

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 190**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 15172303 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2952897**

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

30 Prioridad:

**09.04.2008 US 71035 P**

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

**27.07.2017**

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
1 Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417, 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 2 627 190 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 utilizando 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 recubierta no necesita, pero opcionalmente puede incluir una molécula activa en Raman. Las nanopartículas recubiertas aquí descritas son útiles en dispositivos de prueba y procedimientos de determinación cuantitativa y/o cualitativa de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida.

**Antecedentes**

- 10 La tecnología de inmunoensayo proporciona un medio simple y relativamente rápido para determinar la presencia o ausencia de analitos en muestras biológicas. La información proporcionada por las pruebas de diagnóstico por inmunoensayo es a menudo crítica para el cuidado de pacientes. Los ensayos se realizan típicamente para detectar cualitativa o cuantitativamente la presencia de analitos particulares, por ejemplo, anticuerpos que están presentes cuando un sujeto humano tiene una enfermedad o condición particular. Los inmunoensayos practicados en la  
15 técnica son numerosos, e incluyen ensayos para enfermedades, tales como infecciones causadas por bacterias o virus, o condiciones, tales como embarazo.

- En la técnica se conocen diversos 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 realizar la detección del analito. En lugar de arrastrar la muestra a través del vehículo perpendicularmente, como en el caso de un ensayo de "flujo continuo", se permite que la muestra fluya lateralmente a lo largo del vehículo por fuerzas capilares y otras desde una zona de aplicación a una zona de reacción en la superficie. En un ensayo de flujo lateral, los anticuerpos de captura son dispuestos en bandas sobre el vehículo sólido. Los anticuerpos de detección se conjugan a una molécula de detección, que proporciona una señal que es detectable. Se pone una muestra líquida en contacto con los anticuerpos de detección y se deja que la mezcla de muestra/ anticuerpo de detección fluya a lo largo del vehículo sólido. Si el analito está presente, se forma un complejo "en sándwich" en la posición sobre el vehículo sólido donde se han dispuesto en banda los anticuerpos de captura. La señal de la molécula de detección localizada en la línea de captura se detecta entonces, visualmente o con un instrumento. Puede configurarse un ensayo de flujo lateral para detectar proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos, células, moléculas pequeñas u otros analitos de interés.

- 30 Otro formato de inmunoensayo es un inmunoensayo de flujo continuo. Un inmunoensayo de flujo continuo usa generalmente un material poroso con una matriz que contiene reactivo en capas o incorporado en el mismo. La muestra de prueba se aplica a, y fluye a través del material poroso, y el analito en la muestra reacciona con el reactivo o los reactivos para producir una señal detectable sobre el material poroso. Estos dispositivos están generalmente encerrados en un bastidor o cubierta de plástico con calibraciones para ayudar en la detección del analito particular.

- Se conocen en la técnica muchos ejemplos de diferentes tipos de moléculas de detección útiles en inmunoensayos de flujo lateral, tales como fluoróforos, coloides de oro, partículas de látex marcadas y nanopartículas tales como una nanopartícula de dispersión Raman ("SERS"). Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5,591,645 describe el uso de moléculas visibles de "trazador", tales como oro coloidal, que se pueden ver sin el uso de instrumentación. Además, la Patente de Estados Unidos Nº 6,514,767 de Natan describe nanopartículas compuestas activas con 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. La Patente de Estados Unidos Nº 5,714,389 describe procedimientos de inmunoensayo de flujo lateral y dispositivos de prueba usando una partícula coloreada que puede ser un coloide metálico, preferiblemente oro. De forma similar, la Patente de Estados Unidos Nº 7,109,042 describe dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral que utilizan marcadores directos, tales como soles de oro y soles de colorantes, que permiten la producción de un resultado analítico instantáneo sin la necesidad de añadir reactivos adicionales para desarrollar una señal detectable. El documento WO2007/090058 describe inmunoensayos de flujo lateral utilizando partículas de metal encapsuladas, en particular nanopartículas de SERS encapsuladas, como modalidad de  
50 detección. Se observó una sensibilidad mejorada del inmunoensayo de flujo lateral preparado para la lectura visual.

- El SERS es uno de los procedimientos más sensibles para realizar análisis químicos, permitiendo 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 infrarrojo, incluye una distribución de longitudes de onda de bandas correspondientes a vibraciones moleculares específicas de la muestra que se analiza (el analito). En la práctica de la espectroscopía Raman, el haz de una fuente de luz, generalmente un láser, se centra en la muestra para generar de este modo una radiación dispersada de forma no elástica, que se recoge ópticamente y se dirige a un espectrómetro de dispersión de longitud de onda o Fourier en el que un detector convierte la energía de los fotones incidentes en intensidad de señal eléctrica.

La muy baja conversión de la radiación incidente en radiación no elástica dispersa limitó la espectroscopía Raman a aplicaciones que eran difíciles de realizar por espectroscopía infrarroja, como el análisis de soluciones acuosas. Se descubrió en 1974, sin embargo, que cuando una molécula muy próxima a un electrodo de plata rugoso se somete a una fuente de excitación Raman, la intensidad de la señal generada se incrementa en hasta seis órdenes de magnitud. (Fleischmann, M., Hendra, P.J. and 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 láser incidentes se acoplan para liberar electrones conductores dentro del metal que, confinados por la superficie de las partículas, hacen que la nube de electrones resuene colectivamente. El campo de plasmón de superficie resultante proporciona una vía eficaz para la transferencia de energía a los modos de vibración molecular de una molécula dentro del campo, generando así fotones Raman.

Las nanopartículas de 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 tales ensayos. Las nanopartículas consisten en un núcleo de nanopartículas de oro, sobre el cual se adsorben moléculas informadoras Raman capaces de generar una señal de espectroscopía Raman mejorada en superficie. La nanopartícula de oro marcada con Raman está recubierta con una capa de sílice de aproximadamente 10-50 nm de espesor. La cubierta de sílice protege a la informadora de la desorción de la superficie, evita las interacciones plasmón-plasmón entre las partículas de oro adyacentes, y también evita la generación de señales SERS a partir de componentes en la solución. Las nanopartículas de SERS que tienen un revestimiento de polímero en lugar del recubrimiento de sílice se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2007/0165219. El documento WO00/31538 describe ensayos de flujo lateral que utilizan oro coloidal como mediciones de marcación y reflectancia para la detección.

Al aprovechar la alta sensibilidad del 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. Puede ser ventajoso en algunas circunstancias tener una nanopartícula para uso en un inmunoensayo de flujo lateral que posea una sensibilidad aumentada tal vez comparable a la de una nanopartícula de SERS, pero que requiere solamente una tecnología de lector de reflectancia relativamente simple y barata para la detección.

### Sumario

La invención proporciona procedimientos rápidos y precisos para determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o ausencia de analitos en muestras biológicas y dispositivos y reactivos para llevar a cabo dichos procedimientos.

Los inventores han descubierto que las nanopartículas recubiertas utilizadas como molécula detectora en un inmunoensayo de flujo lateral o flujo vertical proporcionan ventajas de sensibilidad de ensayo significativas sobre moléculas detectoras tales como oro coloidal cuando el ensayo se lee con un lector de reflectancia. La invención proporciona

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

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

(i) un miembro receptor de muestra;

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

(iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, comprendiendo el reactivo marcado un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido al mismo, en el que la cubierta comprende vidrio, un material cerámico tal como perovskita y ZrO<sub>2</sub>, o un polímero tal como polietilenglicol, polimetilmetacrilato y poliestireno, y aumenta la reflectancia de la nanopartícula, y en donde la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y

(iv) un reactivo de enlace efectivo 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 muestra del dispositivo de prueba;

(c) permitir que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de muestra movilice dicho reactivo marcado de 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 midiendo 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 fallo en detectar 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 de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:

a) proporcionar un dispositivo de prueba que comprende: (i) un miembro receptor de muestra; (ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de muestra; y (iii) un reactivo de enlace efectivo para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;

10 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 múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido a ella, en la 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, donde la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman;

c) poner en contacto la mezcla de b) con el miembro receptor de muestra del dispositivo de prueba;

15 d) permitir que la mezcla de b) aplicada al miembro receptor de 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 midiendo 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 fallo en detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

(3) un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, comprendiendo dicho kit:

25 (i) un dispositivo de prueba que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de enlace efectivo 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 múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido al mismo, 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 la 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;

35 (b) permitir 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 enlace;

(c) poner en contacto 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 manera que al menos una parte del reactivo marcado se una al analito; y

40 (e) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa midiendo la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado sobre la membrana porosa es indicativa de la presencia del analito en la muestra líquida y el fallo en detectar la presencia del reactivo marcado sobre la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida;

45 (4) un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, comprendiendo dicho kit:

(i) un dispositivo de prueba que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de enlace efectivo 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 múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido al mismo, 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 la que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman,

comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 (a) mezclar la muestra líquida con el reactivo marcado de manera que el analito, cuando está presente en la muestra líquida, se una al reactivo marcado;
- (b) poner en contacto la mezcla de (a) con la superficie superior de la membrana porosa;
- (c) permitir que la mezcla de (a) fluya a través de la membrana porosa de tal manera que al menos una porción del analito unido al reactivo marcado se una al reactivo de enlace; y
- 10 (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa midiendo 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 fallo en detectar 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
- 15 (I) un dispositivo de prueba para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:
- (i) un miembro receptor de muestra;
- (ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de muestra;
- (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, comprendiendo el reactivo marcado un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido al mismo, 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 donde la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman; y
- 20 (iv) un reactivo de enlace efectivo 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 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 donde la detección del reactivo marcado en la zona de detección es indicativa de la presencia de analito en la muestra líquida, y
- 25 (II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de prueba; y
- (6) un sistema que comprende
- 30 (I) un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, que comprende:
- (i) un dispositivo de prueba que comprende una membrana porosa que comprende una superficie superior y una superficie inferior y un reactivo de enlace efectivo para capturar el analito, cuando está presente en la muestra líquida, unido a la superficie superior o inferior de la membrana porosa; y
- 35 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos de metal y una cubierta que tiene el ligando unido a la misma, en donde 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, donde la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman, y
- 40 (II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de prueba.

Tal nanopartícula recubierta comprende núcleos metálicos y una cubierta que aumenta la reflectancia de la nanopartícula, en la que la nanopartícula recubierta no incluye una molécula activa en Raman. Los núcleos metálicos pueden presentar, por ejemplo, resonancia plasmónica tal como, por ejemplo, oro.

45 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 formada por un polímero. El polímero puede ser, por ejemplo, polietilenglicol, polimetilmetacrilato o poliestireno. La cubierta puede rodear completa o parcialmente el núcleo.

Las nanopartículas recubiertas pueden estar formadas en cualquiera de una variedad de formas que tienen dimensiones diferentes, incluyendo pero no limitándose a esferoides, barras, discos, pirámides, cubos, cilindros, etc.

50 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 varios núcleos, por ejemplo pero no limitándose a, dobletes.

5 La cubierta de la nanopartícula se modifica 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 limitación, un anticuerpo, se conjuga con la cubierta de la nanopartícula recubierta a través de los grupos tiol.

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

En ciertas realizaciones, el reactivo marcado usado en el dispositivo de prueba comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en núcleos metálicos y una cubierta que aumenta la reflectancia de la nanopartícula que tiene el ligando unido a ella, en el que dicho ligando está unido a la superficie de la cubierta.

15 En ciertas realizaciones, el vehículo es, por ejemplo y sin limitaciones, nitrocelulosa, plástico o vidrio. En otras realizaciones, el dispositivo de prueba comprende además una almohadilla absorbente y/o una zona de control en comunicación de fluido con la zona de detección.

20 El dispositivo de prueba de la invención puede utilizarse para detectar cualitativa o cuantitativamente la presencia o ausencia de cualquier analito de interés, tal como, y sin limitación, una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus o bacteria. En ciertas realizaciones, el dispositivo de prueba puede usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en donde los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los 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 realizaciones venidas, los procedimientos de la invención pueden usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en donde los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

30 En ciertas realizaciones, el dispositivo de prueba de los kits descritos anteriormente comprende además una almohadilla absorbente, en la que la superficie inferior de la membrana porosa y la almohadilla absorbente están en contacto físico y en comunicación de fluido, y en la que el reactivo de enlace está unido a la superficie superior de la membrana porosa. En otras realizaciones, el dispositivo de prueba de los kits de la invención comprende además un alojamiento para la membrana porosa.

35 Los kits pueden utilizarse para detectar cualitativa o cuantitativamente la presencia o ausencia de cualquier analito de interés, tal como, y sin limitación, 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 donde los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

40 En algunas realizaciones se utiliza 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, los procedimientos de la invención pueden usarse para detectar múltiples analitos en una muestra líquida con al menos dos reactivos marcados diferentes, en donde los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.

### Breve descripción de los dibujos

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

55 La figura 2 muestra los resultados de una prueba de flujo lateral para el virus de gripe A que compara la sensibilidad de un prototipo de dispositivo utilizando nanopartículas de oro recubiertas con 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 que utiliza las nanopartículas de oro recubiertas con sílice es aproximadamente 7 veces más sensible que el BD Directigen™ EZ A+B cuando se lee con un reflectómetro.

**Descripción detallada de ciertas formas de realización**

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica de las reivindicaciones, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En el caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente 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" hace referencia a más de una reivindicación independiente o dependiente precedente en la alternativa solamente. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario.

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

Con el fin de que la presente solicitud pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

El término "nanopartícula" tal como se utiliza en la presente memoria, 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 pueden ser de cualquier forma. En ciertas realizaciones las nanopartículas son esféricas. Las nanopartículas descritas típicamente no incluyen, pero pueden incluir una molécula Raman activa. En ciertas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender núcleos múltiples y una cubierta.

Tal como se utiliza aquí, el término "núcleo" se refiere a la porción interna de las nanopartículas. En la invención, los núcleos metálicos son, por ejemplo, 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 cubierta puede estar compuesta de cualquier material o combinación de materiales, siempre que posea la propiedad de aumentar la reflectancia de la nanopartícula. Por ejemplo, en algunas realizaciones la cubierta puede comprender cualquier material transparente en el intervalo espectral requerido. En ciertas realizaciones, la cubierta comprende sílice, es decir, vidrio. En otras realizaciones, la cubierta comprende otro material cerámico, por ejemplo, pero no limitado a, cerámicas transparentes con un índice de refracción alto, tal como perovskita y  $ZrO_2$ . En otras realizaciones, la cubierta está compuesta por un polímero. En realizaciones particulares, el polímero comprende polietilenglicol, polimetilmetacrilato o poliestireno. En algunas realizaciones, el material que forma la cubierta es tratado o derivado para permitir unir un ligando a la superficie de la nanopartícula. La elección óptima de polímero puede depender del ligando que se inmoviliza en la superficie de la nanopartícula.

Al referirse a la cubierta de la presente descripción, la frase "aumenta la reflectancia de la nanopartícula" significa que la presencia de la cubierta da como resultado una nanopartícula que proporciona una señal o sensibilidad aumentada cuando se mide por reflectancia en, por ejemplo, inmunoensayo de flujo, en comparación con una nanopartícula sin la cubierta. Sin estar limitado por la teoría, la presencia de la cubierta que rodea el núcleo puede hacer que la partícula refleje más luz. Alternativamente, o además, los ligandos unidos a la superficie de la cubierta pueden estar mejor orientados para participar en las reacciones de unión cuando se unen al material de la cubierta en oposición a cuando se adsorben pasivamente a la superficie del núcleo.

Tal como se usa en la presente memoria, "ligando" significa una molécula de cualquier tipo que se unirá a un analito de interés. Por ejemplo y sin limitación, en ciertas realizaciones el ligando es un anticuerpo, un antígeno, un receptor, un ácido nucleico o una enzima.

El término "analito" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia de interés que se desee detectar usando la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos, incluyendo fármacos terapéuticos y fármacos 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 todo tipo; productos o componentes de células normales o malignas; etc. Como ejemplos particulares, se pueden mencionar la gonadotropina coriónica humana (hCG); insulina; hormona luteinizante; organismos causantes o asociados a diversos estados patológicos, tales como *Streptococcus pyogenes* (grupo A), Herpes Simplex I y II, citomegalovirus, *Chlamydia*, anticuerpo 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 la presente memoria se refiere a cualquier muestra biológica que podría

contener un analito para su detección. En algunas realizaciones, la muestra biológica está en forma líquida, mientras que en otros se puede cambiar en una forma líquida.

5 El término "miembro de recepción de muestra", tal como se utiliza en la presente memoria, significa la parte del dispositivo de prueba que está en contacto directo con la muestra líquida, es decir, recibe la muestra a ensayar para el analito de interés. El miembro receptor de muestra puede ser parte o separado del vehículo o membrana porosa. La muestra líquida puede entonces migrar, a través de flujo lateral o vertical, desde el miembro receptor de muestra hacia la zona de detección. El miembro receptor de muestra está en contacto de flujo de líquido con la zona de detección de analito. Esto podría ser una conexión superpuesta, de arriba a abajo o una conexión de extremo a extremo. En ciertas realizaciones, el miembro receptor de muestra está hecho de material poroso, por ejemplo y no limitado a papel.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vehículo", tal como se utiliza 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 no tratado, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio o nilón. El sustrato puede ser poroso. Típicamente, los poros del sustrato son de tamaño suficiente tal que las nanopartículas fluyen a través de la totalidad del vehículo. Un experto en la técnica será consciente de otros materiales que permiten el flujo de líquido. El vehículo puede comprender uno o más sustratos en comunicación de fluido. 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 separados (es decir, almohadillas) dentro del vehículo.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "membrana porosa", tal como se utiliza en un ensayo de flujo continuo, se refiere a una membrana o filtro de cualquier material que se humedece fácilmente con una solución acuosa y tiene poros suficientes para permitir el paso de las nanopartículas recubiertas. Materiales adecuados incluyen, por ejemplo, nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin tratar, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio o nilón.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, "material absorbente" se refiere a un material poroso que tiene una capacidad de absorción 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 prueba. Los materiales adecuados incluyen, por ejemplo, nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel sin tratar, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo, plástico, vidrio o nilón.

25 Como se usa aquí, 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 de fluidos) de un material capaz de transportar una solución por acción capilar, es decir, una acción de mecha o cromatográfica, en la que diferentes áreas o zonas en la tira contienen ensayos reactivos ligados con difusión o sin difusión que producen una señal detectable a medida que la solución es transportada a o a través de dichas zonas. Típicamente, dichos ensayos comprenden una zona de aplicación adaptada para recibir una muestra de líquido, una zona de reactivo separada lateralmente de y en comunicación de fluido con la zona de aplicación y una zona de detección espaciada lateralmente de y en comunicación de fluido 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. Dichos ensayos pueden usarse para detectar un analito en una muestra a través de ensayos directos (ensayos en sándwich) o de enlace competitivo. Ejemplos de dispositivos de flujo lateral se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos No. 6,194,220 de Malick et al.; 5,998,221 de Malick et al.; 5,798,273 de Shuler et al.; y RE38,430 de Rosenstein.

30 En un ensayo de flujo lateral en sándwich, una muestra líquida que puede contener o no un analito de interés se aplica a la zona de aplicación y se deja pasar a la zona reactiva por acción capilar. El analito, si está presente, interactúa con un reactivo marcado en la zona reactiva 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 interactuando con una molécula de unión específica para el analito y/o reactivo. La muestra no unida puede moverse a través de la zona de detección por acción capilar a una almohadilla absorbente lateralmente yuxtapuesta y en comunicación de fluido con la zona de detección. El reactivo marcado puede ser detectado entonces en la zona de detección por medios apropiados.

35 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 una unidad estructural que es capaz de imitar al analito de interés cuando se une a un enlazante 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 reactivo marcado al unirse al enlazante 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 lateralmente yuxtapuesta y en comunicación de fluido con la zona de detección. El reactivo marcado puede entonces ser detectado en la zona de detección por medios apropiados. La presencia o ausencia del analito de interés puede determinarse mediante la inspección de la zona de detección, en la que cuanto mayor sea la cantidad de analito presente en la muestra líquida, menor será la cantidad de receptor marcado unido en la zona de detección.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "flujo vertical" y "flujo continuo" se refieren al flujo de líquido transversal al plano de un vehículo. En general, los dispositivos de flujo 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 con difusión o sin difusión que producen una señal detectable a medida que la solución es transportada a través del dispositivo. Típicamente, el dispositivo comprende una primera capa que tiene una superficie superior e inferior, en la que dicha superficie superior está adaptada para recibir una muestra de líquido y una capa absorbente verticalmente yuxtapuesta y en comunicación de fluido con la superficie inferior de la primera capa que está adaptada para extraer el líquido a través de la primera capa. La primera capa puede comprender un agente enlazante unido a la superficie superior de la primera capa que es capaz de interactuar con un analito en la muestra y atrapar el analito sobre la superficie superior de la primera capa. Ejemplos de dispositivos de flujo continuo proporcionan en las Patentes de los Estados Unidos No. 4,920,046 de McFarland et al. y 7,052,831 de Fletcher et al.

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 enlazante específico para un analito de interés. La muestra líquida fluye entonces a través de la primera capa y hacia la capa absorbente. Si el analito está presente en la muestra, interactúa con el agente enlazante y queda atrapado en la superficie superior de la primera capa. La primera capa se puede tratar entonces con soluciones de lavado de acuerdo con procedimientos de inmunoensayo convencionales. La primera capa puede tratarse después con un reactivo marcado que se une al analito atrapado por el agente enlazante. El reactivo marcado fluye a continuación a través de la primera capa y hacia la capa absorbente. La primera capa puede tratarse con soluciones de lavado de acuerdo con procedimientos de inmunoensayo convencionales. El reactivo marcado puede entonces detectarse por medios apropiados. Alternativamente, la muestra líquida puede mezclarse con el reactivo marcado antes de ser aplicada a la superficie superior de la primera capa. Otras variantes adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

Los ensayos laterales y de flujo continuo pueden ser usados 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 continuo, la membrana porosa puede comprender múltiples agentes enlazantes, cada uno capaz de unirse a un analito diferente en una muestra líquida, o un único agente enlazante capaz de unirse a múltiples analitos. Alternativamente, o además, se puede usar una mezcla de reactivos marcados en un ensayo de flujo continuo, cada uno configurado para unirse a un analito diferente en una muestra líquida, o un solo reactivo marcado configurado para enlazar múltiples analitos. Si se usan múltiples reactivos marcados en un ensayo lateral o de flujo, los reactivos pueden marcarse diferencialmente para distinguir diferentes tipos de analitos en una muestra líquida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "móvil" significa unido con difusión o sin difusión, o impregnado. Los reactivos que son móviles son capaces de dispersarse con la muestra líquida y son transportados por la muestra líquida en el flujo lateral o vertical.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "reactivo marcado" significa cualquier partícula, proteína o molécula que reconoce o se une al analito de interés y ha unido a él una sustancia capaz de producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, es decir, una nanopartícula recubierta como se define aquí. 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.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "reactivo de enlace" significa cualquier partícula o molécula que reconoce o se une al analito en cuestión. El reactivo de enlace es capaz de formar un complejo de unión con el complejo reactivo marcado con analito. El reactivo de enlace se inmoviliza en el vehículo en la zona de detección o en la superficie de la membrana porosa. El reactivo de enlace no se ve afectado por el flujo lateral o vertical de la muestra líquida debido a la inmovilización del vehículo o membrana porosa. La partícula o molécula puede ser natural, o no natural, es decir, sintética. Una vez que el reactivo de enlace se une al complejo de reactivo marcado con analito, impide que el complejo de reactivos marcado con analito continúe con el flujo de la muestra líquida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "zona de detección" significa la porción del vehículo o membrana porosa que contiene el reactivo de enlace inmovilizado.

El término "zona de control" se refiere a una parte del dispositivo de prueba 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 de líquido con la zona de detección del vehículo, de tal manera que el reactivo marcado se capture en la zona de control cuando la muestra líquida es transportada fuera de la zona de detección por acción capilar. En un ensayo de flujo continuo, la zona de control puede ser una porción separada de la membrana porosa, de manera que el reactivo marcado se aplica tanto a la porción de aplicación de 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 la finalidad prevista.

El término "alojamiento" se refiere a cualquier recinto adecuado para los dispositivos de prueba de la invención. Los alojamientos ejemplares serán conocidos por los expertos en la técnica. El alojamiento puede tener, por ejemplo, una parte de base y una porción de tapa. La tapa puede incluir una pared superior y una pared lateral sustancialmente vertical. Un reborde puede proyectarse hacia arriba desde la pared superior. El reborde puede definir un rebaje que tiene en su interior un inserto con al menos dos aberturas alineadas con al menos otras dos aberturas en la tapa para formar al menos dos pozos en el alojamiento. El alojamiento puede construirse para asegurar que no hay comunicación entre los dos o más pozos. Un ejemplo de dicha cubierta se proporciona en la Patente de los Estados Unidos No. 7,052,831 de Fletcher et al. Otros alojamientos adecuados incluyen los utilizados en el dispositivo de ensayo de flujo lateral BD Directigen™ EZ RSV.

Tal como se usa en la presente memoria, "lector de reflectancia" o "reflectómetro" se refiere a un instrumento capaz de detectar el cambio en la reflectancia causado por la presencia de la nanopartícula recubierta en la zona de detección del dispositivo de ensayo. Los 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. La zona de detección es explorada más habitualmente por el área de detección del dispositivo o directamente formada por imágenes en el detector del reflectómetro que conduce a un rastro de reflectividad frente a la coordenada espacial. A continuación se utiliza un algoritmo adecuado para determinar, por ejemplo, el cambio máximo de reflectividad en la zona de detección.

Las nanopartículas recubiertas para uso en procedimientos basados en SERS son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,514,767 describe nanopartículas compuestas 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 haciendo crecer o de otra manera colocando una cubierta de un encapsulante adecuado sobre un núcleo de nanopartículas metálicas activas en Raman. Las nanopartículas de metal del tamaño deseado pueden crecer como coloides metálicos mediante una serie de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la reducción química o fotoquímica de iones metálicos en solución usando agentes reductores. Por ejemplo, se pueden producir partículas de oro coloidal, que son suspensiones de partículas submicrometrizadas de oro en fluido, en un líquido por reducción de ácido cloroáurico. Después de disolver el ácido, la solución se agita rápidamente mientras se añade un agente reductor. Esto hace que los iones de oro se reduzcan a átomos de oro neutros, que precipitan de la solución sobresaturada y forman partículas. Para evitar que las partículas se agreguen, se puede añadir un agente estabilizante que se adhiere a la superficie de las nanopartículas. Las nanopartículas también pueden fabricarse por descarga eléctrica en solución. Las partículas pueden ser funcionalizadas con diversos ligandos orgánicos para crear híbridos orgánicos e inorgánicos con funcionalidad avanzada.

Los encapsulantes adecuados incluyen vidrio, polímeros, metales, óxidos metálicos y sulfuros metálicos. Si el encapsulante es de vidrio, los núcleos de nanopartículas metálicas se tratan preferiblemente primero con un imprimador de vidrio. A continuación, se hace crecer vidrio sobre la nanopartícula metálica mediante técnicas estándar. El espesor del encapsulante se puede variar fácilmente dependiendo de las propiedades físicas requeridas de la partícula. Las capas pueden ser derivadas por técnicas estándar, permitiendo que las partículas se conjuguen a moléculas (incluyendo biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos) o a soportes sólidos.

Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ comercialmente disponibles consisten en un núcleo de nanopartículas de oro, sobre el cual se adsorben moléculas informadoras Raman capaces de generar una señal SERS. La nanopartícula de oro marcada con Raman se recubre entonces con una capa de sílice de aproximadamente 10-50 nm de espesor. La cubierta de sílice protege las moléculas reporteras de la desorción de la superficie del núcleo, evita las interacciones plasmón-plasmón entre partículas de oro adyacentes, y también evita la generación de señales SERS a partir de componentes en la solución.

Para un ensayo de flujo lateral leído con un lector de reflectancia, podría esperarse que las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ proporcionaran una sensibilidad de ensayo comparable a la de los coloides de oro del mismo diámetro que el núcleo de la nanopartícula Oxonica Nanoplex™ y utilizadas en la misma densidad óptica. En cambio, los inventores observaron ventajas inesperadas y significativas en la sensibilidad del ensayo cuando los coloides de oro fueron reemplazados 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 sensibilidad obtenidas con las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ en general no se obtuvieron simplemente ajustando el diámetro de los coloides de oro no recubiertos. También, de manera importante, cuando se usan las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ como un reactivo marcado, la sensibilidad del ensayo puede ser equivalente, si la señal se lee con un reflectómetro o un lector SERS.

No se cree que las moléculas activas en Raman en las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ contribuyan al rendimiento del ensayo cuando se usa un reflectómetro para leer la señal en lugar de un lector Raman. Esta expectativa es corroborada por experimentos en los que se encontró que la nanopartícula recubierta con sílice (sin moléculas activas en Raman) funcionaba de manera idéntica y se han utilizado en ensayos de flujo lateral basados en reflectómetro para dar ventajas de sensibilidad significativas sobre los coloides de oro desnudo.

Aquellos de los siguientes ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones tienen un propósito ilustrativo.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1:**

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

Los coloides de oro, obtenidos de British Biocell International ("BBIInternational", "BBI"), tenían 40 nm de diámetro. Las nanopartículas de oro recubiertas con sílice utilizadas en el experimento fueron nanopartículas Oxonica Nanoplex™. Estas nanopartículas consisten en un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el informador Raman 4,4'-dipiridilo y una capa externa de sílice. El grosor de la cubierta de sílice fue de aproximadamente 30 nm. Los anticuerpos de detección de la gripe A se unieron a los coloides de oro 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 sílice a través de la química de la maleimida. Para ambos ensayos, los anticuerpos de captura de gripe A fueron dispuestos en bandas sobre membranas de nitrocelulosa Whatman AE99. Las membranas de nitrocelulosa se ensayaron a continuación en un formato líquido ("tira reactiva") en el que las partículas más los anticuerpos de detección se mezclaron con las muestras nasofaríngeas que contenían niveles variables de virus. Se usó la misma densidad óptica tanto para los coloides de oro como para las nanopartículas recubiertas. Las mezclas de partícula/muestra se colocaron entonces en los pozos de una placa de 96 pozos y se colocó un extremo de una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos de captura en cada pozo. Se dejó que la muestra impregnara la membrana de nitrocelulosa, y los pozos se llenaron entonces con un tampón de lavado que luego también impregnó las tiras de membrana de nitrocelulosa.

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

**Ejemplo 2**

En este ejemplo, la sensibilidad de las nanopartículas de oro recubiertas con sílice se comparó con la de un producto comercial: la prueba BD Directigen™ EZ Flu A+B. Como en el Ejemplo 1, las nanopartículas de oro recubiertas se ensayaron en un formato de tira reactiva usando nitrocelulosa Whatman AE99. La Directigen™ EZ Flu A+B se probó en su realización comercial (formato de cartucho). Los anticuerpos de captura y detección fueron los mismos 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 fue inyectado en aspirados nasofaríngeos negativos en lugar del virus de la gripe A. Como antes, las nanopartículas de oro recubiertas con sílice usadas en el experimento eran nanopartículas Oxonica Nanoplex™. Estas nanopartículas consisten en un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el informador Raman 4,4'-dipiridilo y una capa externa de sílice. El espesor de la capa de sílice era aproximadamente 30 nm. El producto comercial BD utiliza coloide de oro de 40 nm que no incluye una capa de sílice. El producto comercial BD se usó de acuerdo con el inserto del envase, solamente con la señal de la línea de prueba leída con un reflectómetro, así como visualmente.

Los datos se muestran en la Tabla 1, que compara el límite de detección (Límite de Detección Confiable) para las dos partículas. El Límite de Detección Confiable (RDL) se define como la concentración en la que el límite de confianza del 95% inferior es igual al límite superior de confianza del 95% del blanco. Los RDL, expresados en unidades arbitrarias (X) para el producto de oro coloidal BD y para las nanopartículas recubiertas con sílice, se informan para tres experimentos separados. El mismo reflectómetro construido a medida de UMM Electronics fue utilizado para leer la señal tanto de los dispositivos de tira reactiva de nanopartículas recubiertas de sílice como de los dispositivos Directigen™ EZ Flu A+B. El factor de mejora de la sensibilidad se define como el RDL del producto sin recubrimiento de oro dividido por el RDL del producto de nanopartículas recubiertas con sílice.

55

**Tabla 1**

<b>BD Directigen™ EZ con oro no recubierto (leído</b>	<b>Prueba de flujo lateral con nanopartículas</b>	<b>Factor de mejora de la sensibilidad</b>
---	---	--

	con un reflectómetro	Oxonica (leída con un reflectómetro)	
<b>Experimento 1</b>	0,23	0,015	15
<b>Experimento 2</b>	0,12	0,0075	16
<b>Experimento 3</b>	0,26	0,028	9

Como se ve en la tabla, las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ dieron una sensibilidad 16 veces mejorada en comparación con las partículas de oro desnudo.

5 En experimentos separados similares a los descritos anteriormente, el diámetro de las partículas de coloide de oro se incrementó de 40 nm a 60 nm y tamaños mayores. En estos experimentos solamente 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 probablemente no es la fuente de mejoras de sensibilidad.

### Ejemplo 3

10 Este experimento comparó la sensibilidad y especificidad de los coloides de oro frente a las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ en una prueba de inmunoensayo de flujo lateral de gripe B (B/ Lee/40). Se prepararon sesenta muestras clínicas. Las muestras fueron todas muestras nasofaríngeas que dieron negativo para la gripe B. Veinte de las muestras sirvieron como controles negativos. Las 40 muestras restantes fueron atacadas con virus vivo de gripe B a dos niveles para crear un conjunto de 40 muestras positivas. Veinte de estas cuarenta muestras fueron atacadas  
15 recibieron 10 veces menos virus B de la gripe, para una concentración de 0,05X. Todas las sesenta muestras (40 positivas y 20 controles negativos) se ensayaron a continuación utilizando el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A+B en formato de cartucho y el dispositivo de tira reactiva medidora hecho usando nanopartículas Oxonica Nanoplex™. El dispositivo de tira reactiva se preparó usando nitrocelulosa Whatman AE99. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ consistían en un núcleo de oro de 60 nm recubierto con el informador Raman 4,4'-dipiridilo y una capa externa de sílice que tenía aproximadamente 30 nm de espesor. Los anticuerpos de captura y detección fueron los mismos tanto para el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A+B como para el dispositivo Oxonica Nanoplex™ basado en nanopartículas.

25 Los resultados se resumen en la Tabla 2. En la tabla, se calculó la sensibilidad como el porcentaje de las 40 muestras positivas correctamente identificadas como positivas por cada prueba. La especificidad se calculó como el porcentaje de las 20 muestras negativas correctamente identificadas como negativas por cada prueba. Cuando se usaron las lecturas de instrumento, una prueba se consideró positiva si la lectura del instrumento medido era mayor que un valor de umbral establecido para cada tipo de dispositivo. El umbral se estableció para asegurar al menos una especificidad del 95% para cada dispositivo. En este ejemplo, el producto Directigen™ fue leído visualmente y con el reflectómetro personalizado de UMM Electronics. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ se leyeron con el mismo reflectómetro, y también con un lector Raman de investigación construido por BD (última fila de la tabla). El lector Raman de investigación 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, leída con reflectómetro	58%	95%
Nanotags de Oxonica, leída con reflectómetro	100%	100%
Nanotags de Oxonica, leída con Raman	100%	100%

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

### Ejemplo 4

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

Se obtuvieron nanopartículas de oro Oxonica Nanoplex™ que contenían una etiqueta SERS de Oxonica. Las nanopartículas consisten en un núcleo de oro de 60 nm marcado con 4-4'-dipiridilo y recubierto con una capa de sílice de 35 nm de espesor. El diámetro de las nanopartículas fue de 130 nm. Se utilizó la química Sulfo-SMCC (Pierce # 22622) para unir covalentemente anticuerpos antigripe A a los grupos de tiol superficiales sobre las nanopartículas.

Se adquirieron de BBI nanopartículas de oro de 60 nanómetros de diámetro que carecían de una etiqueta SERS. Las nanopartículas de oro se recubrieron después con sílice mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar se trataron 10 ml de coloide de oro de 60 nm (BBI,  $\sim 2,6 \times 10^{10}$  partículas/ml) con 75  $\mu$ l de una solución 100  $\mu$ M de 3-mercaptopropil trietoxisilano en etanol. Después de 3 horas, se añadieron 75  $\mu$ l de una solución acuosa al 2,7% de silicato de sodio y se dejó que la reacción continuara durante 24 horas. En la siguiente etapa, se añadieron 40 ml de etanol a la suspensión seguido de 1 ml de amoníaco y 300  $\mu$ l (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 de 30 nm, para un diámetro de partícula total del oro recubierto con sílice de 120 nm. Se añadieron grupos tiol entonces a la superficie de las partículas de oro recubiertas con sílice haciendo reaccionar una suspensión acuosa de nanopartículas de oro recubiertas con vidrio (10 ml,  $\sim 2,6 \times 10^{10}$  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  $\mu$ l a 100  $\mu$ l, para crear niveles variables de grupos tiol tensioactivos a niveles aproximados de carga de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 entre sí (por ejemplo, 2,0 es 4X mayor que 0,5) a través de un proceso no optimizado. Después de la reacción, las partículas se purificaron por centrifugación repetida en agua. Se utilizó la química Sulfo-SMCC (Pierce # 22622) para unir covalentemente anticuerpos antigripe A a los grupos de tiol superficiales sobre las nanopartículas.

El inmunoensayo de flujo lateral se realizó en un formato de tira reactiva de la siguiente manera. Los anticuerpos de captura de Gripe A se aplicaron a tiras de nitrocelulosa Whatman AE99. Las tiras de nitrocelulosa se sumergieron en soluciones de muestra que contenían nanopartículas ajustadas a una densidad óptica de 10 y diversas concentraciones de virus H1N1 de gripe A. Se dejó que las soluciones de muestra impregnaran completamente las tiras de nitrocelulosa. A continuación, se añadió un tampón de lavado y también se sometieron a agitación las tiras de membrana de nitrocelulosa. Después se secaron las tiras y se leyó la reflectancia 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 RDL)
Oxonica Nanoplex™ SERS etiqueta con molécula informadora Raman 4,4'-dipiridilo - replicado 1	0,0471
Oxonica Nanoplex™ SERS etiqueta con molécula informadora Raman 4,4'-dipiridilo - replicado 2	0,0564
Oro recubierto de sílice sin molécula informadora Raman - carga de tiol "0,5"	0.0901
Oro recubierto de sílice sin molécula informadora Raman - carga de tiol "1,0"	0,135
Oro recubierto de sílice sin molécula informadora Raman - carga de tiol "1,5"	0,1063
Oro recubierto de sílice sin molécula informadora Raman - carga de tiol "2,0"	0,062

Los datos de la Tabla 3 indican que, si se optimizan, las nanopartículas de oro recubiertas con sílice sin un reportero SERS funcionan tan bien como nanopartículas que incluyen un reportero SERS en un inmunoensayo de flujo lateral cuando se usa un lector de reflectómetro. Además, el rendimiento de las partículas de oro recubiertas con sílice puede depender del grado de tiolación.

**Ejemplo 5**

Este experimento se diseñó para probar el rendimiento de un prototipo de dispositivo de flujo lateral para detectar el virus H1N1 gripe A vivo en muestras clínicas usando nanopartículas de oro recubiertas con sílice Oxonica Nanoplex™ como informadoras. Las partículas de Oxonica tenían un diámetro de núcleo de oro de aproximadamente 60 nm, un informador en Raman de 4,4'-dipiridilo y una cubierta de sílice exterior de aproximadamente 35 nm de espesor. El dispositivo prototípico basado en cartuchos usó los mismos anticuerpos de captura y detección que el producto comercial BD Directigen™ EZ Flu A+B y se usó de la misma manera que el producto comercial.

El dispositivo de prueba prototipo comprendía una tira de respaldo que soporta una longitud de membrana de flujo lateral de nitrocelulosa Millipore HF135. Los anticuerpos de captura específicos de la nucleoproteína de la gripe A (Flu A NP) fueron dispuestos en bandas a través de esta membrana para formar una línea de prueba. El anticuerpo antiinmunoglobulina de la especie fue dispuesto en bandas adyacente a la línea de prueba para formar una línea de control. Las nanopartículas Oxonica Nanoplex™ SERS se pulverizaron sobre una almohadilla conjugada (Arista MAPDS-0399) que se había tratado con una solución SEABLOCK al 10% (Pierce 37527). Las nanopartículas se conjugaron con un anticuerpo de detección de la gripe A NP. La almohadilla de conjugado fue adherida a la tira de soporte en un extremo de la membrana de flujo lateral. En el extremo opuesto de la membrana de flujo lateral, se unió una almohadilla de impregnación 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 revelaba la región de la línea de prueba y de control de la membrana LF, y una aplicación de muestra bien centrada en la almohadilla conjugada. Esta cubierta del cartucho se utiliza en el dispositivo de ensayo de flujo lateral Directigen™ EZ RSV de BD.

De forma similar al Ejemplo 1, se sembraron muestras de aspiración nasofaríngea pediátricas que daban negativo para el virus de la gripe A con cantidades conocidas de virus de gripe A vivo. Las concentraciones finales de virus dentro de las muestras sembradas variaron desde 0,25X (unidades arbitrarias) hasta 0,0039X por dilución en serie de dos veces. Se incluyó una muestra marcada con un medio de dilución libre de virus ("0X") como control. Después de la adición de virus vivos, la serie de muestras se procesó utilizando el protocolo de preparación de muestras BD Directigen™ EZ Flu A+B. En resumen, se mezcló una cantidad de muestra sembrada con gripe A con el reactivo de extracción en un tubo de muestra flexible. La muestra extraída fue retirada entonces del tubo a través de una punta de filtración de fibra de vidrio y fue recolectada. Cada muestra se ensayó por triplicado aplicando 100 µl al pozo de muestra de cada uno de los tres dispositivos de prueba prototipo.

Cada dispositivo fabricado con las nanopartículas de Oxonica Nanoplex™ SERS se leyó usando un reflectómetro Hamamatsu (modelo C10066) a los 15 minutos y 30 minutos después de la aplicación de la muestra. Después de la lectura a los 30 minutos, se retiró cada tira de flujo lateral de su cartucho, se separó de las almohadillas conjugadas y de impregnación, y se secó a temperatura ambiente y humedad durante al menos 1 hora. Cada tira fue leída de nuevo por reflectómetro después del secado. Se dibujó una curva de dosis-respuesta usando datos de cada tiempo de lectura y luego 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; MDC) y un límite de detección confiable (RDL). Estos resultados se muestran en la Tabla 4. La Tabla 4 también muestra la mejora de la sensibilidad obtenida usando las partículas de Oxonica en comparación con la sensibilidad de Directigen™ EZ. Directigen™ EZ utiliza coloides de oro de 40 nm de diámetro sin recubrimiento de sílice.

**Tabla 4. Sensibilidad de un sistema de prueba de flujo lateral para gripe A basado en cartucho empleando nanopartículas activas SERS Oxonica y detección por reflectometría**

Estado del dispositivo y Tiempo de lectura	Límite de Detección† Gripe A lectura por Reflectómetro (Partículas de Oxonica)		Mejora del RDL vs. Dispositivo Gripe A Directigen™ EZ leído con un reflectómetro
	MDC (X)	RDL (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
Secado post-30 minutos	0,0130	0,0242	8.3-veces

† Expresado como concentración mínima detectable (MDC) y límite de detección confiable (RDL)

El límite de detección (RDL) para el actual dispositivo Directigen™ EZ Gripe A es de aproximadamente 0,5X de

concentración de virus de Gripe A por lectura visual, y aproximadamente 0,2X por lectura con reflectómetro. Como se muestra en la Tabla 4, el dispositivo de prueba basado en cartucho que utiliza nanopartículas informadoras Oxonica Nanoplex™ proporciona un aumento marcado en la sensibilidad con respecto al dispositivo Directigen™ EZ Gripe A actual.

5 **Ejemplo 6**

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

15 Al igual que en el ejemplo 5, las muestras de aspiración nasofaríngea pediátricas que daban negativo para el virus de la gripe A fueron atacadas con cantidades conocidas de virus de gripe A vivo. Se ensamblaron prototipos optimizados como se describe en el ejemplo 5, y se realizó la extracción de muestras de acuerdo con el inserto del paquete BD Directigen™ EZ Flu A. Todos los dispositivos (prototipos basados en SERS y BD 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 en función de la concentración de virus vivo para ambos formatos de ensayo, y la Tabla 5 muestra la señal del reflectómetro obtenida a la concentración de virus de prueba más alta (0,25X) junto con el límite de detección confiable (RDL) para los ensayos. En este experimento, los dispositivos que usan las nanopartículas de SERS dieron sensibilidad a mejorada 7 veces y brillo mejorado 8 veces aproximadamente en comparación con BD Directigen™ EZ Flu A+B leído con un reflectómetro.

**Tabla 5**

	<b>Prototipo (usando partículas Nanoplex™ SERS)</b>	<b>BD Directigen™ EZ A+B (usando coloide de oro)</b>
RDL (unidades arbitrarias)	0,027x	0,185x
Intensidad de la señal de reflectancia a 0,25x (Unidades arbitrarias)	0,419	0,054

25

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:
- 5 (a) proporcionar un dispositivo de prueba para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:
- (i) un miembro receptor de muestra;
- (ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de muestra;
- 10 (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, comprendiendo el reactivo marcado un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos y una cubierta que tiene el ligando unido al mismo, 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 enlace efectivo 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 muestra del dispositivo de prueba;
- (c) permitir que la muestra líquida aplicada al miembro receptor de muestra movilice dicho reactivo marcado de 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;
- 20 (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección midiendo 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 fallo en detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
- 25 (i) el vehículo comprende nitrocelulosa, plástico o vidrio, preferiblemente el vehículo comprende nitrocelulosa; o
- (ii) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus o bacteria; o
- (iii) el dispositivo de prueba comprende además una almohadilla absorbente en comunicación de fluido con la zona de detección; o
- 30 (iv) el dispositivo de prueba comprende además una zona de control en comunicación de fluido con la zona de detección; o
- (v) la presencia del analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o
- (vi) el dispositivo de prueba está configurado para detectar múltiples analitos, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además 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 detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.
- 35 3. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:
- 40 a) proporcionar un dispositivo de prueba que comprende: (i) un miembro receptor de muestra; (ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de muestra; y (iii) un reactivo de enlace efectivo para capturar el analito, cuando está presente, inmovilizado en una zona de detección definida del vehículo;
- 45 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 múltiples núcleos metálicos 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 muestra del dispositivo de prueba;
- d) permitir que la mezcla de b) aplicada al miembro receptor de 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 midiendo 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 fallo en detectar la presencia del reactivo marcado en la zona de detección es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.

5 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

10 (iii) el procedimiento detecta múltiples analitos en la muestra líquida, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además al menos dos reactivos marcados diferentes, en donde los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes; o

(iv) los núcleos metálicos de la nanopartícula son núcleos de oro.

15 5. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, comprendiendo dicho kit:

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

20 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos 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:

25 (a) poner en contacto la muestra líquida con la superficie superior de la membrana porosa;

(b) permitir 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 enlace;

(c) poner en contacto el reactivo marcado con la superficie superior de la membrana porosa;

30 (d) dejar que el reactivo marcado fluya a través de la membrana porosa de tal manera que al menos una parte del reactivo marcado se una al analito; y

(e) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa midiendo la reflectancia, en el que la detección del reactivo marcado sobre la membrana porosa es indicativa de la presencia del analito en la muestra líquida y el fallo en detectar la presencia del reactivo marcado sobre la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.

35 6. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida usando un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para detectar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, comprendiendo dicho kit:

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

45 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos 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 manera que el analito, cuando está presente en la muestra líquida, se una al reactivo marcado;

(b) poner en contacto la mezcla de (a) con la superficie superior de la membrana porosa;

- (c) permitir que la mezcla de (a) fluya a través de la membrana porosa de tal manera que al menos una porción del analito unido al reactivo marcado se una al reactivo de enlace; y
- (d) detectar la presencia del reactivo marcado en la membrana porosa midiendo 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 fallo en detectar la presencia del reactivo marcado sobre la membrana porosa es indicativo de la ausencia del analito en la muestra líquida.
- 5
7. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, en el que
- (i) se usa un lector de reflectancia para detectar el reactivo marcado en la membrana porosa; o
- (ii) la presencia de analito en la muestra líquida se determina cuantitativamente; o
- 10 (iii) el procedimiento detecta múltiples analitos en la muestra líquida, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además 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 detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes; o
- (iv) los núcleos metálicos de la nanopartícula son núcleos de oro.
- 15 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 o bacteria; o
- (ii) el dispositivo de prueba 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 enlace está unido a la superficie superior de la membrana porosa; o
- 20 (iii) el dispositivo de prueba comprende además un alojamiento para la membrana porosa; o
- (iv) se determina cuantitativamente la presencia de analito en la muestra líquida; o
- v) el dispositivo de prueba está configurado para detectar múltiples analitos, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además 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 detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes.
- 25 9. Un sistema que comprende
- (I) un dispositivo de prueba para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida, que comprende:
- (i) un miembro receptor de muestra;
- 30 (ii) un vehículo en comunicación de fluido con el miembro receptor de muestra;
- (iii) un reactivo marcado que es móvil en el vehículo en presencia de la muestra líquida, comprendiendo el reactivo marcado un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos metálicos 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
- 35 (iv) un reactivo de enlace efectivo 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 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
- 40 (II) un reflectómetro adaptado para detectar la presencia del reactivo marcado en el dispositivo de prueba.
10. El sistema de la reivindicación 9, en el que en el dispositivo de prueba
- (i) el vehículo comprende nitrocelulosa, plástico o vidrio, preferiblemente el vehículo comprende nitrocelulosa; o
- (ii) el analito es una proteína, ácido nucleico, metabolito, molécula pequeña, virus o bacteria; o
- 45 (iii) el dispositivo de prueba comprende además una almohadilla absorbente en comunicación de fluido con la zona de detección; o

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

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

5 (vi) el dispositivo de prueba está configurado para detectar múltiples analitos, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además 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 detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes; o

(vii) los núcleos metálicos de la nanopartícula son núcleos de oro.

11. Un sistema que comprende

10 (I) un kit para realizar una prueba analítica de flujo continuo para la detección de la presencia o ausencia de un analito en una muestra líquida por reflectometría, que comprende:

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

15 (ii) un reactivo marcado que comprende un ligando que se une al analito y una nanopartícula recubierta que consiste en múltiples núcleos de metal 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

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

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 o bacteria; o

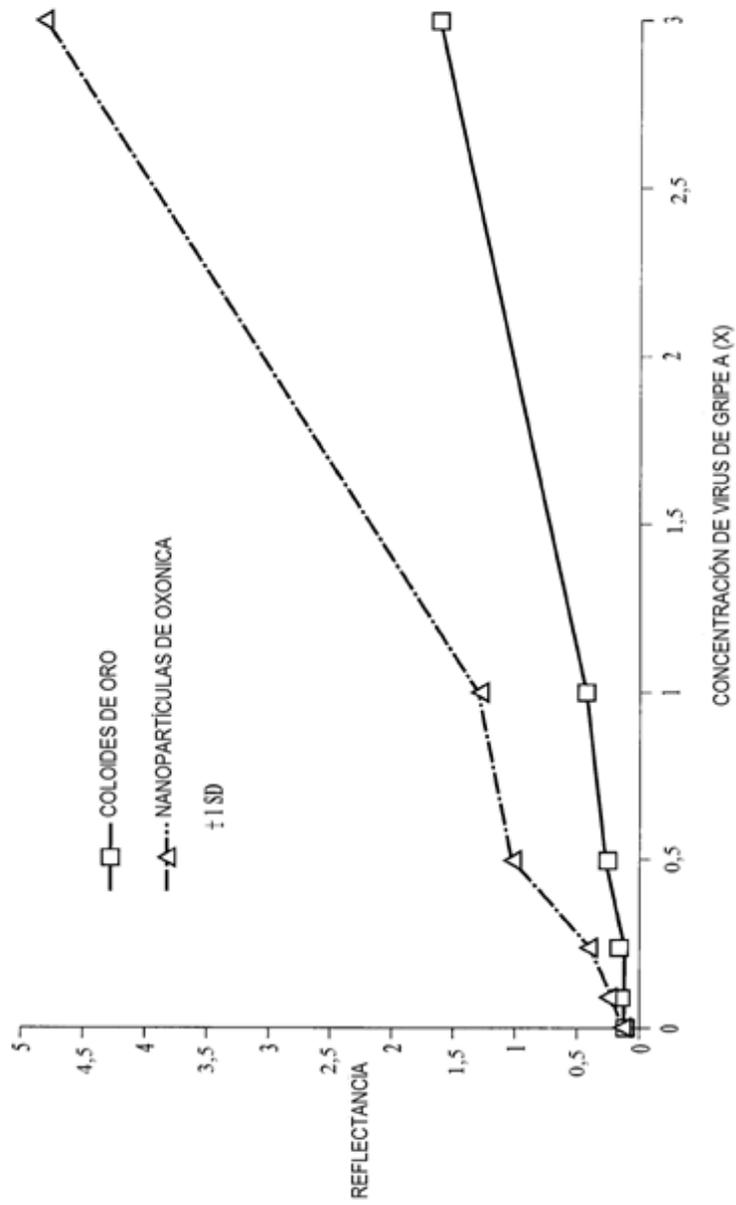
25 (ii) el dispositivo de prueba comprende además una almohadilla absorbente, en el que la superficie inferior de la membrana porosa y la almohadilla absorbente están en contacto físico y en comunicación de fluido y en la que el reactivo de enlace está unido a la superficie superior de la membrana porosa;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

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

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

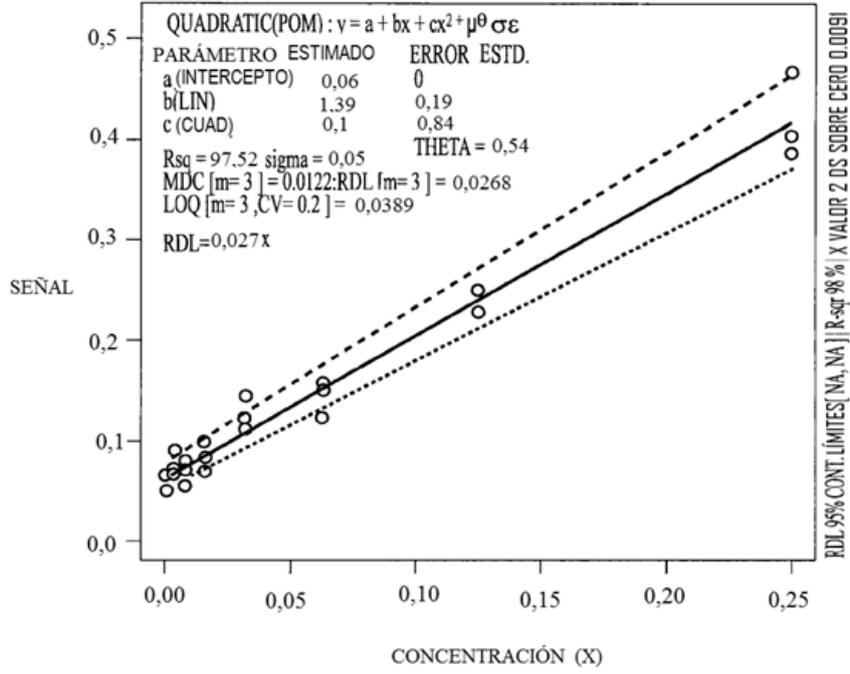
30 (v) el dispositivo de prueba está configurado para detectar múltiples analitos, preferiblemente el dispositivo de prueba comprende además al menos dos reactivos marcados diferentes, en el que los ligandos de los reactivos marcados se unen a diferentes analitos y al menos dos zonas de detección para detectar cada uno de los al menos dos reactivos marcados diferentes; o

(vii) los núcleos metálicos de la nanopartícula son núcleos de oro.



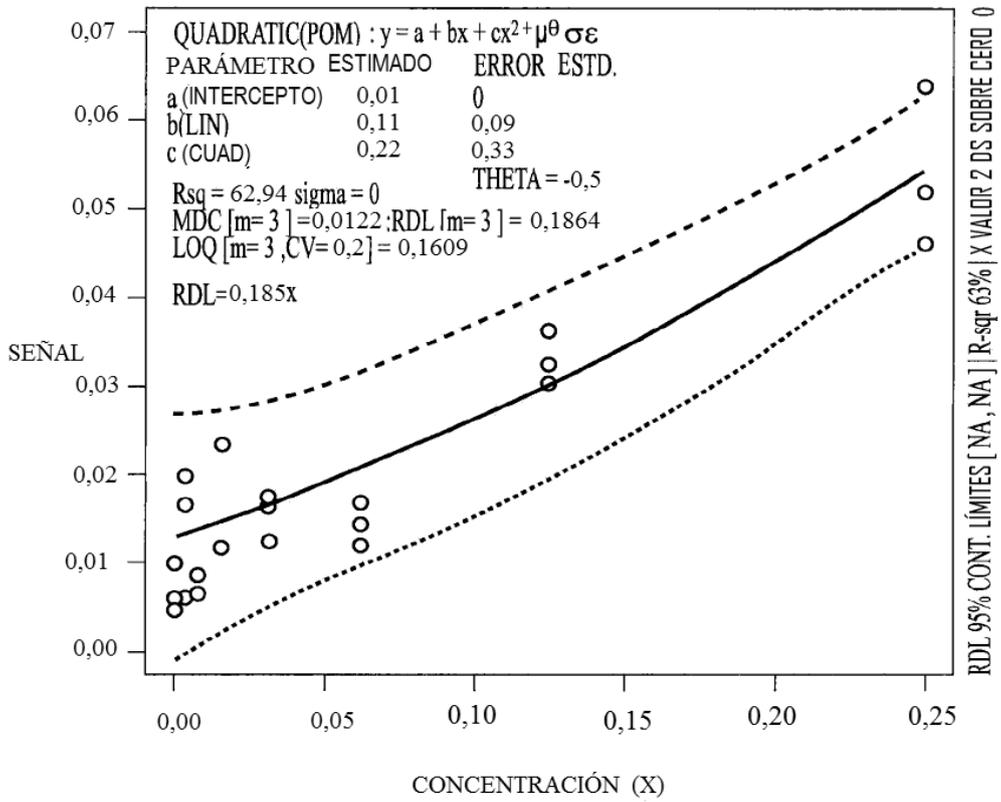
**FIG. 1**

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



**FIG. 2A**

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



**FIG. 2B**