.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "móvil" significa unido de forma difusiva o no difusiva, o impregnado. Los reactivos que son móviles son capaces de dispersarse con la muestra de líquido y son transportados por la muestra de líquido en el flujo lateral o vertical.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "reactivo marcado" significa cualquier partícula, proteína o molécula que reconoce o se une al analito de interés y que tiene unida una sustancia capaz de producir una señal que sea detectable por medios visuales o instrumentales, es decir, una nanopartícula recubierta como se define en el presente documento. La partícula o molécula que reconoce el analito puede ser natural o no natural. En algunas realizaciones, la molécula es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "reactivo de unión" significa cualquier partícula o molécula que reconoce o se une al analito en cuestión. El reactivo de unión es capaz de formar un complejo de unión con el complejo de analito-reactivo marcado. El reactivo de unión se inmoviliza en el vehículo en la zona de detección o en la superficie de la membrana porosa. El reactivo de unión no se ve afectado por el flujo lateral o vertical de la muestra líquida debido a la inmovilización en el vehículo o membrana porosa. La partícula o molécula pueden ser naturales o no naturales, es decir, sintética. Una vez que el reactivo de unión se une el complejo de reactivo marcado – analito, evita que el complejo de reactivo marcado – analito continúe con el flujo de la muestra líquida.

Como se usa en el presente documento, "zona de detección" significa la parte del vehículo o membrana porosa que contiene el reactivo de unión inmovilizado.

45 La expresión "zona de control" se refiere a una porción del dispositivo de ensayo que comprende una molécula de unión configurada para capturar el reactivo marcado. En un ensayo de flujo lateral, la zona de control puede estar en contacto de flujo líquido con la zona de detección del vehículo, de tal manera que el reactivo marcado es capturado en la zona de control a medida que la muestra líquida se transporta fuera de la zona de detección por acción capilar. En un ensayo de flujo a través, la zona de control puede ser una parte distinta de la membrana porosa, de tal manera que el reactivo marcado se aplica tanto a la porción de aplicación de la muestra de la membrana porosa como a la zona de control. La detección del reactivo marcado en la zona de control confirma que el ensayo está funcionando para su finalidad prevista.

55 El término "alojamiento" se refiere a cualquier carcasa adecuada para los dispositivos de ensayo de la invención. Los alojamientos de ejemplo serán conocidos por los expertos en la técnica. El alojamiento puede tener, por ejemplo, una porción de base y una porción de tapa. La tapa puede incluir una pared superior y una pared lateral sustancialmente vertical. Un borde puede proyectarse hacia arriba desde la pared superior. El borde puede definir un receso que tiene en su interior una pieza de inserción con al menos dos aberturas en alineación con al menos otras dos aberturas de la tapa para formar al menos dos pozos en el alojamiento. El alojamiento puede ser construido para asegurar que no hay comunicación entre los dos o más pozos. Un ejemplo de dicho alojamiento se proporciona en la patente de EE.UU. N° 7.052.831 DE Fletcher y col. Otros alojamientos adecuados incluyen los utilizados en el dispositivo de ensayo de flujo lateral BD Directigen™ EZ RSV.

Como se usa en el presente documento, "lector de reflectancia" o "reflectómetro" se refiere a un instrumento capaz de detectar el cambio en la reflectancia provocado por la presencia de la nanopartícula recubierta en la zona de detección del dispositivo de ensayo. Lectores de reflectancia o reflectómetros son conocidos en la técnica. Los instrumentos representativos adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, el Immunochromato Reader C10066 de Hamamatsu o el ESE-Quant de ESE GmbH. Muy habitualmente se realiza un barrido de la zona de detección por el área de detección del dispositivo o se obtienen imágenes directamente sobre el detector del reflectómetro que conduce a un rastro de reflectividad frente a coordenada espacial. Después se usa un algoritmo adecuado para determinar, por ejemplo, el cambio máximo de reflectividad en la zona de detección.

Las nanopartículas recubiertas para su uso en procedimientos basados en SERS son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.514.767 describe nanopartículas compuestas activas en SERS (SACN) que comprenden una nanopartícula metálica que ha unido o asociado con su superficie una o más moléculas activas en Raman y está encapsulada por una cubierta que comprende un polímero, vidrio o cualquier otro material dieléctrico. Tales partículas pueden producirse cultivando, o, de otro modo, colocando, una cubierta de un encapsulante adecuado sobre un núcleo de nanopartícula metálica activa en Raman. Las nanopartículas metálicas del tamaño deseado pueden cultivarse como coloides metálicos mediante una serie de técnicas bien conocidas en la materia, tales como reducción química o fotoquímica de los iones metálicos en solución utilizando agentes reductores. Por ejemplo, las partículas de oro coloidal, que son suspensiones de partículas de oro de tamaño submicrométrico en el líquido, se pueden producir en un líquido mediante reducción de ácido cloroáurico. Después de disolver el ácido, la solución se agita rápidamente al tiempo que se añade un agente reductor. Esto hace que los iones de oro se reduzcan a átomos de oro neutros, que precipitan a partir de la solución supersaturada y forman partículas. Para evitar que las partículas se agreguen, se puede añadir un agente estabilizador que se adhiera a la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas también se pueden hacer mediante descarga eléctrica en solución. Las partículas se pueden funcionalizar con diversos ligandos orgánicos para crear híbridos orgánicos-inorgánicos con funcionalidad avanzada.

Los encapsulantes adecuados incluyen vidrio, polímeros, metales, óxidos metálicos, y sulfuros de metal. Si el encapsulante es vidrio, los núcleos de nanopartículas de metal se tratan preferentemente primero con un cebador de vidrio. Después, el vidrio crece sobre la nanopartícula de metal mediante técnicas estándar. El espesor de la encapsulante se puede variar fácilmente dependiendo de las propiedades físicas requeridas de la partícula. Las cubiertas se pueden derivatizar mediante técnicas estándar, lo que permite que las partículas se conjuguen con moléculas (incluidas biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos) o con soportes sólidos.

Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ disponibles comercialmente consisten en un núcleo de nanopartícula de oro, sobre la cual hay moléculas indicadoras de Raman adsorbidas capaces de generar una señal de SERS. La nanopartícula de oro marcada Raman se recubre después con una cubierta de sílice de aproximadamente 10-50 nm de espesor. La cubierta de sílice protege las moléculas indicadoras de la desorción de la superficie del núcleo, impide las interacciones plasmón-plasmón entre partículas de oro adyacentes y también evita la generación de señales SERS desde los componentes en la solución.

Para un ensayo de flujo lateral leído con un lector de reflectancia, se podría esperar que la nanopartícula Oxonica Nanoplex™ diera un ensayo de sensibilidad comparable al de los coloides de oro del mismo diámetro que el núcleo de la nanopartícula Oxonica Nanoplex™ y se utiliza a la misma densidad óptica. En lugar de ello, los inventores observaron ventajas inesperadas y significativas en la sensibilidad del ensayo cuando los coloides de oro se sustituyen por nanopartículas Oxonica Nanoplex™ en ensayos de flujo lateral leídos con un lector de reflectancia en lugar de un detector de señal Raman. Es importante destacar que las mejoras de la sensibilidad obtenidas con las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ generalmente no se podían obtener simplemente mediante el ajuste del diámetro de los coloides de oro sin recubrir. También es importante que cuando las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ se utilizan como un reactivo marcado, la sensibilidad del ensayo puede ser equivalente, se lea la señal con un reflectómetro o con un lector de SERS.

Las moléculas activas en Raman en las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ no se cree que contribuyan al funcionamiento del ensayo cuando se usa un reflectómetro para leer la señal en vez de un lector de Raman. Esta expectativa se ve confirmado por experimentos en los que las nanopartículas recubiertas de sílice (sin moléculas activas en Raman) se ha encontrado que funcionan de forma idéntica y se han utilizado en ensayos de flujo lateral basados en reflectómetro para dar ventajas de sensibilidad significativas sobre los coloides de oro descubiertos.

Ejemplos

Ejemplo 1 (no forma parte de la invención):

Este experimento comparó el rendimiento de las nanopartículas de oro recubiertas de sílice con el de los coloides de oro en un inmunoensayo de flujo lateral para el virus de la gripe A. En este experimento, los aspirados nasofaríngeos que dieron negativo para el virus de la gripe A se enriquecieron con cantidades conocidas de un virus de la gripe A H1N1.

Los coloides de oro, obtenidos del British Biocell International ("BB International"; "BBI"), tenían un diámetro de 40 nm. Las nanopartículas de oro recubiertas de sílice utilizadas en el experimento fueron nanopartículas Oxonica Nanoplex. Estas nanopartículas constan de un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el indicador de Raman 4,4'-dipiridilo y una cubierta de sílice externa. El grosor de la cubierta de sílice fue de aproximadamente 30 nm. Los anticuerpos de detección de la gripe A se unieron a grupos coloides mediante adsorción pasiva. Para las nanopartículas Nanoplex™, los anticuerpos de detección de la gripe A se unieron covalentemente a grupos tiol sobre la superficie de la sílice a través de química de maleimida. Para ambos ensayos, los anticuerpos de captura de la gripe A se aplicaron por raspado en membranas de nitrocelulosa Whatman AE99. Las membranas de nitrocelulosa se analizaron después en un formato líquido ("tira reactiva") en el que las partículas más los anticuerpos de detección se mezclaron con las muestras nasofaríngeas que contienen diversos niveles de virus. La misma densidad óptica se utiliza tanto para los coloides de oro como para las nanopartículas recubiertas. Las mezclas de partícula / muestra se colocaron después en los pocillos de una placa de 96 pocillos y un extremo de una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos de captura se colocó en cada pocillo. La muestra se dejó absorber hasta la membrana de nitrocelulosa y los pocillos se llenaron a continuación con un tampón de lavado que después también absorbió las tiras de membrana de nitrocelulosa.

La señal resultante de la línea de captura se leyó con un reflectómetro para Becton, Dickinson and Company ("BD") hecho a medida por UMM Electronics (Indianapolis, IN). La Figura 1 muestra un gráfico de la señal del reflectómetro como una función de la concentración de virus para las pruebas de flujo lateral con coloides de oro y con nanopartículas recubiertas. Se observó una respuesta significativamente más fuerte para las nanopartículas Oxonica frente a los coloides de oro.

Ejemplo 2 (no forma parte de la invención):

En este ejemplo, la sensibilidad de las nanopartículas de oro recubiertas de sílice se comparó con la de un producto comercial: la prueba BD Directigen™ EZ Flu A+B. Como en el Ejemplo 1, la nanopartícula de oro recubierta se analizó en un formato de tira reactiva usando nitrocelulosa AE99 Whatman. El Directigen™ EZ Flu A+B se analizó en su realización comercial (formato "cartucho"). Los anticuerpos de captura y de detección fueron los mismos tanto para el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B y el dispositivo basado en nanopartículas-Oxonica Nanoplex™. Las muestras se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el virus vivo B / Lee / 40 de la gripe B, se enriqueció en los aspirados naso-faríngeos negativos en lugar del virus de la gripe A. Como se ha indicado anteriormente, las nanopartículas de oro recubiertas de sílice utilizadas en el experimento fueron nanopartículas Oxonica Nanoplex. Estas nanopartículas constan de un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el indicador de Raman 4,4'-dipiridilo y una cubierta de sílice externa. El grosor de la cubierta de sílice fue de aproximadamente 30 nm. El producto comercial BD utiliza 40 nm de oro coloidal que no incluye una cubierta de sílice. El producto comercial BD se utilizó de acuerdo con la ficha, solo que la señal de línea de la prueba se leyó con un reflectómetro, así como visualmente.

Los datos se muestran en la Tabla 1, que compara el límite de detección (límite de detección fiable) para las dos partículas. El límite de detección fiable (LDF) se define como la concentración a la que el límite inferior de confianza del 95 % es igual al límite superior de confianza del 95 % del blanco.

Los LDF, expresados en unidades arbitrarias (x) para el producto de oro coloidal BD y para las nanopartículas recubiertas de sílice, se notificaron para tres experimentos distintos. El mismo reflectómetro integrado de UMM Electronics se utilizó para leer la señal tanto de los dispositivos de tira reactiva de las nanopartículas recubiertas de sílice y los dispositivos Directigen™ EZ Flu A + B. El factor de mejora de la sensibilidad se define como el LDF del producto basado en oro sin recubrir dividido por el LDF del producto de nanopartículas recubiertas con sílice.

Tabla 1

	BD Directigen™ EZ oro sin recubrimiento (leer con un reflectómetro)	Prueba de flujo lateral con nanopartículas Oxonica (leer con un reflectómetro)	Factor de mejora de la sensibilidad
Experimento 1	0,23	0,015	15
Experimento 2	0,12	0,0075	16
Experimento 3	0,26	0,028	9

Como se observa en la tabla, las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ dieron una sensibilidad hasta 16 veces mayor en comparación con las partículas de oro descubiertas.

En experimentos distintos similares a los descritos anteriormente, el diámetro de las partículas coloidales de oro se incrementó de 40 nm a 60 nm y tamaños más grandes. En estos experimentos, solo se observaron mejoras de

sensibilidad limitadas (hasta 2 veces), lo que indica que la diferencia de tamaño entre el núcleo de oro de las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ y el coloide de oro no es probablemente la fuente de las mejoras de sensibilidad.

Ejemplo 3 (no forma parte de la invención):

5 Este experimento comparó la sensibilidad y especificidad de coloides de oro frente a nanopartículas Oxonica Nanoplex™ en una prueba de inmunoensayo de flujo lateral de la gripe B (B / Lee / 40). Se prepararon sesenta muestras clínicas. Las muestras fueron todas muestras nasofaríngeas que dieron resultados negativos para la gripe B. Veinte de las muestras sirvieron como controles negativos. Las 40 muestras restantes se enriquecieron con el virus de la gripe B en vivo a dos niveles para crear un conjunto de 40 muestras positivas. Veinte de estas cuarenta
10 muestras se enriquecieron con el virus de la gripe B a una concentración de 0,5X (unidades arbitrarias). Las veinte muestras restantes recibieron 10 veces menos virus de la gripe B, para una concentración de 0.05x. Las sesenta muestras (40 positivas y 20 controles negativos) se analizaron utilizando el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B en formato cartucho y el dispositivo de tira reactiva fabricado usando nanopartículas Oxonica Nanoplex™. El dispositivo de tira reactivas preparó usando nitrocelulosa AE99 Whatman. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ constan de un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el indicador de Raman 4,4'-dipiridilo y una cubierta de sílice externa que tenía un espesor de aproximadamente 30 nm. Los anticuerpos de captura y de detección fueron los mismos tanto para el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B y el dispositivo basado en nanopartículas-Oxonica Nanoplex™.

20 Los resultados se resumen en la Tabla 2. En la tabla, la sensibilidad se calculó como el porcentaje de las 40 muestras positivas correctamente identificadas como positivas por cada prueba. La especificidad se calcula como el porcentaje de las 20 muestras negativas correctamente identificadas como negativas en cada prueba. Cuando se utilizaron lecturas del instrumento, una prueba se denominó positiva si la lectura del instrumento de medición fue mayor que un valor umbral establecido para cada tipo de dispositivo. El umbral se estableció para garantizar una especificidad de al menos el 95 % para cada dispositivo. En este ejemplo, el producto Directigen™ se leyó
25 visualmente y con el reflectómetro integrado de UMM Electronics. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ fueron leídas con el mismo reflectómetro, y también con un lector de Raman de investigación integrado de BD (última fila de la tabla). El lector de investigación de Raman utilizó un láser de 785 nm para la excitación y un espectrómetro de Investigación Acton (SpectraPro 25000i) y un detector CCD (Pixis 400) para detectar la señal Raman.

Tabla 2

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
Directigen™ EZ, lectura visual	45 %	100 %
Directigen™ EZ, lectura en reflectómetro	58 %	95 %
Nanomarcadores Oxonica, lectura en reflectómetro	100 %	100 %
Nanomarcadores Oxonica, lectura Raman	100 %	100 %

30 Como puede verse, se observa una clara ventaja de sensibilidad con las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ en comparación con las partículas Directigen™ EZ, sin pérdida de especificidad.

Ejemplo 4:

35 Este experimento comparó el rendimiento de las nanopartículas de oro recubiertas de sílice, con y sin una molécula de dispersión Raman de superficie potenciada (SERS), en un inmunoensayo de flujo lateral basado en reflectancia.

40 Las nanopartículas de oro Oxonica Nanoplex™ que contienen un marcaje SERS se obtuvieron de Oxonica. Las nanopartículas constan de un núcleo de oro de 60 nm marcadas con 4,4'-dipiridilo y recubiertas con una cubierta de sílice de 35 nm de espesor. El diámetro de las nanopartículas fue de 130 nm. La química de sulfo-SMCC (Pierce # 22622) se utilizó para unir covalentemente anticuerpos anti-gripe A a los grupos tiol de la superficie en las nanopartículas

45 Las nanopartículas de oro diámetro de sesenta nanómetros que carecen de marcador de SERS se adquirieron en BBI. A continuación, las nanopartículas de oro se recubrieron con sílice mediante el siguiente procedimiento. Primero se trataron 10 ml de oro coloidal de 60 nm (BBI, ~ 2.6x10¹⁰ partículas / ml) con 75 µl de una solución 100 µM de 3-mercaptopropil trietoxisilano en etanol. Después de 3 horas, se añadieron 75 µl de una solución acuosa al 2,7 % de silicato de sodio y la reacción se dejó continuar durante 24 horas. En el paso siguiente, a la suspensión se añadieron 40 ml de etanol seguido de 1 ml de amoníaco y 300 µl (solución al 5 % en etanol) de ortosilicato de tetraetilo. La reacción se mantuvo bajo agitación durante 2 días y finalmente se purificó mediante centrifugación repetida. El espesor del recubrimiento de sílice producido en este procedimiento fue 30 nm, para un diámetro total

- de partículas del oro recubierto de sílice de 120 nm. Después se añadieron los grupos tiol a la superficie de las partículas de oro recubiertas de sílice mediante la reacción de una suspensión acuosa de nanopartículas de oro recubiertas de vidrio (10 ml, $\sim 2 \cdot 6 \times 10^{10}$ partículas / ml) con una solución etanólica al 1 % de mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS) durante 24 horas a temperatura ambiente. La cantidad de solución de MPTMS varió de 25 μ l a 100 μ l, para crear diferentes niveles de grupos tiol de superficie activa a niveles de carga aproximados de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 entre sí (por ejemplo, 2,0 es cuatro veces mayor que 0,5) a través de un procedimiento no optimizado. Después de la reacción, las partículas se purificaron mediante centrifugación repetida en agua. La química de sulfo-SMCC (Pierce # 22622) se utilizó para unir covalentemente anticuerpos anti-gripe A a los grupos tiol de la superficie en las nanopartículas.
- El inmunoensayo de flujo lateral se realizó en un formato de tira reactiva del siguiente modo. Se aplicaron anticuerpos de captura de la gripe A a tiras de nitrocelulosa Whatman AE99. Las tiras de nitrocelulosa se sumergieron en soluciones de muestra que contienen nanopartículas, ajustadas a una densidad óptica de 10 y diversas concentraciones del virus de la gripe A H1N1. Se dejó que las soluciones de muestra fueran absorbidas completamente por las tiras de nitrocelulosa. A continuación se añadió un tampón de lavado y también fue absorbida por las tiras de membrana de nitrocelulosa. Después, las tiras se secaron y la reflectancia se leyó usando un reflectómetro Hamamatsu, modelo C10066. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Tipo de nanopartícula	LOD – Lector de reflectancia (unidades de X, medida como LDF)
Marcador de SERS Oxonica Nanoplex™ con molécula indicadora de Raman 4,4',-dipiridilo - duplicado 1	0,0471
Marcador de SERS Oxonica Nanoplex™ con molécula indicadora de Raman 4,4',-dipiridilo - duplicado 2	0,0564
Oro recubierto con sílice sin molécula indicadora de Raman- carga de tiol "0,5"	0,0901
Oro recubierto con sílice sin molécula indicadora de Raman- carga de tiol "1,0"	0,135
Oro recubierto con sílice sin molécula indicadora de Raman- carga de tiol "1,5"	0,1063
Oro recubierto con sílice sin molécula indicadora de Raman- carga de tiol "2,0"	0,062

- Los datos de la Tabla 3 indican que, si están optimizadas, las nanopartículas de oro recubiertas de sílice sin un indicador de SERS funcionan tan bien como las nanopartículas que incluyen un indicador de SERS en un inmunoensayo de flujo lateral cuando se utiliza un lector de reflectómetro. Además, el rendimiento de las partículas de oro recubiertas de sílice puede depender de la extensión de la tiolación.

Ejemplo 5 (no forma parte de la invención):

- Este experimento se diseñó para analizar el funcionamiento de un prototipo de dispositivo de flujo lateral para la detección del virus de la gripe A H1N1 vivo en muestras clínicas utilizando nanopartículas de oro recubiertas de sílice Oxonica Nanoplex™ como indicador. Las partículas Oxonica tenían un diámetro del núcleo de oro de aproximadamente 60 nm, un indicador Raman de 4,4'-dipiridilo y una cubierta de sílice exterior de aproximadamente 35 nm de espesor. El prototipo de dispositivo basado en cartucho usó los mismos anticuerpos de captura y detección que el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B y se usó del mismo modo que el producto comercial.

- El prototipo del dispositivo de ensayo comprendía una tira de refuerzo que soporta una longitud de la membrana de flujo lateral de nitrocelulosa Millipore HF135. Los anticuerpos de captura específicos de la nucleoproteína de la gripe A (Flu A NP) se aplicaron por raspado a lo largo de esta membrana para formar una línea de prueba. Anticuerpo inmunoglobulina anti-especie se aplicó por raspado al lado de la línea de la prueba para formar una línea de control. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ SERS se pulverizaron sobre una almohadilla de conjugado (Arista MAPDS-0399) que se había tratado con una solución al 10 % SEABLOCK (Pierce 37527). Las nanopartículas se conjugaron con un anticuerpo de detección de Flu A NP. La almohadilla de conjugado se adhirió a la tira de respaldo en un extremo de la membrana de flujo lateral. En el extremo opuesto de la membrana de flujo lateral, se fijó una almohadilla de mecha absorbente (Whatman # 470). La tira de ensayo de flujo lateral resultante se montó dentro de un cartucho de poliestireno de dos partes. Este cartucho encerró completamente la tira de ensayo excepto por una

ventana central que revela la zona de prueba y de la línea de control de la membrana LF y un pocillo de aplicación de la muestra se centró bien sobre la almohadilla de conjugado. Este alojamiento del cartucho se usa en el dispositivo de ensayo de flujo lateral BD Directigen™ EZ RSV.

5 De manera similar al Ejemplo 1, las muestras pediátricas de aspirado nasofaríngeo que dieron resultados negativos para el virus de la gripe A se enriquecieron con cantidades conocidas del virus de la gripe A vivo. Las concentraciones finales de virus dentro de las muestras enriquecidas oscilaron de 0,25 x (unidades arbitrarias) hasta 0,0039X mediante dilución en serie por dos. Una muestra enriquecida con medio de dilución libre de virus ("0X") se incluyó como control. Después de la adición del virus vivo, la serie de muestras se procesó usando el protocolo de preparación de muestras BD Directigen™ EZ Flu A +. Brevemente, una cantidad de la muestra enriquecida con gripe A se mezcló con reactivo de extracción en un tubo de muestra flexible. La muestra extraída se expresó después desde el tubo a través de una punta de filtración de fibra de vidrio y se recogió. Cada muestra se analizó por triplicado mediante la aplicación de 100 µl al pocillo de muestra de cada uno de tres prototipos del dispositivo de ensayo.

15 Cada dispositivo fabricado con las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ SERS se leyó usando un reflectómetro Hamamatsu (modelo C10066) tanto a 15 minutos como a 30 minutos después de la aplicación de la muestra. Después de la lectura de 30 minutos, cada tira de flujo lateral se extrajo de su cartucho, se retiró el conjugado y las almohadillas de absorción y se secó a temperatura ambiente y la humedad durante al menos 1 hora. Cada tira se leyó de nuevo con un reflectómetro después del secado. Una curva de dosis-respuesta se representó gráficamente utilizando los datos de cada tiempo de lectura y después se usó para calcular la sensibilidad de cada tiempo de lectura en términos de concentración mínima detectable (la concentración más baja para la cual la señal media es igual al intervalo de confianza superior del blanco; CMD) y el límite de detección fiable (LDF). Estos resultados se muestran en la Tabla 4. En la Tabla 4 también se muestra la mejora de sensibilidad obtenida usando las partículas Oxonica en comparación con la sensibilidad de Directigen™ EZ. Directigen™ EZ EZ utiliza coloides de oro de 40 nm de diámetro sin un recubrimiento de sílice.

25 **Tabla 4.** Sensibilidad de un sistema de prueba de flujo lateral basado en cartucho empleando nanopartículas Oxonica activas en SERS y detección mediante reflectometría

Estado del dispositivo y tiempo de lectura	Límite de detección [†] de la gripe A mediante lectura con reflectómetro (partículas Oxonica)		Mejora del LDF frente a un dispositivo para la gripe A Directigen™ EZ leído con un reflectómetro
	CMD (X)	LDF (X)	
Húmedo a los 15 minutos	0,0341	0,0666	3,0 veces
Húmedo a los 30 minutos	0,0131	0,0264	7,6 veces
Seco tras 30 minutos	0,0130	0,0242	8,3 veces

[†] Expresado como concentración mínima detectable (CMD) y el límite de detección fiable (LDF)

30 El límite de detección (LDF) para el dispositivo actual Directigen™ EZ Flu A es de aproximadamente 0,5 veces la concentración del virus de la gripe A mediante lectura visual y aproximadamente 0,2 veces mediante lectura en reflectómetro. Como se muestra en la Tabla 4, el dispositivo de ensayo basado en cartuchos que usa nanopartículas indicadoras Oxonica Nanoplex™ proporciona un aumento notable de la sensibilidad con relación al dispositivo actual Directigen™ EZ Flu A.

Ejemplo 6 (no forma parte de la invención):

35 En este ejemplo, la sensibilidad analítica de un prototipo de prueba de flujo lateral de la gripe A usando nanopartículas de oro recubiertas de sílice Oxonica Nanoplex™ se comparó con la sensibilidad analítica del producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B leída con un reflectómetro. Las partículas Oxonica tenían un diámetro del núcleo de oro de aproximadamente 60 nm, la molécula indicadora Raman 4,4'-dipiridilo unida a la superficie de oro y un grosor de la cubierta de sílice de aproximadamente 35 nm. En este ejemplo, se estimó que la cantidad de nanopartículas SERS por dispositivo de flujo lateral era ligeramente menor que la cantidad de partículas de oro coloidal en el producto comercial. Los anticuerpos de captura y de detección fueron los mismos tanto para el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A + B y el dispositivo basado en nanopartículas-Oxonica Nanoplex™.

45 Como en el Ejemplo 5, las muestras pediátricas de aspirado nasofaríngeo que dieron resultados negativos para el virus de la gripe A se enriquecieron con cantidades conocidas del virus de la gripe A vivo. Los prototipos del dispositivo optimizados se ensamblaron como se describe en el ejemplo 5 y la extracción de la muestra se realizó de acuerdo con la ficha de BD Directigen™ EZ Flu A. Todos los dispositivos (prototipos basados en SERS y BD

5 Directigen™ EZ Flu A+B) se leyeron 15 minutos después de la aplicación de la muestra en un reflectómetro Hamamatsu (modelo C10066). La Figura 2 muestra la señal de reflectancia como una función de la concentración de virus vivo para ambos formatos de ensayo y la Tabla 5 muestra la señal obtenida reflectómetro a la concentración más alta del virus de prueba (0,25X) junto con el límite de detección fiable (LDF) para los ensayos. En este experimento, los dispositivos que utilizan nanopartículas SERS dieron una sensibilidad aproximadamente 7 veces mejor y un brillo aproximadamente 8 veces mejor en comparación con BD Directigen™ EZ Flu A + B leído con un reflectómetro.

TABLA 5

	Prototipo (utilizando partículas SERS Nanoplex™)	BD Directigen™ EZ A + B (utilizando coloide de oro)
LDF (unidades arbitrarias)	0,027x	0,185x
Intensidad de la señal de reflectancia en 0,25x (unidades arbitrarias)	0,419	0,054

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

(a) proporcionar un dispositivo de ensayo para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

- 5 (i) un miembro receptor de la muestra;
 (ii) un vehículo en comunicación fluida con el miembro receptor de la muestra;
 (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, el reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, y en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y
 10 (iv) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;
- 15 (b) poner en contacto la muestra líquida con el miembro receptor de la muestra del dispositivo de ensayo;
 (c) dejar que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de la muestra movilice dicho reactivo marcado de tal manera que la muestra líquida y el reactivo marcado se muevan a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección;
 (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.
- 20

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que

- 25 (i) el vehículo comprende nitrocelulosa, plástico o vidrio, preferentemente el vehículo comprende nitrocelulosa; o
 (ii) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, bacteria o;
 (iii) el dispositivo de ensayo comprende además una almohadilla absorbente en comunicación fluida con la zona de detección; o
 (iv) el dispositivo de ensayo comprende además una zona de control en comunicación fluida con la zona de detección; o
 30 (v) la presencia del analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o
 (vi) el dispositivo de ensayo está configurado para detectar múltiples analitos, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

35 3. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

- a) proporcionar un dispositivo de ensayo que comprende: (i) un miembro receptor de la muestra; (ii) un vehículo en comunicación fluida con el miembro receptor de la muestra; y (iii) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;
 40 b) mezclar la muestra líquida con un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman;
 c) poner en contacto la mezcla de b) con el miembro receptor de la muestra del dispositivo de ensayo;
 45 d) dejar que la mezcla de b) aplicada al miembro receptor de la muestra se mueva a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección;
 e) detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.
- 50

4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 3, en el que

- (i) se usa un lector de reflectancia para detectar el reactivo marcado en la zona de detección; o
 (ii) la presencia de analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o
 55 (iii) el procedimiento detecta múltiples analitos en la muestra líquida, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

5. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar un ensayo analítico de flujo pasante para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, comprendiendo dicho kit:

- 5 (i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y
- 10 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman, comprendiendo dicho procedimiento:

- 15 (a) poner en contacto la muestra líquida con la superficie superior de la membrana porosa;
- (b) dejar que la muestra líquida fluya a través de la membrana porosa, de tal manera que al menos una parte del analito, cuando está presente en la muestra líquida, se una al reactivo de unión;
- (c) poner en contacto con el reactivo marcado con la superficie superior de la membrana porosa;
- (d) dejar que el reactivo marcado fluya a través de la membrana porosa, de tal forma que al menos una porción del reactivo marcado se una al analito; y
- 20 (e) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.

6. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar un ensayo analítico de flujo pasante para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, comprendiendo dicho kit:

- 25 (i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y
- 30 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman,

comprendiendo dicho procedimiento:

- 35 (a) mezclar la muestra líquida con el reactivo marcado de tal manera que el analito, cuando está presente en la muestra de líquido, se une al reactivo marcado;
- (b) poner en contacto la mezcla de (A) con la superficie superior de la membrana porosa;
- (c) dejar que la mezcla de (a) fluya a través de la membrana porosa, de tal forma que al menos una porción del analito unido al reactivo marcado se una al reactivo de unión; y
- 40 (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa mediante la medición de la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y el fracaso en la detección de la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.

7. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que

- 45 (i) se usa un lector de reflectancia para detectar el reactivo marcado sobre la membrana porosa; o
- (ii) la presencia de analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o
- (iii) el procedimiento detecta múltiples analitos en la muestra líquida, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de al
- 50 menos dos reactivos marcados diferentes.

8. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que en el kit:

- (i) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, bacteria; o
- 55 (ii) el dispositivo de ensayo comprende además una almohadilla absorbente, en el que la superficie inferior de la membrana porosa y la almohadilla absorbente están en contacto físico y en comunicación fluida, y en el que el reactivo de unión está unido a la superficie superior de la membrana porosa; o
- (iii) el dispositivo de ensayo comprende además un alojamiento para la membrana porosa; o
- (iv) la presencia de analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o

(v) el dispositivo de ensayo está configurado para detectar múltiples analitos, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

5 9. Un sistema que comprende

(I) un dispositivo de ensayo para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

(i) un miembro receptor de la muestra;

(ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de la muestra;

10 (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, el reactivo marcado comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, y en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y

15 (iv) un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo; en el que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de la muestra moviliza el reactivo marcado, de tal manera que la muestra y el reactivo marcado se transportan a lo largo de la longitud del vehículo para pasar a la zona de detección, y en el que la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y

20

(II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de ensayo.

10. El sistema de la reivindicación 9, en el que en el dispositivo de ensayo

(i) el vehículo comprende nitrocelulosa, plástico o vidrio, preferentemente el vehículo comprende nitrocelulosa; o

25 (ii) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, bacteria o;

(iii) el dispositivo de ensayo comprende además una almohadilla absorbente en comunicación de fluido con la zona de detección; o

(iv) el dispositivo de ensayo comprende además una zona de control en comunicación de fluido con la zona de detección; o

30 (v) la presencia del analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o

(vi) el dispositivo de ensayo está configurado para detectar múltiples analitos, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

35 11. Un sistema que comprende

(I) un kit para realizar un ensayo analítico de flujo pasante para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida mediante reflectometría, que comprende:

(i) un dispositivo de ensayo que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de unión eficaz para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y

40 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en un núcleo de oro y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO_2 , o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en el que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman, y

45

(II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de ensayo.

12. El sistema de la reivindicación 11, en el que en el kit

(i) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus, bacteria; o

50 (ii) el dispositivo de ensayo comprende además una almohadilla absorbente, en el que la superficie inferior de la membrana porosa y la almohadilla absorbente están en contacto físico y en comunicación de fluido, y en el que el reactivo de unión está unido a la superficie superior de la membrana porosa; o

(iii) el dispositivo de ensayo comprende además un alojamiento para la membrana porosa; o

(iv) la presencia de analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o

55 (v) el dispositivo de ensayo está configurado para detectar múltiples analitos, preferentemente el dispositivo de ensayo comprende adicionalmente al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para la detección de cada

uno de al menos dos reactivos marcados diferentes.

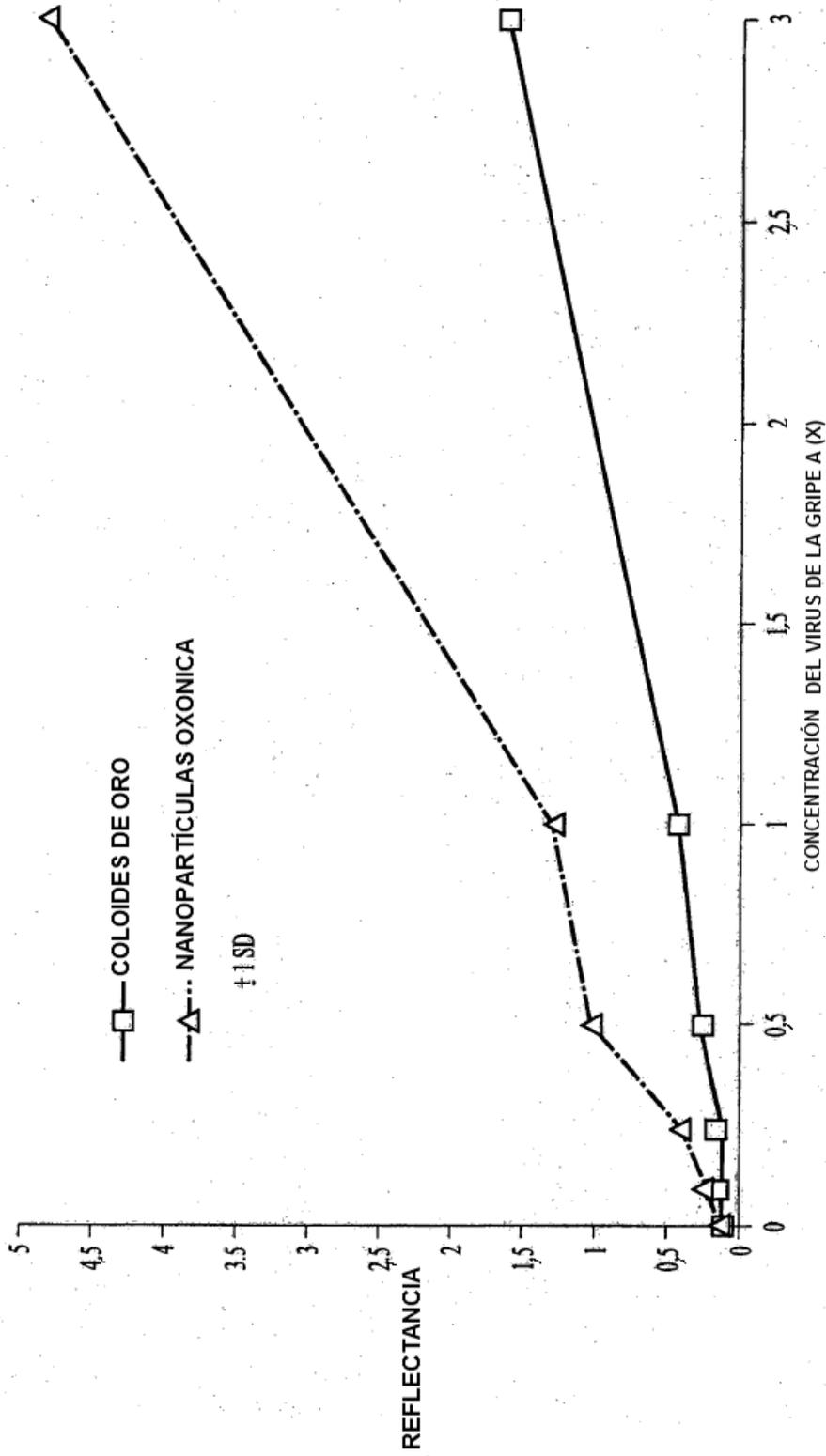


FIG. 1

PROTOTIPO DE DISPOSITIVO DE FLUJO LATERAL PARA GRIPE A
USANDO PARTÍCULAS SERS NANOPLEX™

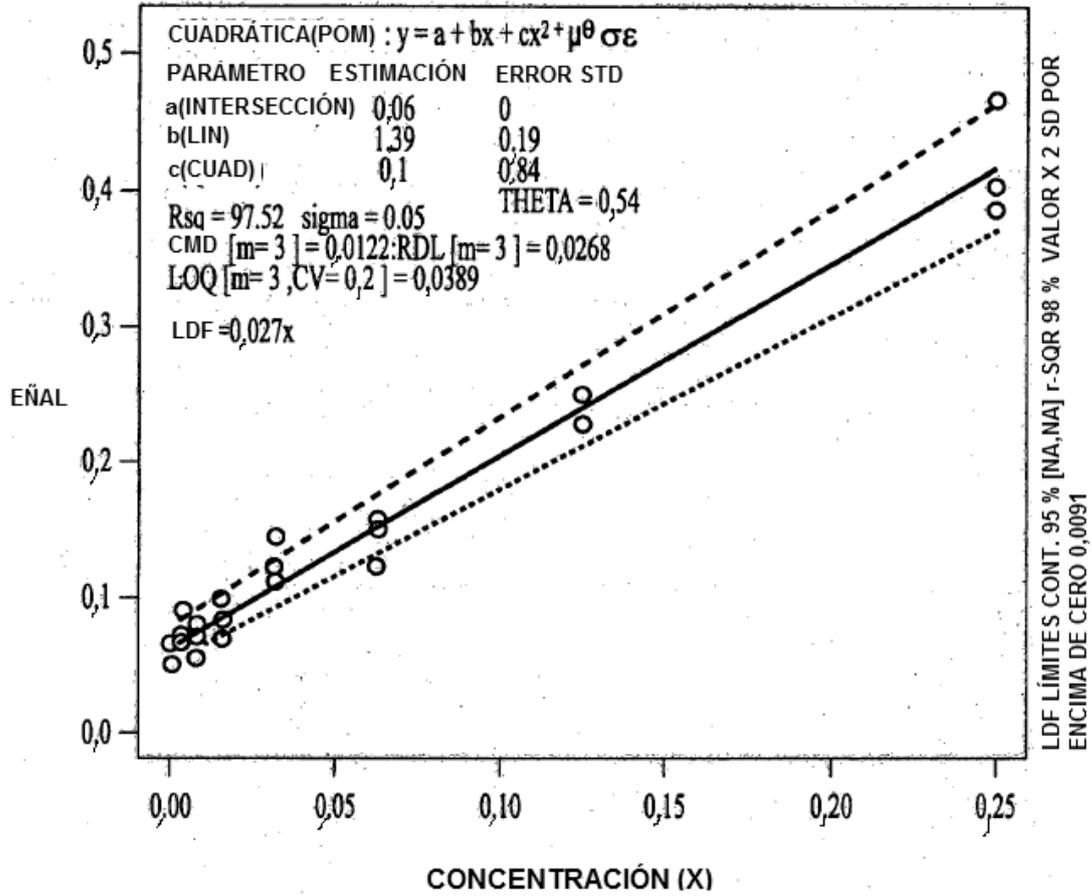


FIG. 2A

DISPOSITIVOS COMERCIALES BD DIRECTIGEN™ EZ A/B
USANDO COLOIDES DE ORO:

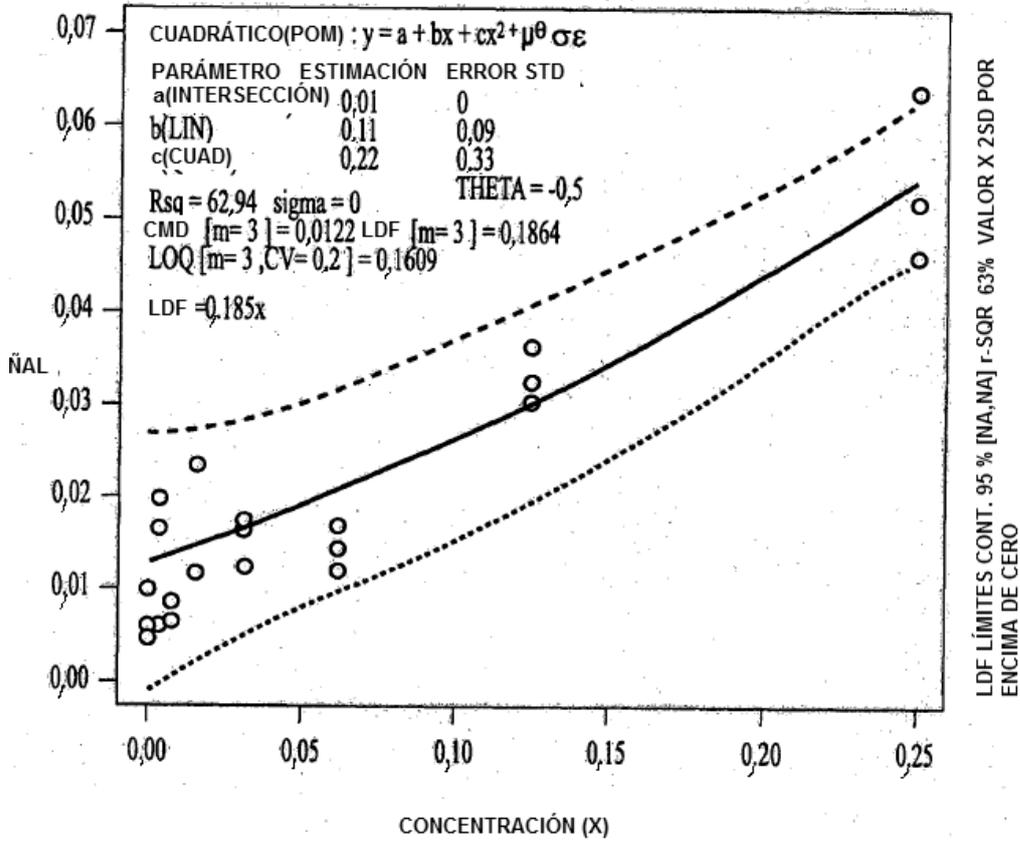


FIG. 2B