

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 553**

51 Int. Cl.:

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01J 3/44 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2000 E 10183847 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2295954**

54 Título: **Nanopartículas compuestas espectroscópicamente activas superficialmente potenciadas**

30 Prioridad:

06.10.1999 US 157931 P

17.03.2000 US 190395 P

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

28.09.2016

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

One Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

NATAN, MICHAEL J

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 584 553 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

Nanopartículas compuestas espectroscópicamente activas superficialmente potenciadas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nanopartículas compuestas espectroscópicamente activas, superficialmente potenciadas, a métodos de fabricación de las partículas y a usos de las partículas (incluyendo su uso como marcadores ópticos, moleculares o celulares). Más particularmente, se refiere al área de marcadores o etiquetas de tamaño submicrométrico que pueden fijarse de forma covalente o no covalente a entidades de interés con propósito de cuantificación, localización, identificación y/o seguimiento.

Antecedentes de la invención

15 Cuando se dirige luz sobre una molécula, la gran mayoría de los fotones incidentes se dispersan elásticamente sin cambiar la frecuencia. Esto se denomina dispersión de Rayleigh. Sin embargo, la energía de algunos de los fotones incidentes (aproximadamente 1 de cada 10^7 fotones incidentes) se acopla en modos vibracionales distintos de los enlaces de la molécula. Dicho acoplamiento provoca que la molécula disperse de forma inelástica parte de la luz incidente con un intervalo de frecuencias que difieren del intervalo de la luz incidente. Esto se denomina efecto Raman. Representado la frecuencia de dicha luz dispersada de forma inelástica frente a su intensidad, se obtiene el único espectro Raman de la molécula que puede observarse. El análisis del espectro Raman de una molécula desconocida puede proporcionar información sobre la composición molecular de la muestra.

20 La iluminación incidente para espectroscopía Raman, normalmente proporcionada por un láser, puede concentrarse a una pequeña mancha si el espectroscopio se construye con la configuración de un microscopio. Como la señal Raman puede escalar linealmente con la potencia láser, la intensidad de la luz en la muestra puede ser muy alta para optimizar la sensibilidad del instrumento. Además, como la respuesta Raman de una molécula ocurre esencialmente instantáneamente (sin ningún estado intermedio altamente energético de larga duración), es imposible el fotoblanqueo de la molécula Raman-activa incluso mediante esta luz de alta intensidad. Esto pone a la espectroscopía Raman en un contraste absoluto con la espectroscopía de fluorescencia, donde el fotoblanqueo limita drásticamente muchas aplicaciones.

35 El efecto Raman puede potenciarse significativamente llevando la molécula o moléculas Raman-activas cerca (≤ 50 Å) de una superficie metálica estructurada ("Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures", T. Vo-Dinh, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 17 (1998), páginas 557 - 582"), este campo decae exponencialmente desde lejos de la superficie. Acercar más las moléculas a las superficies metálicas se consigue típicamente mediante la adsorción de la molécula Raman-activa sobre oro, plata o cobre desbastados adecuadamente u otros metales libres de electrones. La potenciación superficial de la actividad Raman se observa con partículas coloidales metálicas, películas metálicas sobre sustratos dieléctricos y con series de partículas metálicas. El mecanismo mediante el que ocurre esta dispersión Raman potenciada superficialmente (SERS), se entiende, y se cree que es el resultado de una combinación de (i) resonancia de plasmones superficiales en el metal que potencia la intensidad local de la luz; y (ii) formación y transiciones posteriores de complejos de transferencia de carga entre la superficie metálica y la molécula Raman-activa.

45 La SERS permite la detección de moléculas unidas a la superficie de una única nanopartícula de oro o plata. Un metal que potencia Raman que se ha asociado o unido a una molécula o moléculas Raman-activas se denomina nanopartícula SERS-activa. Dichas nanopartículas SERS-activas pueden tener utilidad como marcadores ópticos. Por ejemplo, las nanopartículas SERS-activas pueden usarse en inmunoensayos cuando se conjugan con un anticuerpo contra una molécula diana de interés. Si la diana de interés se inmoviliza sobre un soporte sólido, entonces la interacción entre una única molécula diana y un único anticuerpo unido a nanopartícula puede detectarse buscando el espectro Raman único de la molécula Raman-activa. Adicionalmente, como un único espectro Raman (de 100 a 3500 cm^{-1}) puede detectar muchas moléculas Raman-activas diferentes, las nanopartículas SERS-activas pueden usarse en formatos de ensayo multiplexados.

55 Las nanopartículas SERS-activas ofrecen el potencial para una sensibilidad, estabilidad y funcionalidad multiplexora sin precedentes, cuando se usan como marcadores ópticos en ensayos químicos. Sin embargo, las nanopartículas SERS-activas hechas de metales presentan problemas prácticos formidables cuando se usan en dichos ensayos. Las nanopartículas metálicas son muy sensibles a agregación en solución acuosa; una vez agregadas no es posible volver a dispersarlas. Además, las composiciones químicas de algunas moléculas Raman-activas son incompatibles

con la química usada para unir otras moléculas (tales como proteínas) a nanopartículas metálicas. Esto restringe las elecciones de moléculas Raman-activas, químicas de unión y otras moléculas a unir a la nanopartícula metálica.

5 El problema más significativo del uso de nanopartículas metálicas como marcadores Raman es la similitud de los espectros Raman de las moléculas a acoplar a las nanopartículas. Por ejemplo, en un inmunoensayo intercalado multiplexado, los espectros Raman de los anticuerpos secundarios a los que se unen las nanopartículas serían muy similares y, de esta manera, imposibles de deconvolucionar. Además, las partes de los anticuerpos secundarios que son diferentes, es decir, los dominios de unión al antígeno típicamente están muy lejos de la superficie metálica para poder potenciarse significativamente.

10

La técnica anterior muestra que las propias moléculas pueden usarse como marcadores Raman, con la condición de que su sección transversal de dispersión Raman sea suficientemente grande. De esta manera, la unión directa de colorantes, por ejemplo a anticuerpos, permite poder usarlos como marcadores para inmunoensayos. Este enfoque, sin embargo, sufre limitaciones extremadamente significativas: las estructuras/características moleculares que dan lugar a espectros Raman intensos (por ejemplo, polarizabilidad, aromaticidad, conjugación, heteroátomos y más significativamente, la sección transversal de absorción significativa), también da lugar espectros Raman complejos. El uso de marcadores Raman moleculares requiere extinciones muy altas en la región visible del espectro para acceder a la dispersión Raman por resonancia, lo que aumenta la señal Raman en hasta tres órdenes de magnitud. Hay una incompatibilidad física fundamental entre las moléculas que absorben luz visible bien y aquellas que muestran un espectro Raman simple. De esta manera, los espectros Raman de los colorantes descritos anteriormente son extremadamente complejos y no ha sido posible multiplexar estos ensayos.

Un segundo problema fundamental de los marcadores basadas en Raman es la debilidad de la señal Raman; no es posible detectar moléculas sencillas (o incluso miles de moléculas) mediante Raman sin usar potenciación superficial. Idealmente, es deseable un marcador que presente factores de potenciación asociados a SERS y la capacidad de unir dicho marcador a especies que difunden libremente (lo que claramente no sería posible con superficies SERS-activas).

Es un objeto de esta invención proporcionar una solución a los problemas mencionados anteriormente encontrados cuando se usan entidades de dispersión Raman como etiquetas o marcadores ópticamente dirigibles en ensayos químicos o biomoleculares. Otro objeto más de la invención es proporcionar un panel de al menos 20 nanopartículas SERS-activas diferentes para usar como marcadores ópticos "sin escisión" en síntesis química combinatoria basada en perlas. Otro objeto más de esta invención es describir un sistema de detección óptica para ensayos multiplexados.

35

La presente invención se refiere a nanopartículas compuestas espectroscópicamente activas, superficialmente potenciadas, incluyendo nanopartículas metálicas SERS-activas (SACN), a métodos de fabricación de partículas y a usos de las partículas (incluyendo su uso con marcadores ópticos, moleculares o celulares). Las etiquetas o marcadores de tamaño submicrométrico de la invención pueden fijarse de forma covalente o no covalente a entidades de interés (que pueden variar de tamaño desde moléculas a objetos macroscópicos) con propósito de cuantificación, localización, identificación y/o seguimiento.

Sumario de la invención

45 La presente invención supera los problemas encontrados cuando se usan especies espectroscópicamente activas superficialmente potenciadas (SES-activas), tales como especies de dispersión Raman, como marcador óptico. La invención proporciona nanopartículas compuestas SES-activas, incluyendo nanopartículas metálicas SERS-activas (SACN) como se define en la reivindicación 1. Cada una de dichas nanopartículas comprende una nanopartícula metálica SES-activa, una submonocapa, monocapa o multicapa de especies SES-activas muy próxima a la superficie metálica y una carcasa encapsulante que comprende un polímero, un vidrio o cualquier otro material dieléctrico. Esto sitúa a la molécula SES-activa (denominada alternativamente en este documento "analito"; no confundir con las especies en solución que van a cuantificarse finalmente), en la interfaz entre la nanopartícula metálica y el encapsulante.

55 En realizaciones preferidas, el encapsulante es vidrio. Las nanopartículas cargadas con analito recubiertas con vidrio resultantes (GAN) retienen la actividad de las nanopartículas metálicas SES-activas secuestrando fuertemente esta actividad desde la superficie exterior de la nanopartículas. De esta manera, en el caso de dispersión Raman superficialmente activa (SERS), las GAN resultantes presentan actividad SERS, aunque el analito SERS-activo se localice en la interfaz entre la nanopartícula metálica y el encapsulante.

La molécula de analito puede elegirse para presentar espectros Raman extremadamente sencillos porque no hay necesidad de especies que absorban la luz visible. Esto, a su vez, permite fabricar múltiples partículas GAN, cada una con diferentes moléculas de analito, de manera que los espectros Raman de cada analito pueden distinguirse en una mezcla de diferentes tipos de partículas GAN.

Las GAN se manipulan y almacenan fácilmente. Son también resistentes a agregación, están estabilizadas contra la descomposición del analito en disolvente y aire, son químicamente inertes y pueden centrifugarse y redispersarse sin pérdida de actividad SERS.

Más importante aún, las carcasas de vidrio de las GAN pueden derivatizarse fácilmente mediante técnicas convencionales. Esto permite a las GAN conjugarse con moléculas (incluyendo biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos) o a soportes sólidos sin interferir con la actividad Raman de las GAN. A diferencia de las nanopartículas metálicas, las GAN pueden evaporarse hasta sequedad y después redispersarse completamente en disolvente. Usando las técnicas proporcionadas en este documento, es posible fabricar GAN que puedan detectarse individualmente usando SERS.

Las SACN proporcionadas por la presente invención son nanopartículas identificables únicas. Pueden usarse prácticamente en cualquier situación en la que sea necesario marcar las moléculas u objetos (incluyendo perlas y otros tipos de soporte sólido) con un marcador óptico. Las biomoléculas pueden conjugarse fácilmente al exterior de las SACN por técnicas convencionales, permitiendo de esta manera que las partículas funcionen como marcadores ópticos en ensayos biológicos. Las SACN pueden usarse prácticamente en cualquier ensayo que use un marcador óptico tal como un marcador fluorescente. Sin embargo, como marcadores ópticos las SACN tienen diversas ventajas distinguibles respecto a los marcadores fluorescentes. Estas ventajas incluyen una detección enormemente más sensible, uniformidad química y la resistencia absoluta de la actividad SERS a fotoblanqueo o fotodegradación. Otro beneficio de utilización de SACN como marcador óptico es la facilidad con la que las SACN individuales que tienen diferentes actividades SERS pueden resolverse unas de otras. Al menos veinte SACN diferentes pueden resolverse unas de otras usando un espectroscopio Raman sencillo. Esto permite realizar ensayos multiplexados usando un panel de SACN diferentes, teniendo cada una una actividad SERS única y distinguible.

Además, las SACN pueden servir como nuevos marcadores ópticos "sin escisión" en síntesis química combinatoria basada en perlas. En esta realización, cada etapa sintética en el esquema puede ir acompañada de la conjugación de una única SACN a la perla. El historial de reacción de la perla y, de esta manera, la identidad del compuesto sintetizado, puede determinarse entonces leyendo el espectro SERS de la perla sin requerir primero que las SACN se escindan de la perla.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra microscopios de transmisión electrónica de GAN que comprenden núcleos de Au de 35 nm con vidrio de 40 nm. La figura 1B muestra núcleos de Au de 60 nm con vidrio de 16 nm.

La figura 2 muestra micrografías de transmisión electrónica de Au de 35 nm, GAN de vidrio de 8 nm después de centrifugación a través de una solución de glicerol al 50 %.

La figura 3 demuestra la resistencia al ataque con ácido del núcleo de oro de las partículas GAN con un núcleo de Au de 35 nm y una carcasa de vidrio de 8 nm. El ataque del núcleo de oro da como resultado una disminución de la absorbancia; esto se representa en la figura 3A (se indica el tiempo después de la adición de la solución de ataque). La velocidad de ataque de Au se muestra en la figura 3B como una representación de la absorbancia frente al tiempo en la solución de ataque.

La figura 4 muestra el espectro Raman de las GAN que comprenden un núcleo de Au de 40 nm recubierto con *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE) encapsulado en vidrio de 4 nm. La traza A muestra la señal Raman de BPE característica, la traza B muestra la señal Raman de las mismas partículas sin el analito BPE.

La figura 5 muestra el espectro Raman de una suspensión de GAN que comprende Au de 40 nm recubierto con *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE)/vidrio de 4 nm (traza A); sobrenadante de una primera centrifugación de las GAN (traza B); y sobrenadante de una segunda centrifugación de las GAN (traza C).

La figura 6 ilustra los espectros Raman de las GAN (núcleo de Au de 80 nm/vidrio de 20 nm/2-mercaptopiridina

como analito) y de una solución 50 mM de 2-mercaptopiridina absorbida sobre un sustrato SERS de tres capas convencional.

La figura 7 ilustra los espectros Raman de los siguientes cuatro tipos ("aromas") de partículas GAN: (A) GAN marcadas con furonitrilo; (B) GAN marcadas con furonitrilo (66 %) y ácido cianoacético (33 %); (C) GAN marcadas con furonitrilo (33 %) y ácido cianoacético (66 %); y (D) GAN marcadas con ácido cianoacético.

La figura 8 ilustra los espectros Raman de las GAN (núcleo de Au de 40 nm, vidrio de 4 nm) (a) marcado con *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE-GAN) o (b) marcado con imidazol (IM-GAN) o (c) no marcado.

10

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a nanopartículas compuestas espectroscópicamente activas, superficialmente potenciadas, incluyendo nanopartículas metálicas SERS-activas (SACN). Se incluyen también dentro del alcance de esta invención métodos de fabricación de las partículas como se define en la reivindicación 12, y usos de las partículas (incluyendo su uso como marcadores ópticos moleculares, o celulares) como se define en las reivindicaciones 13 a 17. Los marcadores o etiquetas de tamaño submicrométrico de la invención pueden fijarse de forma covalente o no covalente a entidades de interés (que pueden variar de tamaño desde moléculas hasta objetos macroscópicos) con propósito de cuantificación, localización, identificación y/o seguimiento.

20

Realizaciones preferidas

Las nanopartículas SERS-activas (SACN) están compuestas por una nanopartícula metálica que tiene unida o asociada con su superficie una o más moléculas Raman-activas (denominadas en este documento alternativamente "analitos"). Este complejo de metal potenciador de Raman y analito (denominado nanopartículas metálica SERS-activa) se recubre o encapsula después con un encapsulante. En realizaciones preferidas, el encapsulante es un material de vidrio y la SACN se denomina entonces nanopartícula cargada con analito recubierto con vidrio (GAN).

En las realizaciones preferidas, las SACN se proporcionan mediante el desarrollo o colocación de otra manera de una carcasa de un encapsulante adecuado sobre el núcleo de una nanopartícula metálica SERS-activa. El núcleo de la nanopartícula metálica es como se define en las reivindicaciones 1 a 3, preferiblemente una esfera de oro o plata de 20-200 nm de diámetro. Más preferiblemente, es un esferoide metálico oblató o prolato de los mismos materiales. Para SERS que usan luz incidente roja (~633 nm), la respuesta SERS óptima se obtiene con núcleos de nanopartículas de oro de 63 nm de diámetro. Las nanopartículas metálicas del tamaño deseado pueden desarrollarse como coloides metálicos por numerosas técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se ha descrito la reducción química o fotoquímica de iones metálicos en solución usando cualquier número de agentes reductores. Igualmente la síntesis de nanopartículas se ha realizado en volúmenes restringidos por ejemplo dentro de una vesícula. Las nanopartículas pueden prepararse mediante descarga eléctrica en solución. Se han descrito docenas de métodos diferentes con fechas que datan desde mediados de 1800.

40

Preferiblemente, el encapsulante no altera de forma medible la actividad SERS de la nanopartícula metálica. Sin embargo, las ventajas de la presente invención se consiguen aún incluso si el encapsulante tiene algún efecto medible, con la condición de que no interfiera con la actividad SERS o no añada una complejidad significativa al espectro Raman. Además, el encapsulante debe modificarse fácilmente para unir las moléculas, incluyendo biomoléculas a su superficie exterior. Los encapsulantes adecuados incluyen, pero sin limitación, vidrio, polímeros, metales, óxidos metálicos, (tales como TiO_2 y SnO_2) y sulfuros metálicos. La encapsulación se realiza después o durante la adsorción al núcleo de la nanopartícula del analito Raman-activo que va a proporcionar la actividad SERS de la SACN. De esta manera, el analito Raman-activo es secuestrado del disolvente circundante como un recubrimiento sobre la superficie del núcleo de la nanopartícula metálica. Dicha configuración proporciona al núcleo de la nanopartículas metálica una actividad SERS estable. Un analito Raman puede formar una submonocapa, una monocapa completa o un ensamblaje multicapa sobre la superficie del núcleo de la nanopartícula metálica. Un analito Raman-activo puede comprender una especie única de molécula Raman-activa, o puede ser una mezcla de diferentes moléculas Raman-activas.

En realizaciones especialmente preferidas, el encapsulante es vidrio (por ejemplo, SiO_x). Para encapsular en vidrio, los núcleos de las nanopartículas metálicas se tratan preferiblemente en primer lugar con un cebador de vidrio (es decir, material que puede conducir al crecimiento de un recubrimiento uniforme de vidrio, o puede mejorar la adhesión del recubrimiento de vidrio a la partícula, o ambos). El vidrio crece después sobre la nanopartícula metálica por técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Las SACN resultantes se denominan nanopartículas

cargadas con analito de vidrio (GAN).

Obsérvese que el vidrio y muchos otros materiales contienen grupos funcionales susceptibles de unión molecular, por ejemplo, la inmersión de vidrio en una base permite la unión covalente de triclorosilanos de alquilo o trialcoxisilano de alquilo, con funcionalidad adicional disponible en el extremo del grupo alquilo. De esta manera, las superficies de vidrio pueden modificarse con todas las formas de biomoléculas y super-estructuras biomoleculares incluyendo células, así como óxidos, metales, polímeros, etc. Igualmente, las superficies de vidrio pueden modificarse con capas monomoleculares bien organizadas. Resumiendo, los recubrimientos de vidrio soportan esencialmente todas y cada una de las formas de funcionalización química (derivatización). Esto es igualmente cierto para muchas formas diferentes de encapsulante. La cuestión es que las partículas SACN pueden fijarse a cualquier especie con funcionalidad químicamente reactiva. Todos los grupos funcionales químicos son reactivos en ciertas condiciones. Por lo tanto, no hay limitación a las especies que pueden inmovilizarse sobre la superficie del encapsulante.

El espesor del encapsulante puede variarse fácilmente dependiendo de las propiedades físicas requeridas por el SACN. Por ejemplo, los recubrimientos que son demasiado gruesos - del orden de 1 micrómetro o mayor - pueden impedir obtener espectros Raman intensos. Los recubrimientos demasiado finos pueden conducir a interferencia en el espectro Raman del analito debido a las moléculas que están sobre la superficie del encapsulante. Al mismo tiempo, las propiedades físicas tales como coeficiente de sedimentación, claramente se verán afectadas por el espesor del encapsulante. En general, cuanto más grueso sea el encapsulante, más eficaz será el secuestro del analito o analitos Raman-activos en el núcleo de la nanopartícula metálica del disolvente circundante.

Para las GAN, los espesores de vidrio preferidos varían de 1-40 nm. En algunas realizaciones especialmente preferidas, las GAN comprenden partículas de oro de 60 nm de diámetro encapsuladas por una esfera de vidrio de 66 nm de espesor. Un experto en la técnica consigue fácilmente la optimización de las dimensiones de las SACN. Por consiguiente, puede alterarse la composición de la partícula o su tamaño y forma de acuerdo con la invención, para optimizar la intensidad de la molécula analito Raman usada como marcador. De hecho, se sabe que las nanopartículas de núcleo-carcasa (Au/AuS) soportan SERS y tienen propiedades ópticas muy diferentes comparadas con las nanopartículas metálicas puras. Igualmente, se sabe que las SERS de esferoides prolatos están potenciadas respecto a esferas con el mismo eje mayor. Se sabe también que la potenciación de partícula única es fuertemente dependiente de la longitud de onda. De esta manera, puede afinarse el tamaño de partícula para conseguir una señal máxima para una longitud de onda de excitación dada.

A menudo es deseable separar las SACN verdaderas de las partículas libres de encapsulante que no han nucleado alrededor de una nanopartícula metálica. Dicha separación mejora la actividad SERS de la preparación de nanopartículas porque las partículas de encapsulante libre no son SERS-activas. Por ejemplo las GAN pueden separarse de partículas de vidrio libres por centrifugación de exclusión de tamaños en glicerol al 50 %.

La presente invención contempla específicamente la formación de un panel de al menos 20 SACN diferentes, teniendo cada una un espectro SERS único. Debido a que las bandas Raman de muchas moléculas son extremadamente estrechas (por ejemplo, CN-es menor de 1 nm a FWHM), es posible sintetizar un panel de SACN en el que cada uno contiene un analito Raman que está espaciado 20 números de onda del espectro de su vecino más próximo. Por ejemplo, una partícula GAN con ^{13}CN como analito, puede distinguir fácilmente de una GAN con ^{12}CN como analito y es fácilmente distinguible de una ^{15}CN . De esta manera, es posible formar 540 picos distintos y que pueden resolverse fácilmente en un único espectro Raman a 633 nm de 600 a 3000 cm^{-1} usando un espectrógrafo para difundir los fotones y una cámara CCD como detector. Sin embargo, la práctica de la invención está limitada a la documentación descrita anteriormente: los experimentos Raman con GAN o SACN pueden realizarse con irradiación visible o con IR cercano, usando bandas Raman de 100 cm^{-1} a 5000 cm^{-1} , empleando cualquier forma de monocromador o espectrómetro para resolver espacialmente o temporalmente fotones y cualquier forma de detector de fotones. Esta disposición facilita la síntesis de paneles de al menos 10 SACN resolubles y proporciona un amplio ancho de banda para, literalmente, cientos de paneles de SACN.

Para aumentar adicionalmente la capacidad para distinguir las poblaciones SACN individuales en el panel de la actividad Raman de fondo, la invención contempla el uso de analitos Raman-activos que tienen composiciones isotópicas distintas de las especies abundantes de forma natural. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, ^{13}CN es completamente resoluble respecto a cualquier ^{12}CN natural que pueda estar presente en el fondo. Por supuesto, los especialistas en la técnica reconocerán que las combinaciones de isótopos así como las proporciones de isótopos pueden usarse igualmente eficazmente par identificar SACN únicas.

Aunque la actividad SERS de cada población SACN en el panel es única, las otras propiedades de las SACN se mantienen uniformes a través del panel. Debido a que la actividad SERS de cada SACN es secuestrada del medio circundante por el encapsulante, las poblaciones individuales no tienen requisitos diferentes de disolvente o almacenamiento. También cada SACN tiene la misma carcasa exterior, simplificando la elección de la química para el ataque de moléculas a las SACN o ataque de las SACN a soportes sólidos.

Aunque los ejemplos anteriores se han centrado sobre dispersión Raman, y en particular la dispersión Raman superficialmente potenciada como mecanismo de detección, pueden aplicarse numerosos métodos análogos igualmente bien y se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, podría emplearse un analito excitado por resonancia, realizando de esta manera la técnica de dispersión Raman por resonancia superficialmente potenciada (SERRS). Puede obtenerse ventaja también de los trabajos publicados sobre espectros de absorción de infrarrojos potenciados (SEIRA) de superficies desbastadas a nanoescala. Igualmente, Van Duyne y otros han mostrado que la dispersión hiperRaman superficialmente potenciada (SEHRS) ocurre también en superficies metálicas desbastadas a nanoescala (así como la SEHRRS análogo resonante). Obsérvese que para una molécula dada, con vibraciones $3N-5$ o $3N-6$ únicas, donde N es el número de átomos, todas las vibraciones pueden encontrarse en cualquiera de los espectros Raman, hiperRaman o infrarrojo. De hecho, la identificación de ciertas SACN puede basarse en una combinación de métodos interrogativos ópticos incluyendo SERS, SERRS, SEIRA, SEHRS, y SEHRRS.

Obsérvese también que se sabe que ocurre una cantidad significativa de dispersión de luz (Rayleigh) desde las partículas con dimensiones de al menos $1/10$ la longitud de onda de excitación, creando de esta manera la posibilidad de que la dispersión Rayleigh o hiperRaileigh pueda usarse en la identificación de las SACN. Además, las combinaciones de dispersión elástica (por ejemplo, Rayleigh), dispersión inelástica (por ejemplo, Raman), y absorción (por ejemplo, IR) puede usarse para identificar partículas.

25 *Uso de las SACN*

Las SACN proporcionadas por la presente invención pueden usarse prácticamente en cualquier ensayo en el que se requiera una etiqueta o marcador detectable. En algunas realizaciones, las SACN se usan en ensayos biológicos y químicos como sustitutos de marcadores fluorescentes convencionales. De hecho, las SACN poseen numerosas características que las hacen muy superiores respecto a los marcadores ópticos de la técnica anterior basados en fluoróforos. Por ejemplo, los ensayos que usan detección de fluoróforo, habitualmente se ven obstaculizadas por la presencia de autofluorescencia u otros efectos de fondo. Además, muchos ensayos requieren el uso de numerosos fluoróforos diferentes; diferentes fluoróforos requieren diferentes químicas de unión y tienen diferentes requisitos ambientales y sensitivos. Es particularmente notable la inactivación de la actividad fluorescente que se observa cuando algunos fluoróforos se conjugan con proteínas. Finalmente, la fotodegradación irreversible resultante de la creación de un estado excitado triplete o singlete, seguido de una reacción química no reversible que elimina permanentemente el estado excitado, da lugar a una grave limitación sobre la sensibilidad de detección. En contraste, las SACN no pueden fotoblanquearse o fotodegradarse, tienen propiedades químicas y físicas uniformes, y pueden resolverse fácilmente respecto al fondo. Quizás más importante aún, la detección de SACN es significativamente más sensible que la detección de fluoróforo. De hecho, es posible marcar una única molécula con una única SACN, y después detectar la presencia de esta molécula usando espectroscopía Raman. Dicha resolución sencilla de molécula única no tiene paralelismo en la técnica de detección de fluoróforo.

Un ejemplo de un ensayo biológico en el que las SACN pueden usarse como marcadores ópticos es el inmunoensayo intercalado. En ensayos intercalados, una diana a detectar es capturada por una superficie sólida. Un anticuerpo (u otro ligando) para la misma diana se une a una SACN y después se pone en contacto con el soporte sólido. La presencia de la señal SERS de la SACN en el soporte sólido indica la presencia del antígeno. En general, la SACN puede conjugarse a cualquier molécula que se use para detectar la presencia de una diana específica en un ensayo.

En una realización específicamente contemplada, las SACN se conjugan a moléculas de ácido nucleico. De esta manera, pueden usarse prácticamente en cualquier ensayo conocido en la técnica que detecta secuencias de ácido nucleico específicas usando sondas de ácido nucleico marcadas ópticamente.

Las SACN son especialmente adecuadas para ensayos químicos multiplexados en los que la identidad de las SACN codifica la identidad de la diana del ensayo. Los ensayos multiplexados de la técnica anterior que usan fluoróforos para codificar la identidad diana están sometidos a numerosas restricciones graves impuestas por las propiedades físicas y químicas de los fluoróforos. Específicamente, diferentes fluoróforos tienen diferente excitación máxima, por

lo que no es posible la excitación coincidente de múltiples dianas fluorescentes. Además, la emisión de fluorescencia ocurre en bandas espectrales amplias de manera que las bandas de un fluoróforo a menudo solapan con las de otro. Como resultado, resolver incluso tres actividades de fluorescencia requiere una óptica sofisticada para separar y después detectar las longitudes de onda de emisión individuales. Debido a estos problemas, los ensayos multiplexados que usan fluoróforos dependen de información posicional para revelar la identidad de la diana. A menudo, los ensayos multiplexados con fluoróforos usan un soporte sólido sobre el que los ligandos se disponen en posiciones definidas. La localización de la señal del fluoróforo revela la identidad de la diana; el tamaño de la señal del fluoróforo en esta localización indica la cantidad de diana. Sin embargo, la síntesis de soporte sólido con los reactivos localizados en posiciones específicas es cara y consume tiempo. Hay límites sobre el número de características que pueden definirse sobre una única superficie.

En contraste, las SACN de la presente invención ofrecen una notable diversidad espectral y capacidad de resolución. Como resultado, las SACN pueden usarse en ensayos multiplexados para producir información cuantitativa y cualitativa sin requerir la localización específica de la posición de los reactivos. Cada SACN acoplada al reactivo específico para la diana puede codificar la identidad de esta diana específica y la intensidad de una señal Raman en particular revela la cantidad de diana. Por ejemplo, en los inmunoensayos intercalados descritos anteriormente, la identidad de las dianas capturadas sobre el soporte sólido puede determinarse usando diferentes aromas de SACN para cada diana.

Aunque las SACN son perfectamente adecuadas para usar en aplicaciones de multiplexación, no es necesario usarlas para codificar la identidad de esta manera. Pueden usarse simplemente como sustitutos para fluoróforos en ensayos multiplexados en los que los reactivos se localizan en posiciones específicas sobre soportes sólidos. Cuando se usan de esta manera, ofrecen una detección de diana enormemente más sensible que los fluoróforos.

La citometría de flujo es un ejemplo de un formato de ensayo multiplexado en el que la diversidad y capacidad de resolución de las SACN puede explotarse totalmente. En una realización de esta solicitud, se proporcionan poblaciones de perlas a las que se conjugan anticuerpos primarios contra las dianas a detectar. Las perlas se ponen en contacto con la solución de ensayo que contiene la dianas, y también con un segundo conjunto de anticuerpos contra las dianas. Cada anticuerpo secundario se conjuga con una GAN que codifica la identidad de la diana a la que se unirá. Las perlas se hacen pasar entonces a través de un citómetro de flujo que adquiere el espectro Raman de cada perla. Debido a que el espectrómetro Raman puede muestrear todo el espacio de frecuencia de cada perla, es posible incluso poner muchos anticuerpos primarios diferentes en una sola perla; el espectro Raman de cada perla puede descodificarse para determinar qué SACN está presente y en qué cantidad. Esto a su vez pone de manifiesto cuanto de cada diana se une a una sola perla. Se entenderá que hay muchas variaciones de este esquema básico, incluyendo el uso de reactivos distintos de anticuerpos para unir a las dianas de interés. Por consiguientes las SACN pueden usarse en diferentes variaciones de este esquema en el que es necesario o útil marcar un reactivo.

En las realizaciones preferidas, las SACN se usan como marcadores ópticos para citometría de exploración con láser de microvolumen (MLSC), en lugar de citometría de flujo. La MLSC se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de serie 09/378.259, presentada el 20 de agosto de 1999, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° serie 09/558.094, presentada el 26 de abril del 2000. En una realización del sistema, un microscopio Raman explora un capilar que contiene los reactivos descritos anteriormente para las aplicaciones de citometría de flujo. El microscopio Raman mide el espectro Raman de cada perla en el capilar, obteniendo de esta manera datos cuantitativos para cada diana a detectar. De nuevo es la señal Raman de cada SACN la que codifica la identidad de la diana. No se requieren reactivos específicos de posición.

En otras realizaciones, las SACN se usan como marcadores ópticos en la síntesis química combinatoria basada en soporte sólido ("combi-quim") de bibliotecas de nuevos compuestos. Uno de dichos métodos se conoce como síntesis "cortar y combinar". En este método, una preparación de perlas resinosas adecuadamente derivatizadas se divide aleatoriamente en múltiples poblaciones y cada población se introduce en una mezcla de reacción diferente. Las mezclas de reacción diferentes pueden contener diferentes reactivos o los mismos reactivos aunque en diferentes condiciones de reacción. Después de la reacción, las perlas se lavan, se recombinan y se dividen de nuevo en un conjunto de mezclas de reacción. Debido a la manera aleatoria en la que se distribuyen las perlas, cada perla experimentará un historial de reacción único. El resultado es una biblioteca basada en perlas que comprende todos los compuestos sintetizados usando las diferentes permutaciones de las mezclas de reacción. La biblioteca puede seleccionarse entonces para identificar los compuestos directores con la actividad deseada. Los compuestos directores a su vez pueden analizarse para determinar su composición y estructura. El método combi-quim se ha usado para sintetizar bibliotecas de péptidos, benzodiazepenos y demás.

Si se conoce el historial de reacción de una perla individual, entonces puede determinarse la composición química y estructura del compuesto unido a la misma. Hay diversas maneras conocidas en la técnica para codificar perlas con su historial de reacción. En algunos métodos, cada mezcla de reacción contiene una molécula identificadora que se une a la perla durante la etapa de reacción. Una vez completada la síntesis las moléculas identificadoras pueden escindirse de la perla de interés, y el historial de reacción de la perla puede determinarse detectando las moléculas identificadoras individuales liberadas de la perla. Por ejemplo, los métodos de la técnica anterior han usado oligonucleótidos cortos para codificar historiales de reacción. Estos oligómeros deben escindirse de las perlas, amplificarse y después secuenciarse para descodificar el historial de reacción; este es un proceso que consume tiempo. Debido a que dichas moléculas identificadoras deben escindirse en primer lugar de la perla, es necesario elegir una química en la que (a) escindir el identificador de la perla no modifique o escinda el compuesto director de la perla; y/o (b) escindir el compuesto director de la perla no modifique o escinda la molécula identificadora. Además, la química usada para acoplar el identificador y a menudo la simple presencia de las propias moléculas identificadoras en la superficie de las perlas puede interferir con las reacciones combi-químicas reales. Dichas consideraciones ponen muchas restricciones a todos los aspectos de la química usada en la síntesis combi-química codificada.

Las SACN proporcionadas por la presente invención pueden usarse para codificar el historial de reacción de las perlas en dichos esquemas combinatorios. Cada mezcla de reacción puede contener una especie única de SACN de manera que cada etapa de reacción va acompañada de por la unión de numerosas SACN a la perla tras lo cual tiene lugar la síntesis combinatoria. Por ejemplo, la mezcla de reacción A puede codificarse por SACN¹ cuando se usa en la etapa 1 del esquema de síntesis y por SACN² cuando se usa en la etapa 2 del esquema de síntesis, y así sucesivamente hasta SACNⁿ cuando se usa en la etapa n del esquema de síntesis. Al final del esquema de síntesis, las perlas individuales pueden explorarse para la actividad del compuesto director deseada. Las perlas con actividad deseada del compuesto director se examinan entonces por espectroscopía Raman. El espectro Raman de cada perla se descodifica automáticamente para detectar las especies individuales de las SACN que se han unido a cada perla. Esta información pone de manifiesto el historial de reacción de la perla y, de esta manera, la estructura del compuesto director.

El uso de las SACN para codificar esquemas de síntesis combi-químicas es un avance significativo respecto a la técnica anterior. Todo el historial de reacción de una perla puede determinarse tomando una única medida espectral sin requerir que la perla experimente ninguna manipulación física o química. De hecho, el espectro Raman puede obtenerse incluso en pocillos de microtitulación. Debido a que la actividad Raman de las SACN puede medirse sin escindir las de la perla, las restricciones de la elección de la química descritas anteriormente se reducen en gran medida. De forma similar, la única agrupación química que las SACN exponen en la superficie de las perlas son los grupos de derivatización que unen la SACN a la perla y el encapsulante estable. De nuevo, esto reduce en gran medida los problemas de interferencia de la molécula identificadora con la síntesis combi-química. Finalmente, la diversidad espectral sin precedentes ofrecida por las SACN permite la robusta codificación de esquemas combi-químicos que son mucho más complejos que los permitidos por los métodos de codificación de la técnica anterior.

Ejemplos

Ejemplo 1

45 *Síntesis de nanopartículas cargadas con analitos de vidrio (GAN)*

Materiales: el agua usada para todas las preparaciones era de 18,2 MΩ, destilada a través de un sistema nanopuro Barnstead. Un tubo de diálisis de piel de serpiente, 3.500 MWCO, se adquirió en Pierce. 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS), y 3-mercaptopropilmetildimetoxisilano (MPMDMS) se obtuvieron de United Chemical. HAuCl₄·3H₂O, citrato trisódico dihidrato, hidróxido sódico, trans-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE), piridina, 2-mercaptopiridina, silicato sódico, ortosilicato de tetraetilo (TEOS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. BPE se recristalizó varias veces antes de su uso. La resina de intercambio de cationes Dowex (malla 16-40) se obtuvo de J.T. Baker. El alcohol etílico puro (EtOH) se adquirió de Pharmco.

55 *Preparación de coloide:* Au coloidal de 12 nm (casi esférico, con una desviación típica menor de 2 nm), se preparó a partir de HAuCl₄·3H₂O reducido por citrato como se describe en Grabar y col., *Analytical Chemistry* 67: 735-743 (1995). El coloide >12 nm se preparó de la siguiente manera: se añadieron 3 ml de HAuCl₄ 12 mM por cada 97 ml de H₂O. La solución se llevó entonces a ebullición con agitación vigorosa y 1 ml de coloide de Au 12 nm como semilla y se añadieron 0,5 ml de citrato sódico al 1% por 100 ml de HAuCl₄ en solución y se hirvió durante 10 minutos. El

tamaño de las partículas resultantes se determinó por microscopía de transmisión electrónica usando software de imágenes Gatan o NIH. Finalmente los iones citrato que rodeaban al coloide de Au se retiraron con diálisis, 7 intercambios de al menos 4 horas cada uno.

5 *Preparación de las GAN:* todas las reacciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de plástico. Podía usarse cualquier cantidad de coloide en una preparación y los reactantes posteriores se añadieron en cantidades apropiadas basadas en el área superficial y concentración del coloide de Au.

Un experimento típico usaba 25 ml de coloide de Au 0,17 nM de 0,50 nm dializado. El pH del coloide se ajustó de 5 a 7 con la adición de 50 μ l de NaOH 0,1 M. El coloide se hizo vitreófilo con adición de 125 μ l de MPTMS 0,5 mM (o APTMS, o MPMDMS). Después de 15 minutos de agitación magnética, se añadieron 167 μ l de una solución 0,5 mM del marcador Raman (BPE, piridina, o 2-mercaptopiridina). Después de otro periodo de 15 minutos de agitación, se preparó una solución al 0,54% de sílice activa mezclando 1 g de silicato sódico con 50 ml de NaOH 3 M y disminuyendo el pH a 10 con una resina de intercambio de cationes. Se añadió un ml de la sílice activa y la solución resultante tenía un pH de aproximadamente 9. La solución permaneció en agitación durante 15 minutos y después se dejó reposar.

Después de un periodo de 24 horas, se añadieron 100 ml de EtOH a la solución para proceder con el crecimiento de la sílice mediante el método descrito en Stöber y col., J. colloid interface Sci. 26: 62 (1968). El crecimiento de ~4 nm de carcasa de vidrio adicional se consiguió con adición de 15 μ l de TEOS y 125 μ l de amoníaco. La reacción se agitó durante 15 minutos y después se dejó reposar durante al menos 12 horas. La adición de TEOS y amoníaco continuó hasta que se obtuvo el espesor de carcasa deseado.

Ejemplo 2

25

Microscopía de transmisión electrónica de las GAN

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) se tomaron de las preparaciones de las GAN; estas imágenes TEM ilustran la uniformidad de las preparaciones de GAN. La figura 1A muestra GAN que comprenden núcleos de Au de 35 nm con vidrio de 40 nm. La figura 1B muestra núcleos de Au de 60 nm con vidrio de 16 nm. La figura 2 ilustra Au de 35 nm, GAN de vidrio de 8 nm después de la centrifugación a través de una solución de glicerol al 50 %.

Ejemplo 3

35

Demostración del secuestro del núcleo metálico desde el disolvente

Para las GAN que funcionan en diversos entornos químicos, es necesario que el analito Raman-activo sea secuestrado del disolvente circundante. Para demostrar este secuestro pueden observarse las velocidades de difusión a través de la red de vidrio. Esto se realiza controlando la velocidad a que el agua regia (3 HCl:1 HNO₃) puede atacar el núcleo de Au de una GAN. La figura 3 demuestra uno de dichos experimentos para un lote de partículas GAN con un núcleo de Au de 35 nm y carcasas de vidrio de 8 nm. Para 500 μ l de GAN \approx 0,17 nM se añadieron 200 μ l de una solución de ataque (50 μ l de HNO₃ y 150 μ l de HCl). La absorbancia de la solución se midió ($\lambda_{\text{máx}}$ 546 nm) en diversos momentos después de la adición de la solución de ataque. El ataque del núcleo de oro da como resultado una disminución en la absorbancia; esto se representa en la figura 3A (se indica el tiempo después de la adición de la solución de ataque). La velocidad de ataque de Au se muestra en la figura 3B como una representación de la absorbancia frente al tiempo en la solución de ataque (derecha). Estudios adicionales realizados por los inventores han demostrado que el ataque de un núcleo de Au por agua regia no ocurre con una carcasa de vidrio de 20 nm en un periodo de tiempo de 4 horas.

50

Ejemplo 4

Espectros SERS de partículas GAN

55 Las GAN que comprenden un núcleo de Au de 40 nm recubierto con *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE) encapsulado en 4 nm de vidrio se sintetizaron y examinaron por espectroscopía Raman. En la figura 4 se representa el espectro Raman obtenido usando 20 mW a 632,8 nm de excitación con una lente de 3 mm y 30 segundos de integración. La traza A del gráfico muestra la señal Raman de BPE característica; la traza B muestra la señal Raman de las mismas partículas sin el analito BPE. Puede observarse que las GAN sin el analito BPE no da esencialmente una señal

Raman.

Ejemplo 5

5 Confinamiento del analito Raman-activo en el núcleo metálico de las GAN por encapsulación con vidrio

La figura 5 muestra el espectro Raman de una suspensión de GAN que comprende Au de 40 nm recubierto con *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE)/vidrio de 4 nm (traza A); sobrenadante de una primera centrifugación de las GAN (traza B); y sobrenadante de una segunda centrifugación de las GAN (traza C). Puede observarse que la señal de BPE no deja las GAN durante cada etapa de centrifugación, lo que indica que el BPE se ha adherido al núcleo de Au y está secuestrado fuertemente allí por la encapsulación de vidrio.

Ejemplo 6

15 Comparación de los espectros SERS de analitos Raman-activos de las GAN con otros sustratos SERS

Las GAN (núcleo de Au 80 nm/vidrio 20nm) que contenían 2-mercaptopiridina como analito Raman-activo se analizaron por espectroscopía Raman usando 25 mW de excitación a 632, 8 nm, con una lente de 3 mm y 60 segundos de integración. El espectro Raman de la preparación de GAN se compara entonces con el espectro Raman obtenido cuando una solución 50 mM de 2-mercaptopiridina se absorbe sobre un sustrato SERS de 3 capas convencional (25 mW excitación 632, 8 nm, lente 3 mm, integración 30 segundos). La figura 6 muestra los dos espectros Raman. Puede observarse que los dos espectros tienen características e intensidades idénticas, lo que ilustra que las GAN son sustratos SERS eficaces.

25 Ejemplo 7

Espectros SERS de las GAN con mezclas de analitos Raman-activos.

Los espectros SERS de los siguientes cuatro aromas de partículas GAN se obtuvieron usando 26 mW a una excitación de 632, 8 nm, una lente de 3 mm, e integración de 30 segundos: (A) GAN marcadas con furonitrilo; (B) GAN marcadas con furonitrilo (66 %) y ácido cianoacético (33 %); (C) GAN marcadas con furonitrilo (33 %) y ácido cianoacético (66 %); y (D) GAN marcadas con ácido cianoacético. Los porcentajes indicados son las concentraciones relativas de cada compuesto en la solución de marcado añadida. La figura 7 muestra que el furonitrilo y el ácido cianoacético tienen una intensidad de señal relativamente igual y tienen perfiles espectrales similares. El hecho de que los espectros de B y C sean muy similares al espectro de D indica que el ácido cianoacético tiene una mejor afinidad por la nanopartícula de Au que el furonitrilo.

Ejemplo 8

40 Espectros SER de GAN marcadas con imidazol (IM) y *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE)

Las GAN (núcleo de Au 40 nm/vidrio 4 nm) se marcaron con (a) *trans*-4,4'-bis(piridil)etilen (BPE-GAN) o (b) imidazol (IM-GAN). Los espectros SERS de estos analitos Raman-activos se muestran en la figura 8 junto con los espectros SER de las GAN no marcadas (c) de las mismas dimensiones. BPE-GAN e IM-GAN muestran ambas las bandas Raman características de los analitos Raman-activos respectivos; las GAN no marcadas no muestran estas bandas.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula que comprende una nanopartícula de metal que tiene unido a ésta un analito de espectroscopía potenciada superficial (analito SES-activo, **caracterizado por que** la nanopartícula metálica y el analito (SES)-activo unido a ésta están rodeados por un encapsulante, y **por que** dicha nanopartícula metálica está compuesta por un metal seleccionado de entre el grupo que consiste en Au, Ag, Cu, Na, Al y Cr.
2. La partícula de la reivindicación 1, en la que dicha nanopartícula metálica comprende una aleación de al menos dos metales seleccionados de entre el grupo que consiste en Au, Ag, Cu, Na, Al y Cr.
3. La partícula de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha nanopartícula metálica es un núcleo revestido con al menos una cubierta metálica, y en la que dicho núcleo y al menos una de dichas cubiertas metálicas están compuestos por un metal seleccionado de entre el grupo que consiste en Au, Ag, Cu, Na, Al y Cr.
4. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha nanopartícula metálica es menor de 200 nm de diámetro, y tiene preferiblemente un diámetro de 40-100 nm.
5. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho encapsulante tiene un espesor de 1-40 nm, y tiene preferiblemente un espesor de 3-10 nm.
6. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho analito SES-activo forma una submonocapa, una monocapa o un revestimiento multicapa sobre dicha nanopartícula metálica, preferiblemente en la que dicho analito SES-activo se selecciona de entre el grupo que consiste en una especie inorgánica, una especie orgánica, una mezcla de especies orgánicas, una mezcla de especies inorgánicas, o una mezcla de especies orgánicas e inorgánicas, un complejo no covalente de especies orgánicas, un complejo no covalente de especies inorgánicas, y un complejo no covalente entre una especie orgánica y una especie inorgánica, o se selecciona de entre el grupo que consiste en especies cargadas positivamente, especies cargadas neutras, y especies cargadas negativamente.
7. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho analito SES-activo tiene una composición isotópica distinta de una especie abundante en la naturaleza.
8. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho encapsulante se selecciona de entre el grupo que consiste en vidrio, polímeros, metales, óxidos metálicos, y sulfuros metálicos, en la que opcionalmente dicho encapsulante comprende al menos dos materiales seleccionados de entre el grupo que consiste en vidrios, polímeros, metales, óxidos metálicos y sulfuros metálicos.
9. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho encapsulante es óxido de vidrio (SiO_x), en la que preferiblemente la nanopartícula metálica que tiene unida a ésta un analito SES-activo está rodeada por una red de óxido de vidrio (SiO_x).
10. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el analito SES-activo es detectable, identificable o cuantificable por un método seleccionado de entre el grupo: SERS, SERRS, SEHRS, SEHRRS o SEIRA.
11. La partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho encapsulante comprende un polímero, preferiblemente un polímero que no interfiere con la actividad SERS.
12. Un método para fabricar las partículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
- Unir un analito SES-activo a una nanopartícula metálica; y
 - revestir dicha nanopartícula metálica unida a analito con un encapsulante.
13. Un método para marcar ópticamente una molécula, célula, perla o soporte sólido que comprende unir la partícula como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 a dicha molécula, célula, perla o soporte sólido, en el que opcionalmente dicha molécula es una biomolécula, preferiblemente un ácido nucleico o una proteína.

14. Un método para realizar un ensayo que comprende: usar una partícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para señalar el resultado del ensayo; y medir el espectro SES de dicho ensayo para determinar la presencia de dicha partícula, opcionalmente en el que el método comprende usar un panel de diferentes partículas que tiene un único espectro SERS en un ensayo multiplexado.
15. Un método para codificar el historial de reacción de un soporte sólido, comprendiendo dicho método las etapas de (a) hacer reaccionar dicho soporte sólido con un primer reactivo en una primera condición de reacción; (b) unir al soporte una primera especie de partículas que comprende una nanopartícula metálica que tiene unida a ésta un primer analito SES-activo y está rodeada por un encapsulante como se ha definido en la reivindicación 1, en el que dicha primera especie de partículas codifica el primer reactivo o primera condición de reacción; (c) hacer reaccionar el soporte con un segundo reactivo en una condición de reacción; y (d) unir al soporte una segunda especie de partículas que comprende una nanopartícula metálica que tiene unida a ésta un segundo analito SES-activo y está rodeada por un encapsulante como se ha definido en la reivindicación 1, codificando dicha segunda especie de partícula el segundo reactivo o segunda condición de reacción, teniendo dicha segunda especie de partícula un espectro diferente de dicha primera especie de partícula; en el que un compuesto se sintetiza en dicho soporte sólido por un proceso que comprende la etapa (a) y la etapa (c), y en el que el historial de reacción codificada de dicho soporte sólido se decodifica analizando dicho soporte sólido por SES.
- 20 16. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que el método o métodos de detección, identificación o cuantificación para el analito SES-activo se escoge de entre el grupo: SERS, SERRS, SEHRS, SEHRRS o SEIRA.
17. Uso de una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 como un marcador óptico en un inmunoensayo tipo sandwich, en un ensayo multiplexado, para citometría de exploración con láser de microvolumen, o síntesis química combinatoria basada en soporte sólido de bibliotecas de nuevos compuestos.
- 25

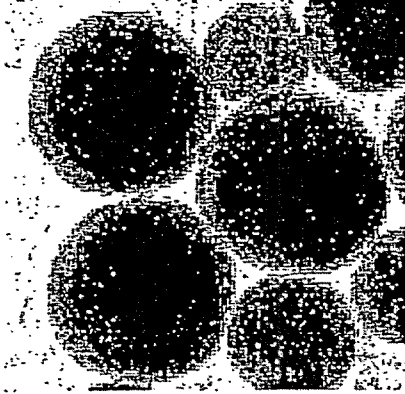


Fig. 1A

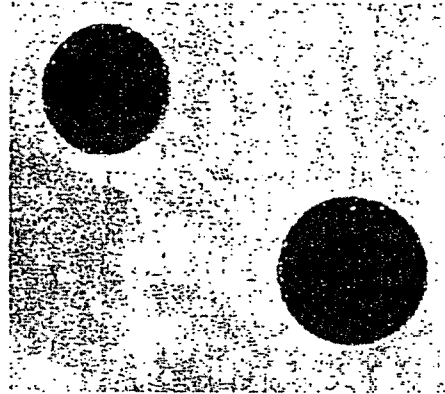


Fig. 1B

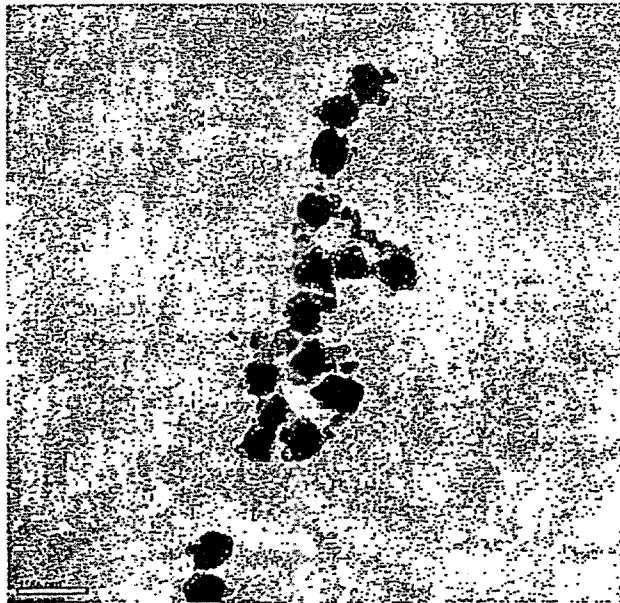


Fig. 2

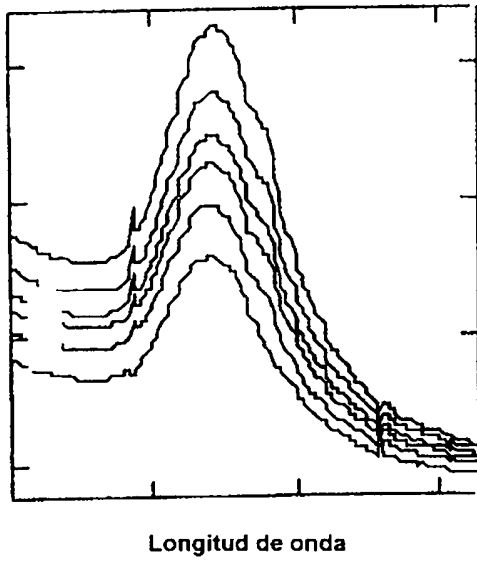


Fig. 3A

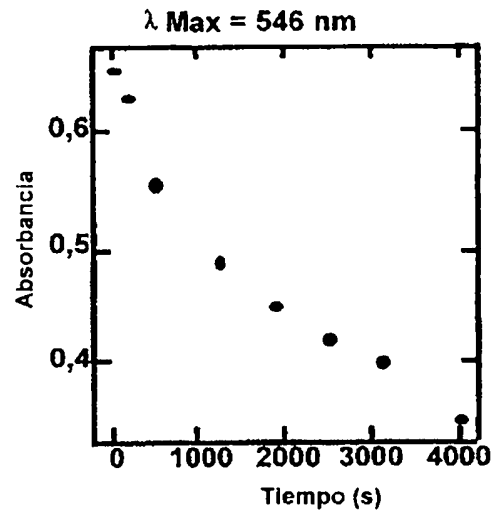


Fig. 3B

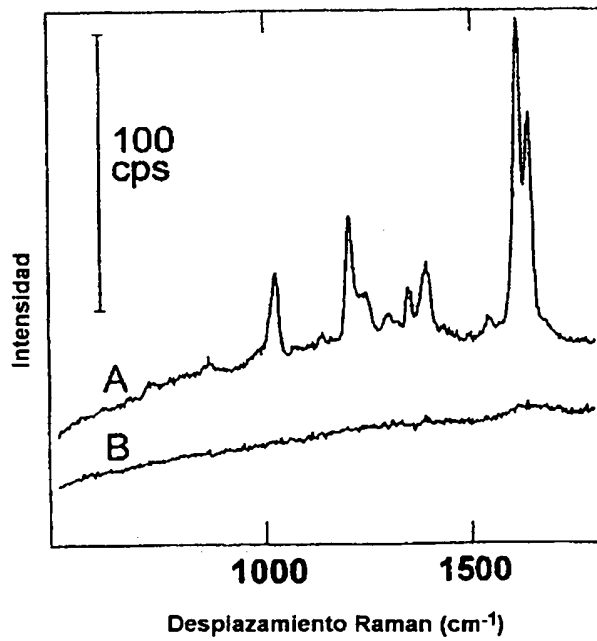


Fig. 4

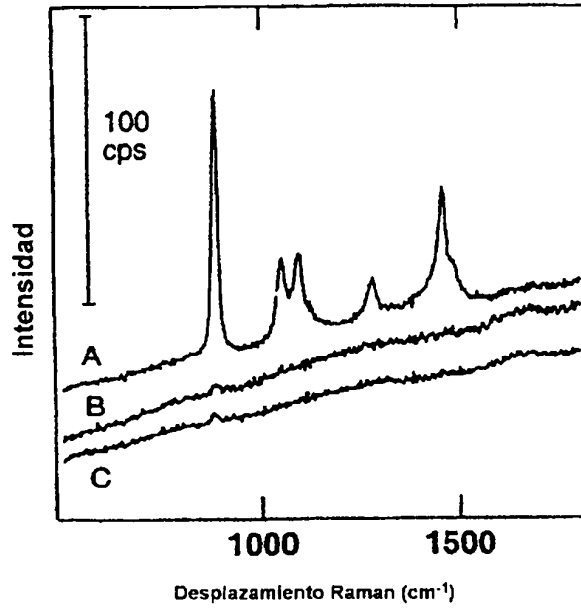


Fig. 5

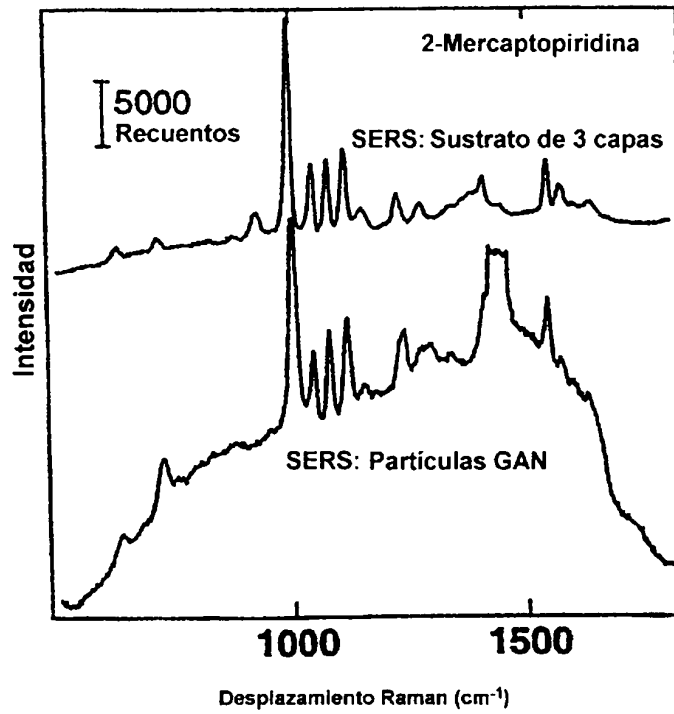


Fig. 6

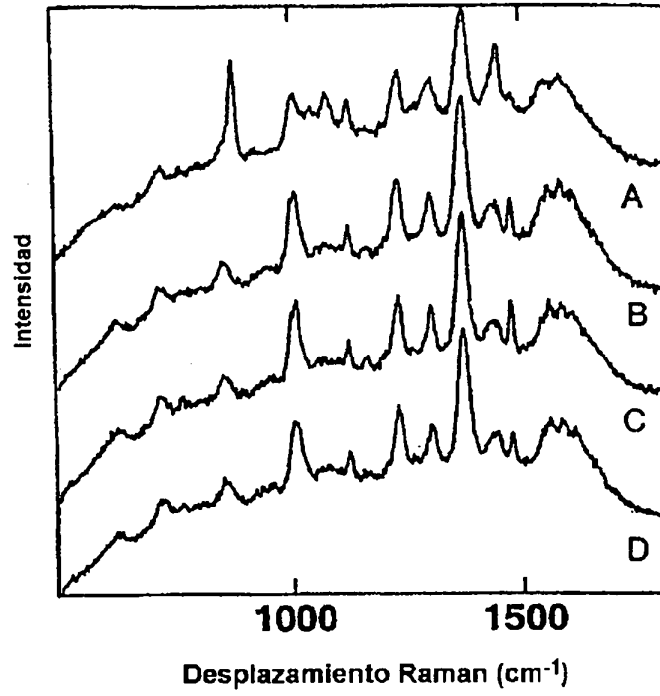


Fig. 7

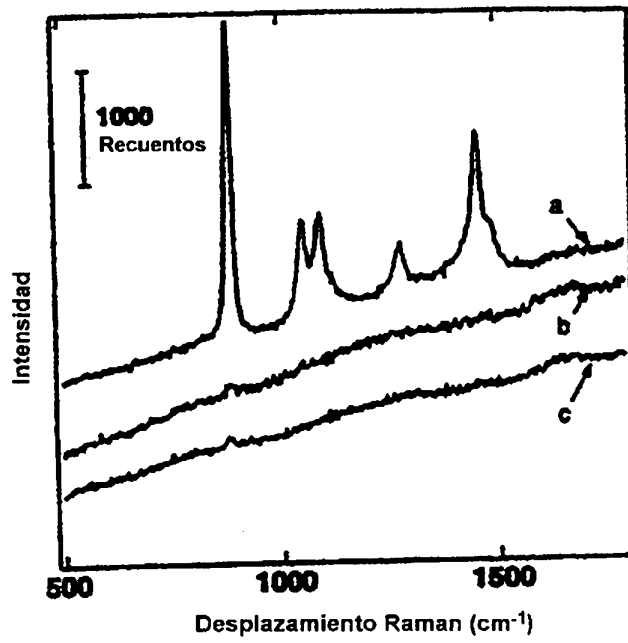


Fig. 8