

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 272**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 21/65** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 14163249 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2755031**

54 Título: **Ensayo que usa partículas activas en espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS)**

30 Prioridad:

**20.03.2007 US 895807 P**

**28.09.2007 US 976015 P**

**14.12.2007 US 13740 P**

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

**03.10.2017**

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)**

**1 Becton Drive**

**Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**WEIDEMAIER, KIRSTIN;**

**LIEBMANN-VINSON, ANDREA;**

**CURRY, ADAM CRAIG;**

**LASTOVICH, ALEXANDER G.;**

**SANDMANN, CHRISTIAN;**

**DILLMORE, W. SHANNON;**

**SCHRAM, JAMES L.;**

**STEWART, W. WILLIAM;**

**PEARSON, ROBERT E.;**

**HSIEH, HELEN;**

**KEITH, STEVEN y**

**BHAT, RAJENDRA R.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 635 272 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

Ensayo que usa partículas activas en espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS)

### Campo técnico

5 El objeto desvelado se refiere a ensayos de diagnóstico que usan partículas activas en espectroscopia Raman potenciada en superficie (SERS), incluyendo ensayos basados en líquidos; ensayos de captura magnética; estructuras satélite de micropartículas-nanopartículas para la amplificación de señales en un ensayo; partículas activas en SERS compuestas para la potenciada detección de dianas; y tubos de ensayo y procesos para usar los mismos.

### Antecedentes

10 Se han desarrollado diversas técnicas para detectar la presencia de uno o más analitos en un ensayo. Por ejemplo, se han usado técnicas fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes o electroquimioluminiscentes para detectar analitos dentro de una muestra biológica. En muchos ensayos biológicos, incluyendo ensayos en los que se usan micro o nanopartículas para detectar la presencia y/o cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica, se usa la generación de un acontecimiento de señalización para detectar la presencia del analito. Tales ensayos  
15 biológicos conocidos en la técnica, sin embargo, tienen limitaciones. Por lo tanto, podría ser ventajoso proporcionar un ensayo que tuviera una o más características potenciadas, incluyendo sensibilidad, especificidad, exactitud, repetibilidad potenciadas y combinaciones de las mismas.

### Breve resumen

20 La presente invención proporciona un procedimiento de calibrado de un ensayo para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar:

(i) una o más partículas magnéticas (200) capaces de ser situadas en un área localizada de un recipiente de ensayo;  
25 (ii) una primera nanopartícula activa en SERS (220) que tiene asociada con ella al menos un miembro de unión específico (210b) que tiene afinidad por uno o más analitos de interés (240) en la muestra biológica y capaz de producir una primera señal detectable, en el que la primera señal detectable depende de una cantidad del uno o más analitos (240) en la muestra biológica; y  
30 (iii) una segunda nanopartícula activa en SERS (230) que está unida con dicha una o más partículas magnéticas (200) y que tiene asociada con ella al menos un miembro de unión específico (210a) que tiene afinidad por uno o más analitos de interés (240) en la muestra biológica y capaz de producir una segunda señal detectable, en el que la segunda señal detectable depende de una cantidad y una posición de la una o más partículas magnéticas (200) y es sustancialmente independiente de la cantidad del uno o más analitos (240) en la muestra biológica; y

35 (b) comparar la primera señal detectable con la segunda señal detectable para calibrar el ensayo para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos en la muestra biológica.

### Breve descripción de las diversas vistas del (de los) dibujo(s)

Habiéndose así descrito la materia descrita en términos generales, se hará ahora referencia a los dibujos adjuntos, que no están dibujados necesariamente a escala, y en los que:

40 La Figura 1 es un diagrama esquemático de un ensayo de captura magnética;  
la Figura 2 es un diagrama esquemático que representa el uso de un marcador de referencia, por ejemplo, una nanopartícula activa en SERS, como una referencia en una partícula de captura magnética;  
la Figura 3 es una representación gráfica de una comparación de una señal sin referencia y una señal con referencia. La señal sin referencia (B) es la intensidad pico a  $1590\text{ cm}^{-1}$  de un indicador de Raman trans-1,2-bis(4-pirridil)etileno (BPE) y la señal con referencia (A) es la relación de las intensidades pico a  $1590\text{ cm}^{-1}$  y  $1180\text{ cm}^{-1}$ , que es la intensidad pico correspondiente a un indicador 4,4-dipiridilo (DPY).  
45 Obsérvese que la escala del lado izquierdo de la gráfica se corresponde con la señal con referencia (A), mientras que la escala en el lado derecho de la gráfica se corresponde con la señal sin referencia (B);  
La Figura 4 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un sistema óptico adecuado para su uso con los ensayos desvelados en el presente documento;  
50 las Figuras 5A-5D son representaciones esquemáticas de la formación de sedimentos por rotación de tubo de ensayo;  
la Figura 6 es una representación gráfica de una comparación de la señal indicadora de 4,4-dipiridilo (DPY) en tampón, plasma y sangre lisada con y sin reactivo (rcts) de lisado;  
55 la Figura 7 es un diagrama esquemático representativo de un ensayo desvelado que usa un procedimiento de amplificación de señal;

las Figuras 8A y 8B son una comparación de inmunoensayos basados en líquidos realizados con reactivos idénticos en ausencia (8A) y presencia (8B) del procedimiento de amplificación de señal desvelado;

la Figura 9 es un diagrama esquemático representativo del procedimiento de amplificación desvelado en un formato de detección de polinucleótidos;

las Figuras 10A y 10B presentan resultados de un ensayo de hibridación de ADN en ausencia (10A) y presencia (10B) del procedimiento de amplificación de señal desvelado;

las Figuras 11A y 11B muestran que puede asignarse erróneamente una señal aleatoria a variables de entrada debido al alineamiento engañoso de características. Se ajustó el ruido aleatorio distribuido de forma normal con una desviación estándar de 10.000 usando una rutina de mínimos cuadrados. En este ejemplo, se asignó al marcador 4 un peso de 0,5 para equilibrar los pesos negativos de otros marcadores;

las Figuras 12A y 12B muestran espectros de referencia representativos obtenidos en solución (A) y en un sedimento de partículas magnéticas (B). El pico del marcador 5 (cerca de 865 nm) en relación con un marcador 1 es mayor en el sedimento, y la forma del pico a 880 nm es ligeramente diferente.

La Figura 13 es una representación gráfica de estimaciones de la concentración para uno de cinco marcadores en un experimento múltiple. El nivel de concentración 20 se corresponde con  $2,5E8$  partículas de marcador/ml. Las estimaciones usando espectros de referencia basados en sedimentos (rombos cerrados) muestran mejor exactitud y precisión, especialmente a menores concentraciones, que los espectros de referencia basados en solución (círculos abiertos). La línea recta muestra una relación 1:1 (los puntos de datos basados en solución se compensan a partir de los puntos basados en sedimentos en el eje x para claridad);

la Figura 14 muestra una micrografía electrónica de transmisión (TEM) de una estructura satélite según una realización del objeto desvelado;

la Figura 15 ilustra un ensayo de tipo sándwich usando una estructura satélite para amplificar una señal de analito según el objeto desvelado;

la Figura 16A representa un ensayo de sándwich usando una estructura satélite para amplificar una señal de analito según el objeto desvelado, y la Figura 16B muestra el ensayo de sándwich de la Figura 16A después de la aplicación de un campo magnético;

la Figura 17 ilustra una sección transversal de una partícula compuesta de núcleo-cubierta según el objeto desvelado;

la Figura 18A es un dibujo que muestra una vista lateral de un tubo de ensayo según el objeto desvelado; la Figura 18B es un dibujo que muestra una vista lateral en sección transversal tomada a lo largo de la sección A-A del tubo de ensayo mostrado en la Figura 18A; la Figura 18C es un dibujo que muestra una vista inferior del tubo de ensayo mostrado en la Figura 18A;

la Figura 19A es un dibujo que muestra una vista lateral de un imán situado adyacente y debajo de un tubo de ensayo según el objeto desvelado; la Figura 19B es un dibujo que muestra una vista desde arriba del imán y tubo de ensayo mostrado en la Figura 19A; y

la Figura 20 es una gráfica que ilustra una curva de unión de ensayo de hormona estimulante de la tiroides (TSH) usando un tubo de ensayo según el objeto desvelado.

### **Descripción detallada**

El procedimiento de la invención se describirá ahora más completamente en lo sucesivo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunos, pero no todos, de los procedimientos desvelados. Muchas modificaciones del procedimiento desvelado expuesto en el presente documento se le ocurrirán a un experto en la materia a la que se refiere el procedimiento desvelado que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las anteriores descripciones y los dibujos asociados. Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, solo se usan en un sentido genérico y descriptivo y no para fines de limitación.

Los términos "un", "una", "el" y "la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por lo tanto, por ejemplo, referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de muestras, a no ser que el contexto claramente indique lo contrario (por ejemplo, una pluralidad de muestras), etc. En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" se usan en un sentido no exclusivo, excepto donde el contexto requiera otra cosa.

Además, cuando se proporciona una cantidad, concentración u otro valor o parámetro como o bien un intervalo, intervalo preferido, o bien una lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, debe entenderse que esto desvela específicamente todos los intervalos formados de cualquier par de límite de intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, independientemente de si los intervalos se desvelan por separado. Donde se enumera en el presente documento un intervalo de valores numéricos, a no ser que se establezca de otro modo, se pretende que el intervalo incluya los puntos finales de los mismos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo.

### **I. ENSAYOS QUE USAN PARTÍCULAS ACTIVAS EN SERS**

Se desvela un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia o cantidad de un analito o ligando de interés en una muestra biológica. El procedimiento desvelado es para realizar ensayos de diagnóstico usando nanopartículas activas en SERS.

Como se describe en más detalle posteriormente en el presente documento, las capacidades de detección de los ensayos desvelados se mejoran de una o más maneras sobre ensayos conocidos en la técnica. Estas mejoras incluyen un aumento de la intensidad de señal, especificidad potenciada, mayor exactitud, repetibilidad mejorada y combinaciones de los mismos. Los ensayos desvelados también pueden proporcionar resultados de diagnóstico en un periodo de tiempo más corto que los ensayos conocidos en la técnica. Tales mejoras, bien solas o bien en combinación, permiten el uso de los procedimientos desvelados en aplicaciones, tales como ensayos de diagnóstico usando espectroscopia de Raman como un procedimiento de detección, obtención de imágenes ópticas de tejidos y otras aplicaciones, donde se requieran tales mejoras.

Cuando se usan en un ensayo de diagnóstico, las características potenciadas observadas para los procedimientos desvelados permiten la detección de biomarcadores, que incluyen proteínas, polinucleótidos y metabolitos, a concentraciones menores que las medibles usando procedimientos de SERS conocidos en la técnica, y también permiten la detección de células (por ejemplo, organismos completos). Estas características potenciadas también son beneficiosas en aplicaciones en las que la señal de Raman tiene que atravesar, es decir, se transmite a través de, un medio complejo, tal como sangre completa o suero. Además, pueden requerirse ensayos de diagnóstico con características potenciadas para la detección temprana de una afección o una patología en un sujeto.

#### A. Visión de conjunto general: Espectroscopia de Raman potenciada en superficie

Cuando una molécula se irradia con fotones de una frecuencia particular, los fotones se dispersan. La mayoría de los fotones incidentes se dispersan de forma elástica sin un cambio de frecuencia (dispersión de Rayleigh), mientras que una pequeña fracción de los fotones incidentes (aproximadamente 1 de cada  $10^6$ ) interactúan con un modo vibracional de la molécula irradiada y se dispersan de forma inelástica. Los fotones dispersados de forma inelástica cambian de frecuencia y tienen o bien una frecuencia mayor (anti-Stokes) o bien una frecuencia menor (Stokes). Representando la frecuencia de los fotones dispersados de forma inelástica frente a su intensidad, se observa un espectro de Raman único de la molécula. La baja sensibilidad de la espectroscopia de Raman convencional, sin embargo, ha limitado su uso para caracterizar muestras biológicas en las que el (los) analito(s) diana normalmente están presentes en pequeñas cantidades.

Cuando se adsorbe una molécula activa en Raman sobre o en estrecha proximidad a, por ejemplo, dentro de una distancia de 50 Å de, una superficie metálica, puede potenciarse la intensidad de una señal de Raman que surge de la molécula activa en Raman. Por ejemplo, se ha informado hasta la fecha de aumentos en la señal de Raman en un factor de  $10^3$  a  $10^6$ , o en algunos casos,  $10^{14}$ . Esta potenciación se denomina efecto de dispersión de Raman potenciado en superficie (SERS). El efecto de SERS se informó por primera vez en 1974 por Fleischman y col., que observaron la dispersión de Raman intensa de la piridina adsorbida sobre una superficie de electrodo de plata áspera (véase Fleischman y col., "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode", *Chem. Phys. Lett.*, 26, 163 (1974); véase también Jeanmaire, D. L., y Van Dyne, R. P., "Surface Raman spectroelectrochemistry. 1. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines absorbed on anodized silver electrode." *J. Electroanal. Chem.*, 84(1), 1-20 (1977); Albrecht, M. G., y Creighton, J. A., "Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode", *J.A.C.S.*, 99, 5215-5217 (1977)). Desde entonces, se ha observado SERS para varias moléculas diferentes adsorbidas sobre la superficie de superficies metálicas (véase, por ejemplo, A. Campion, A. y Kambhampati, P., "Surface-enhanced Raman scattering", *Chem. Soc. Rev.*, 27, 241 (1998)).

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

El efecto de SERS puede observarse con moléculas activas en Raman adsorbidas sobre o en estrecha proximidad a partículas coloidales metálicas, películas metálicas en sustratos dieléctricos y matrices de partículas metálicas, que incluyen nanopartículas metálicas. Por ejemplo, Kneipp y col., informaron de la detección de moléculas individuales de un colorante, violeta cresilo, adsorbidas sobre grupos agregados de nanopartículas de plata coloidales (véase Kneipp, K. y col., "Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)", *Phys. Rev. Lett.*, 78(9), 1667-1670 (1997)). Ese mismo año, Nie y Emory observaron la señal de espectroscopia de Raman de resonancia potenciada en superficie (SERRS), en la que la resonancia entre la energía de absorción de la molécula activa en Raman y la de la nanopartícula produce una potenciación de hasta  $10^{10}$  a  $10^{12}$ , de una molécula colorante adsorbida sobre una única nanopartícula de plata, en la que las nanopartículas oscilaron de esféricas a tipo bastón y tuvieron una dimensión de 100 nm (véanse Nie, S., y Emory, S. R., "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering", *Science*, 275, 1102-1106 (1997); Emory, S. R., y Nie, S., "Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles", *Anal. Chem.*, 69, 2631 (1997)).

Una partícula potenciadora de Raman que tiene asociado con la misma, por ejemplo, adsorbida sobre o unida con, una molécula(s) activa(s) en SERS se denomina en el presente documento una "partícula activa en SERS". Más particularmente, una partícula activa en SERS, como se refiere en el presente documento, incluye una partícula que tiene una superficie que induce, produce, o soporta de otro modo la dispersión de la luz de Raman potenciada en superficie (SERS) o la dispersión de la luz de Raman de resonancia potenciada en superficie (SERRS). Varias

superficies son capaces de producir una señal de SERS, que incluye superficies ásperas, superficies texturizadas y otras superficies, incluyendo superficies lisas.

La "dispersión de Raman" se refiere en general a la dispersión inelástica de un fotón incidente en una molécula. Los fotones que se dispersan de forma inelástica tienen una frecuencia óptica ( $\nu_0$ ), que es diferente a la frecuencia de la luz incidente ( $\nu_i$ ). La diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre la luz incidente y la luz dispersada de forma inelástica puede representarse como  $(\Delta E) = h|\nu_0 - \nu_i|$ , en la que  $h$  es la constante de Planck, y se corresponde con energías que son absorbidas por la molécula. La radiación incidente puede ser de cualquier frecuencia  $\nu_0$ , pero normalmente es radiación monocromática en la región del espectro visible o infrarrojo cercano. La diferencia absoluta  $\nu_0 - \nu_i$  es una frecuencia infrarroja, es decir, vibracional. Más particularmente, el proceso que produce luz de frecuencia distinta de  $\nu_0$  se denomina "dispersión de Raman". La frecuencia  $\nu_i$  de la radiación con "dispersión de Raman" puede ser superior o inferior a  $\nu_0$ , pero la cantidad de luz con frecuencia  $\nu_i < \nu_0$  (radiación de Stokes) es mayor que aquella con la frecuencia  $\nu_i > \nu_0$  (radiación anti-Stokes).

Como se usa en el presente documento, el término "radiación" se refiere a energía en forma de radiación electromagnética que puede inducir dispersión de Raman potenciada en superficie en una muestra en ensayo, por ejemplo, una muestra que comprende una nanopartícula activa en SERS que tiene una o más moléculas indicadoras activas en SERS asociadas con la misma. Más particularmente, el término "radiación" se refiere a energía en forma de radiación electromagnética que provoca que la superficie de una nanopartícula induzca, emita, soporte o de otro modo provoque dispersión de la luz, por ejemplo, dispersión de Raman, en una molécula indicadora próxima a la superficie de nanopartícula. Como se usa en el presente documento, una "molécula indicadora" se refiere a cualquier molécula o compuesto químico que es capaz de producir un espectro de Raman cuando se ilumina con radiación de una longitud de onda apropiada. Una "molécula indicadora" también puede referirse en el presente documento como "marcador", "colorante", "molécula activa en Raman" o "molécula activa en SERS", cada uno de los cuales puede usarse indistintamente. La "dispersión de Raman potenciada en superficie" o "SERS" se refiere al fenómeno que se produce cuando la señal de dispersión de Raman, o intensidad, se potencia cuando una molécula activa en Raman se adsorbe sobre o en estrecha proximidad a, por ejemplo, dentro de 50 Å de, una superficie metálica.

"Dispersión de Raman de resonancia potenciada en superficie" o "SERRS" se refiere a una señal de SERS aumentada que se produce cuando la molécula indicadora en estrecha proximidad a la superficie de nanopartícula activa en SERS está en resonancia con la longitud de onda de excitación.

## *B. Nanopartículas representativas adecuadas para su uso con los procedimientos actualmente desvelados*

### *1. Nanopartículas en general*

Cualquier partícula activa en SERS es adecuada para su uso en los procedimientos desvelados. Tales partículas activas en SERS normalmente son nanopartículas y también se denominan "nanomarcadores". Como se usa en el presente documento, los términos "nanopartícula", "nanoestructura", "nanocristal", "nanomarcador" y "nanocomponente" se usan indistintamente y se refieren a una partícula que tiene al menos una dimensión en el intervalo de 1 nm a 1000 nm, que incluye cualquier valor de número entero entre 1 nm y 1000 nm (incluyendo 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 y 1000 nm). La nanopartícula puede ser una nanopartícula metálica. La nanopartícula puede ser una partícula esférica, o una partícula sustancialmente esférica que tiene un diámetro del núcleo entre 2 nm y 200 nm (incluyendo 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 200 nm). La nanopartícula puede tener un diámetro del núcleo entre 2 nm y 100 nm (incluyendo 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 nm) y algunas veces entre 20 nm y 100 nm (incluyendo 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 nm). Un experto habitual en la técnica, tras la revisión del objeto desvelado, reconocería que una nanopartícula adecuada para su uso con los ensayos desvelados puede incluir un núcleo, por ejemplo, un núcleo metálico, que induce el efecto de Raman, y puede incluir además una o más capas de materiales activos en SERS, encapsulantes y/o estructuras de cubierta exterior que también pueden contribuir al tamaño, por ejemplo, diámetro total de la estructura de la nanopartícula.

Las nanopartículas activas en SERS adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados normalmente comprenden al menos un metal, es decir, al menos un elemento seleccionado de la tabla periódica de los elementos que se conoce habitualmente como un metal. Metales adecuados incluyen metales del grupo XI, tales como Cu, Ag y Au, o cualquier otro metal conocido por los expertos en la materia que apoye la SERS, tales como metales alcalinos. En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende sustancialmente un único elemento metálico. Por ejemplo, la preparación de nanopartículas de oro se describe en Frens, G., Nat. Phys. Sci., 241, 20 (1972). La nanopartícula comprende una combinación de al menos dos elementos, tal como una aleación, por ejemplo, una aleación binaria. La nanopartícula puede ser magnética.

El metal puede incluir un componente adicional, tal como en una partícula de núcleo-cubierta de Au<sub>2</sub>S/Au. Se ha informado que las partículas de núcleo-cubierta de Au<sub>2</sub>S/Au tienen resonancia óptica de IR cercano ampliamente ajustable (véase Averitt, R. D., y col., "Ultrafast optical properties of gold nanoshells", JOSA B, 16(10), 1824-1832

(1999)). Además, pueden usarse partículas de núcleo de Ag/cubierta de Au, tales como las descritas en Cao, Y. W., y col., "DNA-modified core-shell Ag/Au nanoparticles", J. Am. Chem. Soc., 123(32), 7961-7962 (2001), o partículas de núcleo de Au/cubierta de Ag, o cualquier combinación de núcleo-cubierta que implique metales activos en SERS. Otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas de núcleo-cubierta también son adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados, que incluye coloides de sílice/alúmina funcionalizados con Au o Ag, coloides de TiO<sub>2</sub> funcionalizados con Au o Ag, nanopartículas de Au terminadas con nanopartícula de Au (véase, por ejemplo, Mucic, y col., "DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials", J. Am. Chem. Soc., 120(48), 12674 (1998)); coloides de TiO<sub>2</sub> terminados con nanopartícula de Au; y partículas que tienen un núcleo de Si con una cubierta metálica (es decir, "nanocubiertas"), tales como coloides de SiO<sub>2</sub> terminados con plata o coloides de SiO<sub>2</sub> terminados con oro (véase, por ejemplo, Jackson, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(52): 17930-5 (2004); véanse también las patentes de EE.UU. N.º 6.344.272 y 6.685.986 de Oldenburg y col.). Se ha descrito el uso de tales nanocubiertas en aplicaciones de biodetección (véase la patente de EE.UU. N.º 6.699.724 de West y col.). Otra clase de nanopartículas adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados incluye nanopartículas que tienen una superficie interna. Tales nanopartículas incluyen partículas huecas y nanocristales huecos o nanopartículas porosas o semiporosas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.913.825 de Ostafin y col.). En consecuencia, el objeto desvelado también proporciona una nanopartícula que comprende una partícula activa de núcleo-cubierta para SERS o una nanopartícula hueca activa para SERS. Tales nanopartículas pueden mostrar una señal de SERS mejorada.

Aunque se reconoce que la forma de la partícula y la relación de aspecto pueden afectar a las características físicas, ópticas y electrónicas de las nanopartículas, la forma específica, la relación de aspecto o la presencia/ausencia del área superficial interna no alteran la cualificación de una partícula como una nanopartícula. En consecuencia, las nanopartículas adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados pueden tener una diversidad de formas, tamaños y composiciones. Además, la nanopartícula puede ser sólida, o como se ha descrito inmediatamente antes en el presente documento, hueca. Ejemplos no limitantes de nanopartículas adecuadas incluyen nanobarras coloidales metálicas huecas o rellenas, nanopartículas magnéticas, paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas e hidrogeles (coloides o barras). Se apreciará por un experto habitual en la técnica que las nanopartículas pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo esféricas, bastones, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanomuelles, nanoanillos, nanopartículas en forma de bastón, nanopartículas en forma de flecha, nanopartículas en forma de lágrima, nanopartículas en forma de tetrápodo, nanopartículas en forma de prisma y una pluralidad de otras formas geométricas y no geométricas.

Además, nanopartículas adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados pueden ser isotrópicas o anisotrópicas. Como se indica en el presente documento, las nanopartículas anisotrópicas tienen una longitud y una anchura. La longitud de una nanopartícula anisotrópica puede ser la dimensión paralela a la abertura en la que se produjo la nanopartícula. La nanopartícula anisotrópica puede tener un diámetro (anchura) de 350 nm o menos. La nanopartícula anisotrópica puede también tener un diámetro (anchura) de 250 nm o menos o un diámetro (anchura) de 100 nm o menos. La anchura de la nanopartícula anisotrópica puede estar entre 15 nm y 300 nm. Además, la nanopartícula anisotrópica tiene una longitud, en la que la longitud está entre 10 nm y 350 nm.

Mucha de la bibliografía sobre SERS (tanto experimental como teórica) sugiere que las partículas anisótropas (bastones, triángulos, prismas) pueden proporcionar una potenciación aumentada de la señal de Raman en comparación con esferas. Por ejemplo, el llamado "efecto antena" predice que se espera que la potenciación de Raman sea mayor en áreas de mayor curvatura. Se han descrito recientemente muchos informes de partículas anisótropas, que incluyen prismas de plata (Ag) y partículas de oro (Au) "ramificadas".

Pueden producirse nanobastones de Au y Ag anisótropos por electrodeposición en moldes de alúmina preformados, de una manera similar a la producción de partículas Nanobarcodes® (véase, por ejemplo, Nicewarner-Pena, S. R., y col., "Submicrometer metallic barcodes", Science, 294, 137-141 (2001); Walton, I. D., y col., "Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy", Anal. Chem. 74, 2240-2247 (2002)). Estas partículas pueden prepararse por la deposición de capas alternas de materiales, normalmente Au y Ag, en moldes de alúmina preformados, y pueden tener un diámetro de 250 nm y una longitud de 6 µm.

## 2. Nanopartículas activas en SERS encapsuladas

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

En consecuencia, una molécula indicadora activa en SERS cuando se fija, por ejemplo, o bien se adsorbe o bien se une covalentemente con una nanopartícula, puede revestirse o encapsularse, por ejemplo, en una cubierta de material diferente, que incluye un polímero, vidrio o material cerámico, y se denominan en el presente documento "nanopartículas activas en SERS encapsuladas". Se describen procedimientos de preparación de nanopartículas activas en SERS encapsuladas en la patente de EE.UU. N.º 6.514.767 de Natan.

Ejemplos de partículas adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados incluyen nanomarcadores Oxonica (Oxonica Inc., Mountain View, California). Los nanomarcadores pueden comprender un núcleo de oro que tiene un diámetro de 50 nm, pueden recubrirse con una molécula indicadora distinta, y pueden encapsularse en un recubrimiento de vidrio protector de 10 nm a 50 nm, un recubrimiento de vidrio protector de 15 nm a 40 nm, un recubrimiento de vidrio protector de 30 nm a 40 nm o un recubrimiento de vidrio protector de 35 nm, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se describen nanomarcadores adicionalmente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.514.767 de Natan; solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 2003/0166297 de Natan y 2005/0158870 de Natan.

Las nanopartículas activas en SERS encapsuladas desveladas pueden incluir una nanopartícula metálica, una submonocapa, monocapa o multicapa de una o más moléculas indicadoras en estrecha proximidad a la superficie de la nanopartícula metálica. La expresión "en estrecha proximidad" pretende indicar dentro de 50 nm o menos de una superficie externa de la nanopartícula. Una nanopartícula que tiene una submonocapa, monocapa o multicapa de una o más moléculas indicadoras unidas a una superficie externa del núcleo de la nanopartícula también puede incluir una cubierta de encapsulación. En tales realizaciones, la molécula indicadora se sitúa en una interfase entre la superficie externa de la nanopartícula metálica y una superficie interna de la cubierta de encapsulación.

El núcleo de nanopartícula que comprende la nanopartícula encapsulada puede ser una esfera metálica, por ejemplo, una esfera de oro, plata o cobre, que tiene un diámetro de 20 nm a 200 nm. El núcleo de nanopartícula puede comprender un esferoide metálico achatado o alargado. El diámetro del núcleo de nanopartícula puede seleccionarse basándose, en parte, en la longitud de onda de la luz incidente. La cubierta de encapsulación puede comprender un material dieléctrico, tal como un polímero, vidrio, metal, óxidos metálicos, tales como  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SnO}_2$ , sulfuras metálicos o un material cerámico. El encapsulante puede ser vidrio, por ejemplo,  $\text{SiO}_x$ . Para encapsular las nanopartículas activas en SERS desveladas en vidrio, los núcleos de nanopartículas metálicas pueden tratarse con una imprimación de vidrio, es decir, un material que puede conducir al crecimiento de un revestimiento uniforme de vidrio, o pueden mejorar la adhesión del revestimiento de vidrio con la partícula, o ambos. Puede hacerse crecer vidrio por lo tanto sobre la nanopartícula metálica por técnicas convencionales conocidas en la técnica.

El proceso de encapsulación puede llevarse a cabo después de, o durante, la unión o adsorción de una o más moléculas indicadoras con la nanopartícula núcleo. De esta manera, el colorante es secuestrado del disolvente circundante como un recubrimiento en la superficie del núcleo de nanopartícula metálica. Tal configuración proporciona al núcleo de nanopartícula una actividad de SERS estable. El colorante puede formar una submonocapa, una monocapa completa, o un ensamblaje de multicapa en la superficie del núcleo de nanopartícula metálica. La capa de colorante puede comprender un único colorante o puede ser una mezcla de diferentes colorantes.

Por lo tanto, una molécula indicadora activa en SERS puede formar una capa en la superficie externa del núcleo de nanopartícula, en el que la capa cubre al menos parcialmente la superficie externa del núcleo de nanopartícula y se define por una superficie interna y una superficie externa. El encapsulante se dispone en al menos uno de la superficie externa del núcleo de nanopartícula y la superficie externa de la capa de la molécula indicadora activa en SERS para rodear al menos parcialmente el núcleo de nanopartícula que está al menos parcialmente cubierto con una capa de la molécula indicadora activa en SERS.

Además, el encapsulante puede estar modificado, por ejemplo, derivatizado por técnicas convencionales conocidas en la técnica, para unir moléculas, que incluyen biomoléculas, con su superficie externa. Esta característica permite que las nanopartículas activas en SERS encapsuladas desveladas se conjuguen con moléculas, que incluyen biomoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, o con soportes sólidos sin interferencia con la actividad de Raman del colorante. El vidrio y otros materiales adecuados para su uso como una cubierta de encapsulación contienen grupos funcionales susceptibles a la unión molecular. Por ejemplo, la inmersión de vidrio en una base adecuada permite la unión covalente de alquiltriclorosilanos o alquiltrialcoxisilanos, con funcionalidad adicional disponible en el extremo del grupo alquilo del grupo alquiltriclorosilano o alquiltrialcoxisilano. Uno o más de un grupo aminoalquiltrialquiloisilano, un grupo mercaptoalquiltrialcoxisilano o un grupo carboxialquiltrialcoxisilano pueden unirse covalentemente con la superficie de vidrio.

Por lo tanto, pueden modificarse las superficies de vidrio con muchas formas de biomoléculas y superestructuras biomoleculares, que incluyen células, así como óxidos, metales y polímeros.

Asimismo, las superficies de vidrio pueden modificarse con capas monomoleculares bien organizadas. En consecuencia, los recubrimientos de vidrio soportan muchos tipos de funcionalización química (también denominada en el presente documento "derivatización"). También pueden funcionalizarse otras formas de encapsulantes. En consecuencia, las nanopartículas desveladas pueden fijarse a cualquier especie conocida en la técnica que tenga una funcionalidad químicamente reactiva.

El espesor del encapsulante puede variarse dependiendo de las propiedades físicas requeridas de la nanopartícula activa en SERS. Las propiedades físicas, tales como el coeficiente de sedimentación, pueden verse afectadas por el espesor del encapsulante. En general, cuanto más grueso sea el encapsulante, más eficaz será el secuestro de los colorantes activos en SERS en el núcleo de nanopartícula metálica del disolvente circundante.

En caso de que el encapsulante sea vidrio, el espesor del vidrio normalmente puede oscilar de 1 nm a 50 nm. Las nanopartículas activas en SERS encapsuladas pueden comprender nanopartículas de oro que tienen un diámetro que oscila de 50 nm a 100 nm encapsuladas en una esfera de vidrio que tiene un espesor que oscila de 10 nm a 50 nm; de 15 nm a 40 nm; o 35 nm. La optimización de las dimensiones de las nanopartículas activas en SERS encapsuladas desveladas puede llevarse a cabo por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, se conoce en la técnica que las nanopartículas de núcleo-cubierta (por ejemplo, nanopartículas de Au/AuS) soportan SERS y tienen diferentes propiedades ópticas en comparación con nanopartículas metálicas puras. Asimismo, se sabe en la técnica que SERS de esferoides alargados puede potenciarse en relación con esferas con el mismo eje principal. Además, se sabe que las mejoras de partículas individuales son dependientes de la longitud de onda. Por lo tanto, el tamaño de partícula puede "ajustarse" para conseguir una señal de SERS máxima para una longitud de onda de excitación dada. En consecuencia, la composición de la partícula, o su tamaño o forma, pueden alterarse según el objeto desvelado para optimizar la intensidad de la señal de SERS.

Las nanopartículas activas en SERS encapsuladas desveladas son fáciles de manipular y almacenar. Además, también son resistentes a la agregación, estabilizadas contra la descomposición del colorante en disolventes y aire, son químicamente inertes y pueden concentrarse, por ejemplo, por técnicas de sedimentación magnética, y volver a dispersarse sin pérdida de actividad SERS.

Como se describe en más detalle posteriormente en el presente documento, el objeto desvelado también proporciona nanopartículas más especializadas capaces de potenciar un ensayo usando partículas activas en SERS.

### 3. Moléculas indicadoras

Las moléculas indicadoras pueden ser cualquier molécula que proporcione una señal de Raman tras su exposición a irradiación apropiada. Una "molécula indicadora" se refiere a cualquier molécula o compuesto químico que sea capaz de producir una señal de Raman. Una "molécula indicadora" también puede denominarse en el presente documento "marcador", "colorante", "molécula activa en Raman" o "molécula activa en SERS", cada una de las cuales puede usarse indistintamente.

Se conocen varias moléculas indicadoras distintas con fuertes espectros de Raman y pueden usarse para crear "sabores" distintos de partículas activas en SERS para permitir capacidades de multiplicación (el término "sabores" indica partículas que proporcionan distintas identificaciones de Raman tras la irradiación). Tales partículas normalmente son capaces de actuar en la región de longitud de onda de infrarrojo cercano (NIR), son detectables en sangre completa y son fotoestables. Además, pueden excitarse varios "sabores" distintos con una única longitud de onda.

#### C. Sondas de captura representativas

Pueden inmovilizarse sondas de captura, tales como anticuerpos o sondas de ADN, sobre el revestimiento de vidrio protector usando técnicas de bioconjugación conocidas. Una ventaja de este enfoque es que la molécula indicadora generadora de señal de SERS se asegura en estrecha proximidad a la superficie del oro y se protege por el revestimiento de vidrio del ataque biológico o químico. Además, se elimina la unión competitiva entre la molécula indicadora y la sonda de captura, permitiendo una cobertura de superficie máxima de la molécula indicadora en la superficie del núcleo de nanopartícula y la sonda de captura en la superficie de vidrio, respectivamente.

Más generalmente, pueden funcionalizarse nanopartículas activas en SERS con una molécula, tal como un miembro de unión específico de un par de unión, que puede unirse con un analito diana. El acontecimiento de unión crea una señal detectable, que es indicativa de la presencia y/o cantidad de un analito. La señal detectable puede corresponderse con una detección localizada de un marcador de SERS o puede representarse por un desplazamiento de la longitud de onda detectable en el espectro de SERS.

El uso de una nanopartícula activa en SERS funcionalizada tiene varias ventajas con respecto a nanopartículas no funcionalizadas. Primera, el grupo funcional proporciona un grado de especificidad a la nanopartícula proporcionando una interacción específica con un analito diana. Segunda, el analito diana no tiene que ser activo en Raman en sí mismo; su presencia puede determinarse midiendo el espectro de SERS del colorante activo en Raman unido con la nanopartícula. Tales mediciones se denominan en el presente documento "detección indirecta", en la que la presencia o ausencia de un analito diana o ligando en una muestra biológica se determina detectando una señal de SERS que no emana directamente del analito diana o ligando de interés. Pueden funcionalizarse nanopartículas activas en SERS adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados para unirse con un analito diana de al menos dos maneras diferentes. La molécula indicadora activa en SERS, es decir, un colorante activo en SERS, puede conjugarse con un miembro de unión específico de un par de unión, o puede unirse directamente un miembro de unión específico de un par de unión con la nanopartícula. En caso de que el núcleo de nanopartícula esté al menos parcialmente rodeado por una cubierta de encapsulación, el miembro de unión puede unirse con una superficie externa de la cubierta de encapsulación. Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a una molécula que comprende dos o más subunidades unidas entre sí, opcionalmente a través de un grupo de enlace, para formar una única estructura molecular. La unión puede hacerse

o bien por un enlace químico directo entre las subunidades o bien a través de un grupo de enlace. Tal unión en un conjugado normalmente es irreversible.

5 Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de atracción entre un miembro de unión con otro miembro de un par de unión en un sitio de unión particular. El término "especificidad", y derivaciones del mismo, se refiere a la probabilidad de que un miembro de unión se una con otro miembro de un par de unión. Tal unión entre un miembro de unión, por ejemplo, una proteína de unión, y otro miembro de unión de un par de unión, por ejemplo, un ligando o un analito, puede ser reversible.

10 La expresión "miembro de unión específico" se refiere a una molécula para la que existe al menos una molécula de unión complementaria separada. Un miembro de unión específico es una molécula que se une, se fija o se asocia de otro modo con una molécula específica. La unión, fijación o asociación puede ser química o física. Una molécula específica con la que se une un miembro de unión específico puede ser cualquiera de una diversidad de moléculas, que incluyen antígenos, haptenos, proteínas, hidratos de carbono, secuencias de nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos y enzimas. Además, un miembro de unión específico de un tipo particular se unirá con un tipo de molécula particular. En tales casos, los miembros de unión específicos se denominan "par de unión específica".  
15 En consecuencia, un anticuerpo se unirá específicamente con un antígeno. Otros pares de unión específicos incluyen avidina y biotina, hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, secuencias de péptidos complementarias, enzimas y cofactores enzimáticos.

#### *1. Nanopartículas activas en SERS que tienen un miembro de unión específico de un par de unión unido directamente al mismo*

20 Un miembro de unión de un par de unión específica, por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, puede unirse directamente con la superficie de la nanopartícula. Por ejemplo, un miembro de unión específico de un par de unión, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, puede tratarse con un conector, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y unirse directamente con la nanopartícula a través del conector de PEG.

25 Como se apreciaría por un experto habitual en la materia, la selección del conector puede determinarse por diversos factores que dependen de los objetivos del ensayo. Por ejemplo, el uso de PEG como un conector puede estabilizar la orientación del anticuerpo de modo que el epítipo del antígeno apunta fuera de la superficie de la nanopartícula. De esta manera, la nanopartícula funcionalizada puede diseñarse para maximizar la presentación del epítipo u otra región de unión con la solución de prueba, aumentando potencialmente de este modo la sensibilidad del ensayo.

30 Dependiendo del miembro de unión, pueden usarse otros conectores. Por ejemplo, pueden usarse alcanotioles como conectores para anticuerpos y péptidos. Pueden usarse alcanotioles de cadena corta, incluyendo N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) y N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) como conectores después de la desprotección de sulfhidrilo. Otras propiedades también pueden determinar la elección de conector, tal como la longitud de la cadena de conector. Por ejemplo, puede ser deseable PEG porque también actúa para proteger la superficie del reactivo y es flexible, que puede potenciar la capacidad del reactivo para unirse con el analito de  
35 interés.

Un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo, también puede modificarse con un conector, tal como un conector de PEG tiolado, y unirse con la nanopartícula.

#### *2. Miembros de unión representativos*

40 El miembro de unión conjugado con la nanopartícula activa en SERS desvelada, bien mediante la molécula indicadora activa en SERS o directamente unido con una superficie externa de la nanopartícula en sí misma, puede comprender un polipéptido o proteína, tal como una proteína de unión a glucosa. Miembros de unión representativos incluyen miembros de unión específicos que tienen una afinidad por un analito diana, que incluye ácidos nucleicos, dominios de proteína, fragmentos de anticuerpos, células y anticuerpos para analitos diana, tales como antígeno específico de la próstata (PSA), isoenzima creatina cinasa MB (CKMB), proteína troponina cardíaca I (cTnI),  
45 hormona estimulante de la tiroides (TSH), antígeno de la gripe A (Flu A), antígeno de la gripe B (Flu B) y antígeno de virus respiratorio sincitial (VRS). Se conocen en la técnica anticuerpos para tales analitos diana.

El analito y el miembro de unión pueden actuar como componentes de unión. El término "se asocia" o "se une", como se usa en el presente documento, se refiere a componentes de unión que tienen una constante de unión relativa (Kd) suficientemente fuerte para permitir la detección de unión con la proteína por un medio de detección. La Kd puede calcularse como la concentración de analito libre a la que está unida la mitad de la proteína, o viceversa. Cuando el analito de interés es glucosa, los valores de Kd para los componentes de unión son entre 0,0001 mM y 50 mM.

#### *D. Ensayos de diagnóstico en general*

55 Pueden usarse nanopartículas activas en SERS en ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, Rohr y col., demostraron un inmunoensayo con detección de SERS que incluía múltiples componentes y etapas de lavado (véase Rohr, T. E., y col., "Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy", Anal. Biochem., 182: 388 (1989)).

Además, Ni y col., demostraron unión del indicador con un portaobjetos de oro en un ensayo de detección heterogéneo que incluía etapas de incubación y lavado (véase Ni, J., y col., "Immunoassay Readout Method Using Extrinsic Raman Labels Adsorbed on Immunogold Colloids", *Anal. Chem.*, 71: 4903 (1999)). Los ensayos de SERS desvelados por Rohr y col., y Ni y col., así como otros conocidos en la técnica, requieren incubaciones y etapas de lavado largas.

Otro ejemplo de un ensayo usando SERS se desvela en la patente de EE.UU. N.º 5.266.498 de Tarcha y col. Tarcha y col. desvelan el uso de un sistema de múltiples reactivos en el que se une un marcador o anticuerpo con una superficie de SERS. Un segundo reactivo contiene el par complementario bien del marcador o bien del anticuerpo.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden usarse como marcadores ópticos en ensayos biológicos. Una molécula diana, por ejemplo un antígeno, que va a ser detectada puede ser capturada por un primer componente de unión unido con una superficie sólida. Un segundo componente de unión, también específico para la molécula diana, puede unirse con una nanopartícula activa en SERS. Cuando está presente un analito, tanto el primer como el segundo componentes de unión se unirán a la diana, formando de este modo un sándwich de nanopartícula activa en SERS-diana-superficie sólida. La superficie sólida puede ser, por ejemplo, un sustrato inmóvil o una partícula móvil.

#### *E. Ensayos basados en líquidos*

Se han desvelado previamente enfoques de ensayos basados en líquidos usando nanopartículas activas en SERS (véase, por ejemplo, Hirsch y col., "A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells", *Anal. Chem.*, 75 (10), 2377-2381 (2003)). Hirsch y col., desvelan la detección óptica de la agregación de partículas en presencia de un analito de interés midiendo los cambios de absorción óptica debidos a interacciones de partículas. La agregación de las nanopartículas en el ensayo desvelado por Hirsch y col. detecta la reducción de la resonancia de plasmón que se produce como resultado de la agregación de partículas. Hirsch y col., sin embargo, no desvelan el uso de señales de Raman para la detección.

En los ensayos desvelados, pueden usarse partículas activas en SERS en un ensayo denominado "sin lavado" u "homogéneo". En un ensayo tal, se recoge una muestra en un recipiente, por ejemplo, un recipiente de recogida de especímenes, un frasco de ensayo, u otro recipiente de muestras adecuado para su uso con los ensayos desvelados, y el ensayo se realiza sin la necesidad de retirar la muestra del recipiente, por ejemplo, un frasco de ensayo. Ventajosamente, la muestra puede recogerse en un recipiente que ya puede contener todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo. Sin embargo, pueden añadirse uno o más reactivos al recipiente después de la recogida de especímenes. Se describen recipientes representativos adecuados para su uso con los ensayos desvelados en más detalle en la Sección III posteriormente en el presente documento.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas también pueden usarse en ensayos heterogéneos. Como se usa en el presente documento, la expresión "ensayo heterogéneo" se refiere en general a un ensayo en el que uno o más componentes del ensayo se añaden o retiran del ensayo secuencialmente. Más particularmente, un ensayo heterogéneo puede basarse, en parte, en la transferencia de analito de una muestra líquida a una fase sólida por la unión del analito durante el ensayo con la superficie de la fase sólida. En algún estadio del ensayo, cuya secuencia varía dependiendo del protocolo de ensayo, la fase sólida y la fase líquida se separan y se realiza la determinación que conduce a la detección y/o cuantificación del analito en una de las dos fases separadas.

Por lo tanto, un ensayo heterogéneo, por ejemplo, puede incluir un soporte sólido recubierto con un antígeno o anticuerpo que se une con un analito de interés y de este modo separa o retira el analito de otros componentes en la muestra que se ensaya. Estos otros componentes pueden retirarse de forma selectiva de la muestra por una o más etapas de lavado y el analito permanece unido al soporte sólido, en el que se detecta, o puede retirarse por una etapa de lavado adicional y posteriormente detectarse.

En ensayos basados en líquidos, la muestra normalmente se incuba, por ejemplo, en condiciones ambientales, pero también es posible proporcionar condiciones controladas, tales como una temperatura específica o balanceo de la muestra. Después del periodo de incubación, el recipiente puede entonces colocarse en un lector para obtener una señal de una o más partículas activas en SERS que se precargaron o se añadieron posteriormente al recipiente. Se produce una señal de Raman, y se detecta, tras la exploración por radiación incidente de una longitud de onda particular, por ejemplo, radiación láser.

#### *1. Analito(s) diana de interés inmovilizados en superficie*

En ensayos basados en líquidos, el (los) analito(s) diana de interés pueden especímenes, por ejemplo, en un área localizada de un soporte sólido, tal como una superficie interna funcionalizada de un recipiente, por ejemplo, un recipiente de recogida de especímenes o frasco de ensayo. El (Los) analito(s) diana inmovilizados de interés pueden entonces ponerse en contacto con un reactivo de detección que comprende nanopartículas activas en SERS conjugadas con un miembro de unión específico, por ejemplo, un anticuerpo, que tiene una afinidad por el (los) analito(s) diana de interés. Las nanopartículas activas en SERS pueden interaccionar o asociarse con, por ejemplo, unirse de forma reversible o irreversible con, el (los) analito(s) diana inmovilizado(s) de interés.

Después de un tiempo de incubación adecuado, esta interacción entre la nanopartícula activa en SERS y el (los) analito(s) diana inmovilizado(s) puede detectarse iluminando el área localizada del soporte sólido con radiación incidente de la longitud de onda apropiada y midiendo la señal de SERS emitida por la molécula indicadora activa en SERS. Además, debido a que cada tipo de molécula indicadora activa en SERS presenta un espectro de SERS único, puede usarse un único espectro de SERS para detectar una pluralidad de analitos diana de interés incluyendo nanopartículas activas en SERS que comprenden diferentes moléculas indicadoras activas en SERS en el reactivo de detección. En consecuencia, las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden usarse en formatos de ensayo múltiples.

## 2. Selección y uso de indicadores

Las moléculas indicadoras preferentemente presentan espectros de Raman relativamente simples con anchuras de línea estrechas. Esta característica permite la detección de varias especies activas en Raman diferentes en el mismo volumen de muestra. En consecuencia, esta característica permite fabricar múltiples nanopartículas activas en SERS, incluyendo cada una diferentes colorantes, de modo que el espectro de Raman de cada colorante puede distinguirse en una mezcla de diferentes tipos de nanopartículas. Esta característica permite la detección múltiple de varias especies diana diferentes en un volumen de muestra pequeño. Por lo tanto, las nanopartículas que tienen las moléculas indicadoras asociadas con o unidas a las mismas también son adecuadas para su uso en ensayos químicos múltiples, en los que la identidad de la nanopartícula activa en SERS codifica la identidad de la diana del ensayo.

Tales moléculas indicadoras, cuando se asocian con o se unen con nanopartículas activas en SERS, proporcionan diversidad espectral y resolubilidad en ensayos múltiples. Cada nanopartícula activa en SERS, cuando se acopla con un reactivo específico de diana, puede codificar la identidad de esa molécula diana particular. Además, la intensidad de una señal de Raman particular puede revelar la cantidad de esa molécula diana particular. En consecuencia, pueden usarse nanopartículas activas en SERS en ensayos múltiples para producir información cualitativa y/o cuantitativa con respecto a una molécula diana sin requerir localización sensible a posición de los reactivos.

Un reactivo de detección puede incluir más de un tipo de marcador, por ejemplo, más de un tipo de molécula indicadora activa en SERS, dependiendo de los requisitos del ensayo. Por ejemplo, diferentes tipos de moléculas indicadoras activas en SERS pueden presentar una señal de Raman, es decir, un espectro de Raman o característica espectral de Raman, a diferentes longitudes de onda, y puede usarse para crear una "identificación" de Raman única para un analito de interés específico, potenciando de este modo la especificidad del ensayo. Pueden unirse diferentes moléculas indicadoras con diferentes miembros de unión específicos para proporcionar un reactivo capaz de detectar más de un analito de interés, por ejemplo, una pluralidad de analitos de interés. Además, pueden usarse múltiples moléculas indicadoras para crear una señal de referencia interna que puede usarse para distinguir el ruido de fondo de la detección de señal, particularmente en muestras que presentan o se espera que presenten una señal relativamente débil. Adicionalmente, puede usarse más de una molécula indicadora de SERS para evitar o superar la radiación no específica emitida de la solución de muestra que se ensaya, es decir, radiación emitida de la solución de muestra que no puede atribuirse a medición directa o indirecta de un analito de interés.

## F. Captura magnética en ensayos basados en líquidos

En un ensayo basado en líquidos, puede usarse un reactivo de captura magnética para facilitar la localización de las partículas en el recipiente de ensayo. En tal caso, las partículas de captura magnética pueden marcarse con un miembro de unión que tiene una afinidad por uno o más analitos de interés. Tales partículas de captura magnética pueden unirse con uno o más analitos de interés, que también pueden unirse con una nanopartícula activa en SERS, para formar un complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS. Las propiedades magnéticas de las partículas de captura magnética pueden usarse para localizar la partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS en un área predeterminada dentro del recipiente de ensayo para detectar la señal de SERS. En consecuencia, el complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS puede localizarse en un área predeterminada dentro del recipiente de ensayo, por ejemplo, un recipiente o tubo de recogida de especímenes. Después puede dirigirse radiación al área de localización y puede detectarse la señal de SERS. La localización del complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS puede aumentar la interacción molécula indicadora-superficie y aumentar la señal concentrando el efecto de SERS en un área particular del recipiente de ensayo.

Puede llevarse a cabo captura magnética de las partículas usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye poner un imán fuerte o inducir el campo magnético en un área localizada del recipiente de ensayo. El campo magnético puede inducirse, por ejemplo, mediante uno o más imanes o electroimanes permanentes.

Más particularmente, las nanopartículas activas en SERS desveladas, conjugadas con un miembro de unión específico que tiene una afinidad por el (los) analito(s) diana de interés, puede disponerse en un recipiente, por ejemplo, un recipiente de recogida de especímenes, antes de, simultáneamente con o después de disponer en el mismo una muestra biológica sospechosa de contener uno o más analitos diana de interés.

Pueden disponerse en el recipiente partículas magnéticas, también conjugadas con un miembro de unión específico que tiene una afinidad por el (los) analito(s) diana de interés. El (Los) analito(s) diana de interés presentes en la muestra pueden unirse con las nanopartículas activas en SERS y las partículas magnéticas, formando de este modo un complejo, por ejemplo, un complejo de partículas de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS, en el que el (los) analito(s) diana están intercalados entre la nanopartícula activa en SERS y la partícula magnética. Véase, por ejemplo, la Figura 1, que muestra un ensayo de captura magnética representativo adecuado para su uso con el objeto desvelado. Con referencia ahora a la Figura 1, se muestra un diagrama esquemático de un ensayo de captura magnética representativo para detectar la presencia de uno o más analitos en una muestra biológica. El ensayo de captura magnética desvelado incluye una o más partículas de captura magnética **100**, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión específico **110a** que tiene una afinidad por uno o más analitos **130** de interés en una muestra biológica. El ensayo también incluye una o más nanopartículas activas en SERS **120**, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión **110b** que tiene una afinidad por el o los analitos **130**. El miembro de unión **110b** asociado con la nanopartícula activa en SERS **120** puede ser igual o diferente que el miembro de unión **110a** asociado con partículas de captura magnética **100**. La partícula magnética **100** y la nanopartícula activa en SERS **120** se ponen en contacto con una muestra biológica que comprende uno o más analitos **130** de interés y se incuban durante un periodo de tiempo para formar un complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS **140**, por ejemplo, una estructura de tipo "sándwich" de anticuerpo-antígeno, si el uno o más analitos **130** están presentes en la muestra biológica. El complejo **140** de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS se expone al campo magnético (no mostrado) para inducir que el complejo **140** migre a un área localizada del recipiente **150**, por ejemplo, un recipiente de ensayo o recipiente de recogida de especímenes, para formar el sedimento **160**. El sedimento **160** se ilumina con radiación incidente a una o más longitudes de onda, por ejemplo, en un sistema como se muestra en la Figura 4, para inducir que la molécula indicadora activa en SERS produzca una señal detectable para detectar la presencia o cantidad del uno o más analitos en la muestra biológica. Un experto habitual en la materia tras la revisión del objeto desvelado reconocería que la partícula de captura magnética **100**, la nanopartícula activa en SERS **120**, y combinaciones de las mismas, pueden incluirse en el recipiente **150** antes de que la muestra se disponga en el mismo, o pueden añadirse al recipiente **150** antes de, simultáneamente con o después de disponer la muestra en el mismo.

En consecuencia, puede usarse ventajosamente el enriquecimiento de partículas magnéticas en los ensayos desvelados. En un enfoque tal, pueden estar presentes partículas activas en SERS que tienen una o más sondas de captura para el (los) analito(s) de interés unidas con los mismos en un recipiente, por ejemplo, un recipiente de recogida de especímenes, antes de la recogida de muestras, o, añadirse después de la recogida. Durante la fase de incubación, los analitos diana están unidos a la superficie de partículas activas en SERS por las sondas de captura. Las partículas magnéticas, que también tienen unidas a las mismas sondas de captura para la(s) diana(s) de interés, que se han proporcionado en el recipiente, pueden unirse con diferentes epítomos en la(s) misma(s) diana(s), por ejemplo, uno o más analitos de interés, y de este modo formar complejos en los que el analito diana está intercalado entre una nanopartícula activa en SERS y una partícula magnética. Puede usarse después un imán para concentrar estos sándwiches en un espacio especificado, es decir, para formar un sedimento, en el recipiente. El imán puede aplicarse antes de que se coloque el recipiente en el lector o puede integrarse en el lector. Después la radiación incidente de una longitud de onda deseada, por ejemplo, una haz de láser, puede centrarse en el sedimento de complejos de tipo sándwich de nanopartícula activa en SERS-diana-partícula magnética concentrados y la señal de SERS se obtiene de las nanopartículas activas en SERS.

Como también se desvela en más detalle en el presente documento, las realizaciones de captura magnética de los ensayos desvelados también pueden incluir poner en contacto múltiples tipos de nanopartículas activas en SERS con la muestra, en la que cada tipo de nanopartícula activa en SERS tiene unida a la misma una molécula indicadora activa en SERS que muestra una señal de Raman única. Tales realizaciones pueden usarse para detectar una pluralidad de analitos de interés, denominado en el presente documento multiplexación.

#### *G. Referencias y controles en el ensayo basado en líquidos de captura magnética*

En inmunoensayos convencionales, la detección de un antígeno puede producirse por "intercalación" del antígeno entre dos anticuerpos, uno de los cuales está marcado con un indicador óptico, colorimétrico o radiométrico. La señal medida, por ejemplo, un indicador óptico, colorimétrico o radiométrico puede entonces usarse para determinar la concentración del antígeno presente en la muestra. Los inmunoensayos de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) convencionales son ejemplos de este tipo de tecnología. Un problema con este enfoque técnico es que la magnitud de la señal óptica depende de varios factores, además de la presencia y/o cantidad del antígeno. Por ejemplo, el alineamiento y rendimiento de la óptica pueden influir en la señal medida. Normalmente, para evitar este problema, se miden muestras de control adicionales que tienen concentraciones conocidas de antígeno.

En una realización del objeto desvelado, como se ha indicado anteriormente, se genera una señal medible formando un complejo mediado por antígeno entre un nanomarcador marcado con SERS y una partícula de captura magnética. Los complejos pueden separarse de la solución mediante aplicación de un campo magnético y se mide la señal óptica del sedimento magnético resultante.

La posición del sedimento magnético en relación con la óptica de consulta puede afectar a la magnitud de la señal óptica medida y, en última instancia, a la calibración del ensayo. Además, la forma del sedimento magnético podría

no ser siempre uniforme. Por ejemplo, la alteración de la funcionalidad de superficie de las partículas magnéticas podría cambiar la densidad y/o forma del sedimento.

Según realizaciones del objeto desvelado, es posible compensar variaciones en el tamaño, forma o posicionamiento del sedimento. Estos procedimientos también son aplicables a otros formatos de ensayo en los que se forma un sedimento. En una realización, las partículas magnéticas usadas para la captura magnética se marcan con un marcador de referencia, además de las sondas de captura, por ejemplo, anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El marcador de referencia puede ser cualquier resto capaz de generar (por sí solo o tras algún tipo de estimulación), una señal detectable, que incluye fluoróforos, colorantes orgánicos, elementos de tierras raras e indicadores de Raman, y también podrían incluir partículas que comprenden tales componentes. Ejemplos específicos de marcadores de referencia incluyen partículas activas en SERS del tipo desvelado en el presente documento y partículas de sílice que tienen fluoróforos distribuidos sobre o en todas las partículas de sílice.

Un ejemplo de incorporación de un marcador de referencia en un ensayo se ilustra en la Figura 2. El ensayo de captura magnética desvelado que incorpora un marcador de referencia incluye una o más partículas de captura magnética **200**, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión específico **210a** que tiene una afinidad por uno o más analitos **240** de interés en una muestra biológica. En esta realización, la una o más partículas de captura magnética **200** también tienen asociadas con las mismas al menos un marcador de referencia **230** capaz de generar una señal detectable. En algunas realizaciones, el marcador de referencia **230** comprende una segunda nanopartícula activa en SERS que tiene una molécula indicadora diferente a la de una o más nanopartículas activas en SERS **220** que forman el complejo **250** con el uno o más analitos **240**.

El ensayo también incluye una o más nanopartículas activas en SERS **220**, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión **210b** que tiene una afinidad por el uno o más analitos **240**. El miembro de unión **210b** asociado con la nanopartícula activa en SERS **220** puede ser el mismo o diferente que el miembro de unión **210a** asociado con las partículas de captura magnética **200**.

Como con el ensayo representado en la Figura 1, la partícula magnética **200** y la nanopartícula activa en SERS **220** se pone en contacto con una muestra biológica que comprende uno o más analitos **240** de interés y se incuba durante un periodo de tiempo para formar un complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS **250** si el uno o más analitos **240** están presentes en la muestra biológica. El complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS **250** se expone a un campo magnético (no mostrado) para inducir que el complejo **250** migre a un área localizada de un recipiente, por ejemplo, un recipiente de ensayo o recipiente de recogida de especímenes, para formar sedimento como se ha mostrado previamente en la Figura 1.

Todas las partículas magnéticas presentes en el recipiente (bien en complejo o no) son capturadas en el área localizada del recipiente, por ejemplo, un área de lectura óptica. El sedimento que comprende complejo de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS **250** se ilumina con radiación incidente a una o más longitudes de onda, por ejemplo, en un sistema como se muestra en la Figura 4, para inducir que la nanopartícula activa en SERS **220** produzca una primera señal detectable y el marcador de referencia **230** produzca una segunda señal detectable. La primera señal detectable de la nanopartícula activa en SERS **220** puede compararse con la segunda señal detectable del marcador de referencia **230** para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos **240** en la muestra biológica.

La señal de Raman de la partícula **220** está relacionada con la cantidad de analito **240**, por ejemplo, un antígeno, presente; mientras que la señal del marcador de referencia **230**, por ejemplo, una nanopartícula que tiene una molécula indicadora de SERS diferente que la partícula **220**, actúa como una referencia y corrige variaciones en la forma, densidad y/o posición del sedimento. Por lo tanto, la calibración puede basarse en comparar la intensidad del indicador 1, por ejemplo, partícula **220**, con la intensidad del indicador 2, por ejemplo, marcador de referencia **230**. Por ejemplo, la señal puede calcularse como (intensidad de indicador 1)/(intensidad de indicador 2), en otras palabras, la relación de la intensidad del indicador 1 en relación con la intensidad del indicador 2.

Aunque la Figura 2 muestra una partícula activa en SERS por partícula de captura magnética, son posibles múltiples marcadores/partículas de referencia por partícula magnética o, alternativamente, podría marcarse una fracción de las partículas de captura magnética con una o más referencias, mientras que el resto de las partículas de captura magnética están sin referencias.

Como con el ensayo representado en la Figura 1, un experto en la materia tras la revisión del objeto desvelado reconocería que la partícula de captura magnética **200**, nanopartícula activa en SERS **220**, y combinaciones de las mismas, pueden incluirse en el recipiente antes de depositarse en el mismo la muestra, o pueden añadirse al recipiente antes de, simultáneamente con o después de disponer la muestra en el mismo. El objeto desvelado también engloba realizaciones en las que el sándwich de partícula magnética-nanopartícula activa en SERS forma un precomplejo y puede usarse con los procedimientos desvelados como un marcador de referencia. Este complejo es inerte, es decir, no forma complejo con el analito de interés. Puede añadirse una cantidad conocida de tales partículas en precomplejo a una muestra como referencia.

H. Uso de reactivo de lisis en ensayo basado en líquidos

Puede usarse un reactivo de lisis en el ensayo, tal como un ensayo basado en líquidos, con o sin captura magnética. Cuando se usa en matrices biológicas, tales como sangre humana, plasma o suero, un reactivo de lisis puede proporcionar una señal aumentada y/o límite de detección mejorado para biomarcadores. En particular, cuando se usa en un inmunoensayo que usa partículas activas en SERS, la adición de un reactivo de lisis aumenta la intensidad de señal de Raman en comparación con muestras que no contienen el reactivo de lisis.

Un reactivo de lisis adecuado para su uso con los procedimientos desvelados en el presente documento incluye uno o más de los siguientes componentes: tampón (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico) (HEPES), cloruro sódico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), beta glicerofosfato, Triton® e inhibidores de proteasa, y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Hirsch, L. R., y col., "A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells", Anal. Chem. 75, 2377-2381 (2003)). Muchos detergentes son adecuados para su uso como un reactivo de lisis. Ejemplos representativos de detergentes aniónicos incluyen las sales de ácido cólico, ácido caprílico, dodecilsulfato sódico (SDS) y ácido desoxicólico. Ejemplos representativos de detergentes catiónicos incluyen cloruro de cetilpiridinio y de benzalconio. Ejemplos representativos de detergentes de ión bipolar incluyen ácido 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-propanosulfónico (CHAPS) y fosfatidilcolina. Ejemplos representativos de detergentes no iónicos incluyen digitonina, Tween® 20 (polioxietilensorbitano, monolaurato) y Triton® X-100. Los reactivos de lisis también pueden incluir inhibidores de proteasa, incluyendo aprotinina, EDTA, leupeptina,  $\alpha$ -macroglobulina, pepstatina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) y tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) y pueden seleccionarse dependiendo de la diana de proteasa particular.

Otros reactivos de lisis adecuados para su uso con el objeto desvelado incluyen ditiotreitól, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), colato sódico, desoxicolato sódico, NP-4, ácido glicocólico, taurocolato sódico, ácido taurodesoxicólico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, Brij 35, Brij 58P, N-decanoil-N- metilglucamina, Igepal CA-63, N-nonanoil-N-metilglucamina, octil-b-D-1-tioglucopiranosido, Span 20, Triton® X-114, Tween® 40, Tween® 80, propanosulfonato de 3-(4-heptil)fenil-3-hidroxiopropil)dimetilamonio y amidosulfobetaina-14. También pueden usarse reactivos de lisis para lisar células.

Un experto habitual en la materia apreciará que otros reactivos de lisis conocidos en la técnica también son adecuados para su uso con los procedimientos desvelados. Además, un experto habitual en la técnica apreciará que el reactivo de lisis se pone en contacto con la muestra en una cantidad eficaz para lisar sustancialmente todos los contenidos celulares de la muestra. Un ejemplo de este procedimiento se proporciona en el Ejemplo 2.

Como se proporciona en el Ejemplo 2, en inmunoensayos detectados por SERS, la adición de un reactivo de lisis a una muestra que se ensaya produce niveles de señal más altos y/o aumento de la sensibilidad para la detección de biomarcadores en matrices biológicas cuando se compara con muestras que no contienen reactivo de lisis. La sensibilidad aumentada ofrece muchos beneficios, por ejemplo, el "tiempo hasta el resultado" puede reducirse y el resultado de los pacientes puede potencialmente mejorarse. Las señales de Raman mayores observadas en presencia del reactivo de lisis también pueden conducir a costes de instrumentación reducidos. El reactivo de lisis podría usarse para aumentar la sensibilidad para una diversidad de ensayos, que incluyen ensayos de flujo lateral, enzimoanálisis de adsorción y ensayos de resonancia de plasmón superficial. El reactivo de lisis también puede usarse para tratar tipos de muestras biológicas distintas de sangre, suero o plasma, tales como esputo para la detección de tuberculosis, o cualquier otro tipo de espécimen usado para el diagnóstico que requiere la detección de un biomarcador. Los componentes individuales en el reactivo de lisis podrían usarse solos o en combinaciones para lograr efectos similares.

#### *1. Instrumentación representativa para detectar una señal de SERS emitida por una muestra de ensayo*

Con referencia ahora a la Figura 4, se proporciona un sistema representativo para su uso con los ensayos desvelados. El sistema **400** incluye la fuente de luz **402** capaz de producir radiación electromagnética capaz de inducir una señal de Raman en una partícula activa en SERS. En algunas realizaciones, la fuente de luz **402** es un láser, que en algunas realizaciones es un láser capaz de actuar en la región espectral del infrarrojo cercano, por ejemplo, un láser de diodo de estado sólido con una longitud de onda de emisión de 785 nm.

La radiación electromagnética emitida de la fuente de luz **402**, por ejemplo, luz de una o más longitudes de onda particulares, puede dirigirse por la fibra **404** a la lente **406a**. La fibra **404** puede ser cualquier fibra óptica adecuada para su uso con el sistema desvelado. Por ejemplo, la fibra **404** puede ser la fibra individual **404a** o el haz de fibras **404b**.

La lente **406a** expande la luz transmitida a través de la fibra **404** y dirige la luz a través de un filtro **407a**, que puede ser un filtro paso banda, y al divisor de haz **408**, por ejemplo, un divisor de haz dieléctrico. Una parte de la luz incidente en el divisor de haz **408** se dirige a la lente **406b**, que centra la luz en la muestra **412**, que está contenida en un recipiente **410**, por ejemplo, un recipiente de recogida de especímenes o un recipiente de ensayo. La muestra **412** puede comprender uno o más complejos de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS, como se desvela en el presente documento. La luz incidente en la muestra **412** es capaz de inducir una señal de SERS, es decir, radiación dispersa, a partir de los complejos de partícula de captura magnética-analito-nanopartícula activa en SERS que comprenden la muestra **412**. La radiación dispersa emitida de la muestra **412** se recoge por la lente **406b** y se dirige al divisor de haz **408**. Una parte de la radiación dispersa se transmite a través

del divisor de haz **408** y se dirige al filtro **407b**, por ejemplo, un filtro de paso largo. Después de pasar a través del filtro **407b**, la radiación dispersa se dirige a la lente **406c**, que centra la radiación dispersa en la fibra **414**. La fibra **414** puede ser cualquier fibra óptica adecuada para su uso con el sistema desvelado. Por ejemplo, la fibra **414** puede ser la fibra individual **414a** o matriz de fibras **414b**. La fibra **414** dirige la radiación dispersa al espectrómetro **416**, que, en algunas realizaciones, incluye un dispositivo acoplado a carga (CCD) **418**.

Un láser puede actuar como fuente de excitación de la radiación incidente usada para detectar uno o más analitos diana de interés. Un experto habitual en la materia tras la revisión del objeto desvelado podría determinar el tipo de láser, incluyendo la fuerza y longitud de onda de excitación, adecuado para su uso con las moléculas indicadoras activas en SERS descritas en el presente documento. La radiación dispersa o emitida a partir de la muestra puede detectarse usando sistemas de detección conocidos en la técnica.

Puede usarse más de un tipo de fuente de radiación, o más de una longitud de onda de excitación. Por ejemplo, en realizaciones en las que deben detectarse dos analitos de interés, el reactivo puede incluir dos tipos distintos de moléculas indicadoras activas en SERS y/o dos tipos distintos de miembros de unión específicos. En otras realizaciones, puede usarse radiación incidente de una única longitud de onda para inducir diferentes espectros de Raman de dos o más moléculas indicadoras activas en SERS distintas. Sin embargo, puede usarse radiación incidente de diferentes longitudes de onda para producir señales de Raman distintas para cada analito de interés. Como reconocería un experto habitual en la materia tras la revisión del objeto desvelado, la selección de la(s) longitud(es) de onda particular(es) que van a usarse depende del analito de interés, los miembros de unión específicos usados, y las moléculas indicadoras activas en SERS particulares usadas.

El ensayo desvelado puede realizarse con cualquier sistema de espectrómetro de Raman adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un espectrómetro de Raman de espectrómetro múltiple multimodo (Centice, Morrisville, Carolina del Norte, Estados Unidos de América), tal como el sistema de espectrómetro de Raman desvelado en la patente de EE.UU. N.º 7.002.679 de Brady y col. Más particularmente, se desvela un sistema y procedimiento para un ensayo de espectroscopia de Raman usando partículas paramagnéticas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 26/24572 de Carron y col., y se desvela un sistema de espectrómetro de Raman adecuado para su uso con los ensayos desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 25/248758 de Carron y col.

Pueden usarse dispositivos de detección, tales como detectores ópticos, fuentes de radiación y sistemas informáticos, microprocesadores y software informático y algoritmos, en cualquier combinación en la práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento. En consecuencia, puede usarse software, u otras instrucciones legibles por ordenador para interpretar, analizar, compilar o clasificar de otro modo los datos de salida relacionados con el ensayo óptico desvelado. El software u otro sistema informático pueden usarse para presentar, almacenar o transmitir datos de salida, bien en forma digital o bien otras formas, a uno o más usuarios.

#### *J. Un procedimiento de amplificación de una señal de SERS en un ensayo basado en líquidos*

Los ensayos biológicos requieren con frecuencia detección precisa pero sensible de biomoléculas en una diversidad de medios. Un enfoque hacia el desarrollo de ensayos más sensibles es aumentar la señal de salida del ensayo. El procedimiento desvelado demuestra que es posible una potenciación de la señal de un factor de tres o más. En consecuencia, se desvela un procedimiento de amplificación de la señal de salida en un ensayo basado en líquidos del tipo descrito anteriormente y representado en la Figura 1.

El procedimiento de amplificación puede comenzar con una muestra que se añade a una solución que contiene tanto una partícula de captura magnética como una molécula indicadora, tal como una nanopartícula activa en SERS que comprende una molécula indicadora de SERS, y se incuba durante un periodo de tiempo corto, durante el cual puede formarse un complejo de sándwich que comprende la partícula de captura magnética, el analito y la molécula indicadora.

La característica de amplificación de señal del objeto desvelado surge de la adición de otra alícuota de molécula indicadora, por ejemplo, otra alícuota de nanopartículas activas en SERS que tienen las mismas capacidades productoras de señal, por ejemplo, la misma molécula indicadora de Raman, como la primera alícuota añadida a la solución de ensayo, antes de localizarse las partículas de captura magnética. Esta segunda alícuota de molécula indicadora, por ejemplo, una segunda alícuota de nanopartículas activas en SERS, presenta anticuerpos (u otra molécula, por ejemplo, un miembro de unión específico) que reconocen el anticuerpo en la primera alícuota de moléculas indicadoras, por ejemplo, nanopartículas activas en SERS, originalmente presentes en el ensayo. La presencia de la segunda alícuota de moléculas indicadoras produce un mayor número de moléculas indicadoras por sándwich en la muestra que se ensaya y, por lo tanto, una mayor señal por complejo de sándwich.

Por ejemplo, como se representa en la Figura 7, las nanopartículas activas en SERS revestidas con un anticuerpo que reconoce anticuerpos no unidos en la primera alícuota de nanopartículas activas en SERS pueden añadirse a la solución de ensayo. Cuando estos anticuerpos secundarios se unen con la primera alícuota de nanopartículas activas en SERS, el nivel de señal va de una nanopartícula activa en SERS por complejo de sándwich a tres.

Más particularmente, con referencia ahora a la Figura 7, se representa un diagrama esquemático representativo del

ensayo desvelado usando un procedimiento de amplificación de señal. El ensayo desvelado incluye una o más partículas de captura magnética **700**, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión específico **710a** que tiene una afinidad por uno o más analitos **730** de interés en una muestra biológica. El ensayo también incluye una primera alícuota de una o más moléculas indicadoras **720** capaces de producir una señal detectable, por ejemplo, una o más nanopartículas activas en SERS, que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión **710b** que tiene una afinidad por el uno o más analitos **730**. El miembro de unión **710b** asociado con la molécula indicadora **720** puede ser el mismo o diferente del miembro de unión **710a** asociado con partículas de captura magnética **700**. La partícula magnética **700** y la molécula indicadora **720** se ponen en contacto con una muestra biológica que comprende uno o más analitos **730** de interés y se incuban durante un periodo de tiempo para formar el complejo de partícula de captura magnética- analito-molécula indicadora **740**, por ejemplo, una estructura de "sándwich" de anticuerpo-antígeno, si el uno o más analitos **730** están presentes en la muestra biológica.

El ensayo representado en la Figura 7 incluye entonces una segunda alícuota de una o más moléculas indicadoras **750** capaces de producir una señal detectable que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión específico **710c** que tiene una afinidad por el miembro de unión específico **710b** de la primera alícuota de moléculas indicadoras **720**. La segunda alícuota de las moléculas indicadoras **750** puede disponerse en el recipiente **760** antes de, simultáneamente con, o después de disponer la muestra y/o la primera alícuota de una o más moléculas indicadoras **720** en el mismo, en el que la una o más moléculas indicadoras de la segunda alícuota de las moléculas indicadoras **750** es la misma que la una o más moléculas indicadoras de la primera alícuota de las moléculas indicadoras **720**.

El complejo **740**, que comprende un complejo de sándwich de partícula de captura magnética **700**, analito **730**, molécula indicadora **720**, que tiene asociada con la misma la molécula indicadora **750**, se expone a un campo magnético (no mostrado) para inducir que el complejo **740** migre a un área localizada del recipiente **760**, por ejemplo, un recipiente de ensayo o recipiente de recogida de especímenes, para formar el sedimento **770**. El sedimento **770** se ilumina con radiación incidente a una o más longitudes de onda, por ejemplo, en un sistema como se muestra en la Figura 4, para inducir que la molécula indicadora produzca una señal detectable para detectar la presencia o cantidad del uno o más analitos en la muestra biológica.

Un experto habitual en la materia tras la revisión del objeto desvelado reconocería que la partícula de captura magnética **700**, molécula indicadora **720**, molécula indicadora **750** y combinaciones de las mismas pueden incluirse en el recipiente **760** antes de disponer la muestra en el mismo, o pueden añadirse al recipiente **760** antes de, simultáneamente con, o después de disponer la muestra en el mismo.

Dependiendo de la forma del ensayo, puede añadirse la segunda alícuota de marcadores de SERS en cualquier estadio, por ejemplo, secuencial o simultáneamente con la primera alícuota de marcadores de SERS, o secuencial o simultáneamente con la muestra. Además, para evitar un gran aumento del ruido de fondo en el ensayo, es preferible que la biomolécula en la superficie de la segunda nanopartícula activa en SERS no reconozca la biomolécula en la superficie de la partícula de captura magnética. En el caso de un inmunoensayo, esta característica llevarse a cabo inmovilizando biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos que se originan en diferentes especies en la nanopartícula de captura magnética y nanopartícula activa en SERS. Por ejemplo, la solución de prueba inicial podría incluir partículas de captura magnética que tuvieran anticuerpos producidos en cabra y la nanopartícula activa en SERS podría presentar anticuerpos producidos en ratón. Si la segunda alícuota de nanopartículas activas en SERS se marca con un anticuerpo anti-ratón, no tendrá lugar unión con la partícula de captura magnética. El procedimiento de amplificación desvelado puede usarse para detectar prácticamente cualquier analito, incluyendo ADN, siempre que se usen dos componentes de unión con epítopos ortogonales. Un beneficio adicional del resultado de señal aumentado en un ensayo dado es que pueden usarse sistemas de detección menos sofisticados (y menos caros) para ensayar un analito.

Con referencia ahora a la Figura 8, se proporcionan resultados representativos de la estrategia de amplificación desvelada. La Figura 8A muestra una curva de unión típica para un ensayo de proteínas homogéneo sin amplificación como se muestra previamente en la Figura 1. El eje y es el resultado de un algoritmo que cuantifica el nivel de señal de SERS para cada muestra. La Figura 8B muestra el ensayo realizado con los reactivos idénticos y concentraciones con la etapa de amplificación mostrada en la Figura 7. La gráfica muestra aumentos de señal de tres veces o más tras la inclusión de la etapa de amplificación.

El procedimiento desvelado puede usarse para detectar prácticamente cualquier analito siempre que se usen dos componentes de unión con epítopos ortogonales. Por ejemplo, el procedimiento de amplificación desvelado puede usarse para detectar un polinucleótido. No se pretende que el uso del término "polinucleótido" limite los procedimientos desvelados a polinucleótidos que comprenden ADN. Aquellos expertos habituales en la materia reconocerán que los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Tales desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos incluyen tanto moléculas que existen de forma natural como análogos sintéticos. Más particularmente, se pretende que el término "polinucleótido" englobe un ácido nucleico singular, así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ADN plasmídico (ADNp) o ARN interferente pequeño (ARNip). Un polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular. Un polinucleótido puede comprender un

enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). La expresión "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados pueden incluir además tales moléculas producidas de forma sintética. Los polinucleótidos aislados también pueden incluir vectores de expresión aislados, construcciones de expresión o poblaciones de los mismos. "Polinucleótido" también puede referirse a productos amplificados del mismo, como en una reacción en cadena de la polimerasa. El "polinucleótido" puede contener ácidos nucleicos modificados, tales como derivados modificados con fosforotioato, fosfato y átomo anular. El "polinucleótido" puede ser un polinucleótido que existe de forma natural (es decir, uno que existe en la naturaleza sin intervención humana) o un polinucleótido recombinante (es decir, uno que existe solamente con intervención humana). Aunque los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren ambos a un polímero de nucleótidos, como se usa en el presente documento, un oligonucleótido es normalmente de menos de 100 nucleótidos de longitud.

La Figura 9 proporciona un esquema representativo del procedimiento de amplificación usado para la detección de polinucleótidos. Con referencia ahora a la Figura 9, el procedimiento de amplificación desvelado incluye la partícula de captura magnética **900** que tiene unida a la misma la sonda de captura **910a**, por ejemplo, una sonda de captura que tiene 15 pares de bases. También se proporciona una molécula indicadora **920**, por ejemplo, una nanopartícula activa en SERS, que tiene unida a la misma la sonda de captura **910b**, por ejemplo, una sonda de captura que tiene 15 pares de bases. Cuando se pone en contacto con el polinucleótido diana **930**, por ejemplo, un polinucleótido que tiene 30 pares de bases, se forma el complejo **940** e incluye el polinucleótido bicatenario **950** compuesto de molécula de polinucleótido diana **930** y sondas de captura **910a** y **910b**. El complejo **940** puede ponerse en contacto después con la molécula indicadora **960**, por ejemplo, una nanopartícula activa en SERS, que tiene unida a la misma la sonda de captura **910c**, por ejemplo, una sonda de captura complementaria de la sonda de captura no unida **910b** fijada a la molécula indicadora **920** para formar el complejo **980**, que incluye el polinucleótido bicatenario **970** que comprende las sondas de captura **910b** y **910c**. El complejo **980** se expone a un campo magnético (no mostrado) para inducir que el complejo **980** migre a un área localizada de un recipiente, por ejemplo, un recipiente de ensayo o recipiente de recogida de especímenes como se muestra en la Figura 7, para formar un sedimento imantado. El sedimento se ilumina con radiación incidente a una o más longitudes de onda, por ejemplo, en un sistema como se muestra en la Figura 4, para inducir que la molécula indicadora produzca una señal detectable para detectar la presencia o cantidad del uno o más ADN diana en la muestra biológica.

Se muestran datos del ensayo de ADN desvelado en las Figuras 10A y 10B.

#### *K. Generación de espectros de referencia de Raman mejorados y análisis espectral en ensayo basado en líquidos de captura magnética*

Se desvela un procedimiento de generación de espectros de referencia para su uso en análisis basados en espectroscopia de Raman. Este procedimiento puede usarse ventajosamente con nanopartículas acopladas con partículas magnéticas en ensayos líquidos del tipo desvelado en el presente documento. Para determinar la cantidad de una nanopartícula activa en SERS específica en una muestra, generalmente debe generarse una señal de Raman por una cantidad conocida de la nanopartícula activa en SERS específica. Normalmente, la señal conocida o de referencia se genera por nanopartículas activas en SERS específicas en solución, ya que el procesamiento de muestras puede simplificarse.

En algunos sistemas de ensayo, tales como los desvelados en el presente documento, las partículas activas en SERS forman complejo con partículas magnéticas mediante las reacciones que implican al analito de interés. Estas partículas combinadas se arrastran a un volumen pequeño por un imán externo. La señal de Raman generada por las nanopartículas dentro de este sedimento puede analizarse usando la señal de referencia previamente obtenida de la solución.

El objeto desvelado proporciona, sin embargo, que los espectros de Raman de un sedimento son diferentes de los espectros de Raman de la solución, incluso si el mismo tipo de nanopartícula activa en SERS individual está contenido en la muestra. Pueden obtenerse resultados mejorados si los espectros de referencia indicados anteriormente se adquieren del sedimento, no de la solución. Las diferencias en estos espectros de solución en comparación con los espectros del sedimento pueden producir errores en la cuantificación de la cantidad de nanopartículas en la muestra. Esta observación es especialmente cierta en un entorno múltiple, en el que varias nanopartículas activas en SERS que tienen señales de Raman únicas están presentes en la muestra. Por ejemplo, las características dentro de la señal de muestra que no están contenidas en los espectros de referencia pueden interpretarse como procedentes de otras nanopartículas activas en SERS dentro de la muestra (véase Ejemplo 4).

Las diferencias en los espectros procedentes de la solución y los sedimentos no tienen que ser grandes para influir en la cuantificación de nanopartículas activas en SERS (véase el Ejemplo 4). Esto es especialmente cierto cuando está presente una nanopartícula activa en SERS en grandes cantidades y otra está completamente ausente. Bajo estas circunstancias, un error pequeño puede inducir un resultado positivo falso para la nanopartícula activa en

SERS ausente.

Por consiguiente, pueden analizarse espectros de Raman por ajustes de mínimos cuadrados, en cuyo caso se usan señales de referencia para cada posible componente. En las técnicas de ajuste por mínimos cuadrados, se asume que la señal que se analiza está compuesta de una combinación lineal de espectros, variando cada contribución por la cantidad relativa de nanopartícula activa en SERS específica dentro de la muestra. Las características dentro de la señal medida que no pueden "ajustarse" a ninguna de las señales de referencia pueden dividirse en gran medida en una señal de fondo. Si una característica de la señal medida, sin embargo, coincide con una característica de cualquier señal de referencia, entonces el ajuste asignará alguna parte de la señal total a esa fuente de referencia. Si los espectros están influidos por la sedimentación de las nanopartículas, por ejemplo, entonces esos cambios contribuirán necesariamente a errores en la cuantificación. Si esos cambios se capturan en los espectros de referencia, entonces tales errores en los análisis de la muestra pueden reducirse. Un experto habitual en la materia reconocería que podrían usarse otras técnicas de análisis multifactorial, que incluyen mínimos cuadrados parciales y análisis de componentes principales con los procedimientos desvelados.

Se desvela además un procedimiento de análisis de los espectros de Raman, especialmente aquellos obtenidos de nanopartículas activas en SERS, y especialmente en una situación múltiple en la que se usan partículas con diferentes espectros de Raman para identificar múltiples analitos. Para determinar la cantidad de una nanopartícula activa en SERS específica (nanopartícula con una nanopartícula activa en SERS específica que genera una señal de Raman única) en una muestra, se registra un espectro de muestras normalmente durante un amplio intervalo de longitudes de onda o números de onda, y entonces se compara con uno o más espectros de referencia. Esta comparación implica ajustar los espectros de muestras a los espectros de referencia durante un intervalo de longitudes de onda o números de onda uniforme y adecuado.

El objeto desvelado demuestra que una estimación de los componentes de nanopartículas hecha a partir de esta comparación típica puede refinarse de dos maneras basándose en los resultados de la primera comparación. Primera, debido a que las diferencias entre las contribuciones espectrales para los diferentes componentes puede variar durante un intervalo espectral, intervalos específicos dentro de los espectros pueden ponderarse en mayor medida en los cálculos dependiendo de las cantidades relativas de componentes en la primera estimación.

Segunda, pueden retirarse del análisis componentes que se estima que están ausentes o presentes en concentraciones muy bajas, y volver a estimarse los componentes restantes. En cualquiera de los casos, puede calcularse y valorarse un aumento en la precisión de ajuste ("bondad de ajuste"). La "bondad de ajuste" representa una diferencia entre el espectro de la muestra y el espectro ajustado y puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica y puede informarse, por ejemplo, como un residuo de la técnica de ajuste por mínimos cuadrados. Estos dos procedimientos pueden aplicarse en combinación o por separado. Además, el procedimiento desvelado es aplicable a una diversidad de nanopartículas activas en SERS que tienen de forma similar espectros que deben distinguirse.

## 35 II. NANOESTRUCTURAS COMPUESTAS Y PROCEDIMIENTOS DE SU USO

Se desvelan además nanoestructuras compuestas, que incluyen una estructura compuesta, denominada en el presente documento una estructura "satélite", que comprende una pluralidad de partículas portadoras de señales, por ejemplo, nanopartículas, unidas con una partícula de núcleo, y una estructura compuesta, denominada en el presente documento una estructura de "núcleo-cubierta", que incluye una partícula de núcleo, un material activo, tal como un material activo en Raman, que rodea la partícula de núcleo, y una o más cubiertas, tal como una cubierta metálica, que rodea el material activo. Las estructuras satélite y de núcleo-cubierta pueden usarse para amplificar o potenciar de otro modo una señal en un ensayo, tal como un ensayo de SERS. En consecuencia, se desvela un procedimiento de realización de un ensayo, comprendiendo el procedimiento: proporcionar al menos uno de una estructura satélite, una estructura de núcleo-cubierta o combinaciones de las mismas; poner en contacto las estructuras satélite y/o estructuras de núcleo-cubierta con una muestra que se sospecha que contiene uno o más analitos diana, y realizar una etapa de detección para determinar la presencia o ausencia del uno o más analitos diana en la muestra.

Más particularmente, puede lograrse la potenciación de la señal proporcionando una estructura compuesta que tiene una pluralidad de satélites portadores de señal (por ejemplo, nanopartículas) unidos con una partícula de núcleo (por ejemplo, una micropartícula) de modo que la estructura satélite compuesta resultante sea capaz de generar múltiples señales. Por lo tanto, la estructura satélite puede mejorar la detección de los analitos dentro de un ensayo, tal como para muestras que tienen una concentración de analitos más baja.

Las partículas satélite pueden ser nanopartículas metálicas, semiconductoras, orgánicas y/o inorgánicas. De forma similar, la partícula de núcleo puede ser micropartículas o nanopartículas magnéticas, de sílice, metálicas (por ejemplo, de oro) u orgánicas. Las partículas satélite y de núcleo pueden ser de forma esférica o no esférica. Las partículas satélite pueden unirse a cada partícula de núcleo usando fuerzas electrostáticas, covalentes o de van der Waals. Además, las partículas satélite normalmente comprenden una molécula indicadora, tal como moléculas indicadoras fluorescentes, activas en Raman o enzimáticas que facilitan la detección. La partícula satélite y/o la al menos una partícula de núcleo pueden tener además moléculas indicadoras unidas a las mismas, tales como

anticuerpos, sondas de ácido nucleico o agentes de bloqueo.

Se desvela además una estructura de núcleo-cubierta que comprende una partícula de núcleo, un material activo, tal como un material activo en Raman, que rodea la partícula de núcleo, y una cubierta que rodea el material activo, en el que la cubierta puede ser una capa contigua o una pluralidad de nanopartículas, que preferentemente están en estrecha proximidad entre sí. Los materiales de núcleo y cubierta pueden ser iguales o diferentes, y se eligen deseablemente de materiales que potencian el espectro del material activo. Por ejemplo, un núcleo de oro y cubierta de oro mejorarán el espectro detectable de un material activo en Raman en una aplicación de dispersión de Raman potenciada en superficie.

Aspectos adicionales del procedimiento pueden incluir detectar un analito diana usando dispersión de Raman potenciada en superficie. Puede introducirse en el ensayo una pluralidad de perlas magnéticas, metálicas o semiconductoras que tienen, por ejemplo, un anticuerpo para el analito diana, junto con una estructura compuesta que tiene una molécula de unión similar para el analito diana. El analito, si está presente, se intercala entre la estructura compuesta y la perla. La perla puede manipularse, por ejemplo, mediante la aplicación de un campo magnético, para concentrar una pluralidad de los sándwiches para detección mediante espectro de Raman. Un aspecto adicional incluye poner en contacto una pluralidad de las estructuras compuestas desveladas con una célula o tejido en condiciones para fijar la estructura compuesta a un analito (por ejemplo, una célula normal o cancerosa) y capturar imágenes de las estructuras.

#### A. Nanoestructuras satélite

Se desvelan estructuras satélite de micropartícula-nanopartícula, que pueden usarse para amplificar o potenciar una señal en un ensayo, tal como un ensayo SERS.

Con referencia ahora a la Figura 14, se muestra una microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de la estructura satélite **1400**. La estructura satélite **1400** incluye una pluralidad de partículas más pequeñas (por ejemplo, un resto de señalización) unidas con una partícula mayor (por ejemplo, un vehículo), tal como una pluralidad de nanopartículas **1412** unidas a la micropartícula **1414**. Como se desvela en más detalle posteriormente en el presente documento, la estructura satélite **1400** es capaz de amplificar una señal de analito en un ensayo. Por lo tanto, la estructura satélite **1400** puede ser capaz de amplificar una señal para detectar un analito que de otro modo no puede detectarse, tal como en muestras que contienen concentraciones de analitos más bajas.

Se entiende que la estructura satélite **1400** descrita en el presente documento puede usarse para detectar cualquier número de analitos. No se entiende que el término "analito" sea limitante y puede ser cualquier molécula de interés tal como una proteína, ácido nucleico o metabolito. El analito podría como alternativa ser una célula, tal como una célula cancerosa. Además, el ensayo usado para analizar analitos puede ser homogéneo o heterogéneo. Por ejemplo, un ensayo heterogéneo normalmente requiere separación, bien lavando o bien por otros medios físicos, de los elementos de reacción entre las etapas individuales del procedimiento de ensayo, mientras que un ensayo homogéneo no requiere ninguna etapa de separación. Además, puede usarse cualquier ensayo deseado para identificar y analizar los analitos. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos de sándwich, de los que se proporcionan ejemplos en más detalle en el presente documento. Además, la estructura satélite **1400** puede usarse para amplificar acontecimientos de señalización para una pluralidad de analitos de modo que puede usarse la detección múltiple para detectar tal pluralidad de analitos. Por ejemplo, una primera estructura satélite con una señal distinta, por ejemplo, un espectro de SERS distinto incluye un anticuerpo para un primer analito, y se mezcla directamente con una segunda estructura satélite que muestra una señal distinta diferente, por ejemplo, un espectro de SERS distinto, y que tiene un segundo anticuerpo específico para un segundo tipo de analito. Las nanopartículas **1412** pueden ser cualquier partícula adecuada capaz de generar una señal detectable que se usa para detectar la aparición de un acontecimiento de unión. Por ejemplo, las nanopartículas **1412** pueden ser nanopartículas metálicas, semiconductoras, orgánicas o inorgánicas. En el ejemplo mostrado en la Figura 14, las nanopartículas **1412** son partículas de oro. De forma similar, la micropartícula **1414** puede ser cualquier vehículo deseado que facilite la unión de una pluralidad de nanopartículas **1412** con el mismo. Por ejemplo, la micropartícula **1414** podría ser micropartículas magnéticas, de sílice, metálicas (por ejemplo, de oro) y/u orgánicas. En el ejemplo representado en la Figura 14, la micropartícula es una partícula de sílice funcionalizada con amina. Las nanopartículas **1412** normalmente son capaces de proporcionar señales detectables en sí mismas, por ejemplo, puede ser puntos cuánticos o partículas activas en SERS. Otras partículas adecuadas para su uso con los procedimientos desvelados se conocen por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, cada una de las nanopartículas **1412** puede contener una molécula indicadora tal como moléculas indicadoras fluorescentes, de Raman y enzimáticas que permiten que las nanopartículas actúen de elementos de señalización si las nanopartículas no son capaces de otro modo de hacerlo por sí solas (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 6.514.767).

Aunque el término "micropartícula" se usa en todo el documento, se entiende que la micropartícula **1414** podría ser cualquier partícula que sea mayor que las nanopartículas **1412** (donde se define que las nanopartículas tienen tamaños de 2 nm a 200 nm de diámetro). Pueden usarse diversas técnicas para unir nanopartículas **1412** con cada micropartícula **1414**, tal como usando fuerzas electrostáticas, covalentes o de van der Waals. Además, podrían unirse nanopartículas **1412** con la micropartícula **1414** usando diversos conectores, tales como polímeros, ADN, aminoácidos, cadenas de carbono cortas o enlace de estreptavidina/biotina, que pueden permitir una mayor

densidad de nanopartículas alrededor de la micropartícula. La longitud y tipo del conector pueden elegirse para ajustar el número de nanopartículas **1412** unidas con la micropartícula **1414**, y la separación entre las nanopartículas y las micropartículas. Las nanopartículas **1412** y/o micropartícula **1414** también podrían revestirse (por ejemplo, con un polímero) para controlar las interacciones entre partículas.

5 Puede unirse cualquier número de nanopartículas **1412** con la micropartícula **1414**, aunque el número preciso de nanopartículas puede ser dictado por el experimento particular que se realice. Por ejemplo, puede ser posible obtener estructura satélite **1400** que tenga una distribución uniforme y máxima de las nanopartículas **1412** para la micropartícula **1414** optimizando la relación de las partículas y las condiciones de mezcla durante la reacción. Además, las nanopartículas **1412** y la micropartícula **1414** pueden ser de diversos tamaños y configuraciones dependiendo del analito que va a detectarse, tal como de forma esférica o no esférica (por ejemplo, nanobastones). Por ejemplo, la Figura 14 muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión, en la que las nanopartículas **1412** y la micropartícula **1414** son de forma esférica, y las nanopartículas son de 40 nm de diámetro y la micropartícula es de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Además, la micropartícula **1414** puede ser de diámetro submicrométrico (por ejemplo, 0,5  $\mu\text{m}$ ).

15 Además, las nanopartículas **1412** y/o la micropartícula **1414** puede marcarse con una especie, tal como compuestos orgánicos o inorgánicos, polímeros, proteínas, receptores, anticuerpos, sondas de ácido nucleico y agentes de bloqueo, para potenciar o facilitar el acontecimiento de unión con el analito o facilitar el acontecimiento de unión con el analito o para prevenir interacciones no deseadas. Agentes de bloqueo a modo de ejemplo incluyen albúmina, caseína, (alcohol vinílico), poli (etilenglicol) y gamma-globulina.

20 Pueden usarse diversas técnicas de detección para detectar uno o más analitos de interés mediante la estructura satélite **1400**, por ejemplo, fluorescencia o espectrometría de Raman. Para realizar la detección, existe al menos un acontecimiento de unión normalmente entre la estructura satélite **1400** y un analito (por ejemplo, mediante un sándwich como se describe posteriormente). La amplificación de la señal resulta de cada una de una pluralidad de nanopartículas **1412** que generan múltiples señales basándose en un único acontecimiento de unión, en lugar de una única nanopartícula que genera solamente una señal de ese acontecimiento de unión.

La Figura 15 representa el ensayo de sándwich **1500** según el objeto desvelado. En particular, el ensayo incluye un anticuerpo **1522a** inmovilizado en el soporte **1524**, mientras que la estructura satélite **1510** también incluye el anticuerpo **1522b** inmovilizado en una de las nanopartículas **1512**. Aunque esta realización en particular ilustra que el anticuerpo **1522b** está acoplado con la estructura satélite **1510** mediante nanopartículas **1512**, se entiende que en algunas realizaciones puede ser ventajoso unir el anticuerpo **1522b** con la micropartícula vehículo **1514**. El analito **1516** se captura entre los anticuerpos **1522a**, **1522b**, que produce un acontecimiento de unión. La estructura satélite **1510** facilita la generación de una pluralidad de acontecimientos de señalización detectables debido a los acontecimientos de señalización por cada una de las nanopartículas **1512**, que produce la amplificación del acontecimiento de unión entre el analito **1516** y la nanopartícula **1512** que captura el analito. Se entiende que el anticuerpo **1522a** en el soporte **1524** y el anticuerpo **1522b** en la estructura satélite **1510** no necesitan ser el mismo.

La Figura 16A ilustra el ensayo de sándwich **1600** según el objeto desvelado. El ensayo **1600** incluye el recipiente de ensayo **1628** que contiene una pluralidad de estructuras satélite **1610**, analitos **1616** y perlas **1630**. Las perlas **1630** pueden ser un material magnético, semiconductor o metálico que sean capaces de ser atraídas por un campo magnético, o puede ser estructuras que facilitan de otro modo la separación/enriquecimiento, por ejemplo, mediante gravedad o centrifugación. Puede haber cualquier número de perlas **1630** dependiendo del número de partículas satélite **1610** y analitos **1616**, y las perlas pueden ser de cualquier tamaño y configuración capaz de intercalar un analito entre la perla y una estructura satélite. Por ejemplo, el ensayo de sándwich **1600** puede incluir 1.000 a 100.000 perlas **1630**, 1.000 a 100.000 estructuras satélite **1610** por ensayo, y 50 a 10.000 nanopartículas **1612** por micropartícula **1614**. Además, las perlas **1630** pueden tener localizadas en las mismas especies tales como anticuerpos, sondas de ácido nucleico o agentes de bloqueo.

El analito **1616** puede capturarse o intercalarse entre la estructura satélite **1610** y la perla **1630**. A este respecto, el analito **1616** puede unirse con la nanopartícula **1612** de una estructura satélite **1610** respectiva, mientras que la perla **1630** puede unirse con el analito de tal modo que el analito se intercale entre la nanopartícula y la perla produciendo un acontecimiento de unión. Después de dejar pasar un tiempo predeterminado para que se capture una pluralidad de analitos **1616**, puede aplicarse un campo magnético (proporcionado, por ejemplo, por un imán permanente o un electroimán) al ensayo **1600**, que concentra los analitos intercalados **1616** en una localización particular, por ejemplo el fondo de un recipiente de ensayo **1628** como sedimento concentrado **1632**, como se muestra en la Figura 16B. Puede formarse el sedimento **1632** en el fondo o el lateral del recipiente de ensayo **1628** dependiendo de la dirección en la que se aplique el campo magnético. El sedimento **1632** puede entonces analizarse para determinar la presencia de los analitos **1616** mediante las señales proporcionadas a partir de las estructuras satélite. La señal resultante de cada estructura satélite **1610** se potencia por la presencia de la pluralidad de nanopartículas **1612** como se ha descrito anteriormente. Puede usarse dispersión de Raman potenciada en superficie (SERS) para detectar señales de la estructura satélite **1610** que contiene material activo en Raman.

Se desvela además un procedimiento para captura de imágenes celulares, en el que puede usarse la estructura satélite **1610** para facilitar el análisis de una célula. Usando técnicas convencionales para analizar células, un

número limitado de partículas puede ser capaz de unirse con una célula, tal como una célula cancerosa, para facilitar la captura de imágenes de la célula para identificar células normales o cancerosas. Por ejemplo, una célula que tiene diez marcadores de superficie unidos a la misma solamente sería capaz de unirse con diez nanopartículas de modo que solo pueda haber diez acontecimientos de señalización correspondientes a diez marcadores de superficie. Enviando estructuras satélite **1610** para unirse con una célula, teniendo cada una una pluralidad de nanopartículas, puede generarse una pluralidad de acontecimientos de señalización uniendo cada estructura satélite con la célula. Por ejemplo, continuando con el ejemplo anterior, puede haber diez estructuras satélite **1610** que incluya cada una diez nanopartículas **1612**, de modo que se genere la señal de 100 nanopartículas, amplificando de este modo cada acontecimiento de unión individual por un factor de 10. Como tal, la amplificación de los acontecimientos de señalización puede potenciar la identificación de la célula usando captura de imágenes celulares. Como se trata anteriormente, pueden marcarse estructuras satélite **1610**, tal como con un revestimiento de anticuerpo, para facilitar los acontecimientos de unión. El tamaño de la estructura satélite **1610** puede adaptarse para permitir la decoración de una célula por un número máximo de nanopartículas **1612** optimizando el tamaño de la micropartícula **1614** con la que se unen las nanopartículas **1612**. Por lo tanto, si la micropartícula **1614** es muy pequeña, solo pueden unirse un puñado de nanopartículas **1612** con ella. Por otro lado, si la micropartícula **1614** es muy grande, solo pueden unirse algunas estructuras satélite **1610** con la célula.

#### *B. Nanopartículas de núcleo-cubierta compuestas*

Se desvelan partículas compuestas, denominadas en el presente documento estructuras de "núcleo-cubierta", que incluyen una partícula de núcleo, un material activo, tal como un material activo en Raman, que rodea la partícula de núcleo, y una o más cubiertas, tal como una cubierta metálica, que rodea el material activo, que, en algunas realizaciones, puede usarse para amplificar o potenciar una señal de un ensayo, tal como un ensayo SERS.

Con referencia ahora a la Figura 17, la estructura compuesta **1700** comprende el núcleo **1702**, un material activo, tal como material activo en Raman **1704** alrededor del núcleo y la cubierta contigua **1706** alrededor del material activo. Normalmente, la cubierta externa **1706** tiene 20 nm de espesor o menos. En particular, el núcleo **1702** puede ser un núcleo de oro de 20 a 200 nm de diámetro, la cubierta **1706** también puede ser de oro y puede tener un espesor de 2 a 20 nm, y el material activo puede ser un material activo en Raman tal como trans-1,2-bis(4-piridil)etileno (SPE). Además, puede disponerse una capa de sílice fina, de < 5 nm, en el material activo en Raman bajo la cubierta **1706**. La sílice es ventajosa en algunas situaciones para promover la fabricación de la cubierta de oro. Como alternativa, puede usarse una molécula bifuncional para promover la unión de oro con el material activo en Raman. El oro es un metal ventajoso en proporcionar dispersión de Raman potenciada en superficie, pero también son útiles metales tales como plata y cobre (o aleaciones de cualquiera de tales metales).

Además, la estructura de núcleo-cubierta puede ser similar a la Figura 17, pero estando compuesta la cubierta de nanopartículas, que normalmente tienen un tamaño igual a o menor que el núcleo. El núcleo es un núcleo de oro de 20 nm a 200 nm de diámetro, el material activo es un material activo en Raman tal como trans-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE) y las nanopartículas también son de oro y tienen un diámetro de 2 nm hasta el tamaño del núcleo. Además, puede depositarse una capa de sílice fina, de <5 nm, en el material activo en Raman bajo las nanopartículas. Como alternativa, puede usarse una molécula bifuncional para promover la unión de oro con el material activo en Raman. El oro es un metal ventajoso en proporcionar dispersión de Raman potenciada en superficie, pero también son útiles metales tales como plata y cobre (o aleaciones de cualquiera de tales metales).

Se entiende que las características mostradas en las Figuras 14-17 y descritas anteriormente no pretenden ser limitantes. En particular, el satélite y las estructuras de núcleo/cubierta del objeto desvelado pueden usarse en una variedad de ensayos para potenciar las señales de analito, tales como un ensayo homogéneo o un ensayo de flujo lateral. Es posible que un único ensayo use ambos tipos de partículas. El tamaño, número, material y configuración de las nanopartículas **1512**, y micropartículas **1514**, puede variarse dependiendo del analito **1516** que se identifique y una amplificación deseada de un acontecimiento de señalización. De forma similar, para estructuras de núcleo/cubierta **1700**, el tamaño, material y espesor pueden adaptarse para el ensayo o entorno particular. Como se ha observado, una aplicación particularmente ventajosa para el objeto desvelado es para dispersión de Raman potenciada en superficie. Cuando dos nanoestructuras metálicas están en estrecha proximidad, tiene lugar el acoplamiento electromagnético de los campos plasmónicos de las dos estructuras, produciendo grandes potenciaciones de campo electromagnético. Cuando se coloca una molécula activa en Raman en el campo electromagnético potenciado, la intensidad de la señal de Raman de la molécula muestra un aumento de varios órdenes de magnitud frente a la señal cuando la molécula está en una nanopartícula aislada. Convencionalmente, los expertos en la materia han intentado agregar múltiples nanopartículas metálicas, pero tal agregación es difícil y en gran medida incontrolable. El objeto desvelado es capaz de proporcionar el acoplamiento electromagnético deseado, pero de una manera más ventajosa.

Además, aunque sin limitación a teoría particular alguna, se cree que las dos estructuras plasmónicas que interaccionan (bien núcleo y cubierta o bien núcleo y satélites) permitirán ajustar la longitud de onda a la que se produce la resonancia de plasmón superficial de la estructura compuesta. Se espera que este ajuste en combinación con la longitud de onda de un láser de excitación potencie adicionalmente la señal de Raman de las estructuras compuestas, aumentando de este modo la sensibilidad de cualquier ensayo.

Las estructuras compuestas del objeto desvelado pueden fabricarse por cualquier técnica apropiada. Por ejemplo, los siguientes documentos de patente proporcionan divulgación sobre la formación de nanopartículas, incluyendo revestimientos de sílice: Patentes de EE.UU. N.º 6.548.168 y 6.514.767 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2001/0002315. Otros procedimientos para formar y manipular partículas metálicas son conocidos por los expertos en la materia.

Además de las partículas esféricas tratadas anteriormente, son posibles otras configuraciones, tales como en forma de bastón u otras partículas de forma alargada y núcleos que comprenden múltiples partículas.

### III. TUBO DE ENSAYO Y PROCEDIMIENTOS DE USO DEL MISMO

Los tubos de ensayo desvelados, y procedimientos de uso de los mismos, pueden usarse con cualquiera de las partículas o procedimientos de ensayo desvelados.

#### A. Recipientes de recogida de muestras en general

El recipiente de muestras puede seleccionarse del grupo que consiste en una cubeta, un tubo, tal como un tubo de extracción de sangre, generalmente, un recipiente de ensayo, o cualquier otro recipiente de recogida de muestras compatible con la muestra que se ensaya y mediciones de SERS. El recipiente de recogida de muestras, por ejemplo, un tubo, puede tener una presión interna que es menor que la presión atmosférica del entorno circundante. Tales recipientes de recogida de muestras se desvelan en las patentes de EE.UU. N.º 5.860.937 de Cohen; 5.906.744 de Carroll y col.; y 6.821.789 de Augello y col. Además, el recipiente de recogida de muestras puede incluir un reactivo de detección que comprende las nanopartículas activas en SERS desveladas en el presente documento. En tal caso, el recipiente de recogida de muestras tiene un reactivo de detección dispuesto en el mismo antes de que el usuario, por ejemplo, un paciente o un técnico sanitario, recoja la muestra biológica, por ejemplo, sangre, que va a detectarse. El reactivo de detección, por ejemplo, puede inmovilizarse en una superficie interna, por ejemplo, una pared interna, del recipiente de recogida de muestras o simplemente disponerse de otro modo dentro del recipiente de muestras.

El recipiente de recogida de muestras, por ejemplo, un tubo de extracción de sangre, puede enviarse al usuario con el reactivo de detección dispuesto en el mismo. Como alternativa, el usuario puede seleccionar un reactivo de detección adecuado e introducir el reactivo de detección en el dispositivo de recogida antes de recoger el espécimen de muestra. Además, el objeto desvelado puede incluir un kit que comprende uno o más de un recipiente de recogida de muestras, tal como un tubo de extracción de sangre, uno o más reactivos, tal como uno o más reactivos de detección que comprenden nanopartículas que tienen una molécula indicadora activa en SERS unida con las mismas, partículas de captura magnética y componentes individuales de las mismas. Tales kits pueden incluir cualquier número de los componentes del ensayo, incluyendo múltiples moléculas indicadoras o múltiples miembros de unión específicos bien unidos a una nanopartícula o bien envasados por separado de las mismas.

#### B. Recipientes de recogida de muestras actualmente desvelados

En inmunoensayos convencionales, puede realizarse la detección de un antígeno por "intercalación" del antígeno entre dos anticuerpos, uno de los cuales está marcado con un indicador óptico o colorimétrico. La señal óptica medida puede entonces usarse para determinar la concentración del antígeno presente en la muestra. Inmunoensayos de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) convencionales son ejemplos de este tipo de tecnología. Un ensayo de captura magnética implica revestir partículas pequeñas magnéticamente susceptibles, tales como microperlas que oscilan en tamaño de varios cientos de nanómetros a decenas de micrómetros, con una sustancia específica de diana, por ejemplo un ligando o un anticuerpo. Las partículas se introducen en un pocillo que contiene una solución de las entidades diana, y moléculas biológicas no deseadas. Las entidades diana se unen entonces con el revestimiento en las partículas magnéticas. Las células, proteínas y secuencias de ácidos nucleicos son ejemplos de entidades diana. Se sitúan imanes cerca del pocillo para aplicar campos magnéticos en el pocillo y la solución.

Las partículas magnéticas, que incluyen las entidades diana unidas con las partículas, son atraídas a los imanes. Los imanes proporcionan una fuerza magnética suficiente para acumular las partículas de una manera oportuna. Dependiendo de la colocación del imán, las partículas pueden recogerse en el fondo o las paredes laterales de los pocillos. Es deseable un perfil de separación de partículas uniforme, tal como un perfil en el que las perlas se distribuyen uniformemente alrededor de la base de cada pocillo para producir un "perfil plano", o en el que las partículas se atraen a los laterales de los pocillos equitativamente.

En otro formato de ensayo, un ensayo de captura magnética que usa indicadores de dispersión de Raman potenciado en superficie (SERS), se genera una señal óptica formando un complejo mediado por antígenos entre un nanomarcador marcado con SERS y una partícula de captura magnética. Haciendo referencia de nuevo a la Figura 1, se ilustra un ejemplo del ensayo de SERS de captura magnética. Con este enfoque técnico, la magnitud de la señal óptica puede depender del tamaño, densidad y posición del sedimento de partículas magnéticas.

El tamaño, densidad y posición del sedimento de partículas magnéticas en relación con la óptica de consulta puede afectar a la magnitud y reproducibilidad de la señal óptica medida. Por ejemplo, la alteración de la funcionalidad de

superficie de las partículas magnéticas puede cambiar la forma del sedimento, que entonces podría conducir a señales ópticas significativamente diferentes. En diseños de tubos de análisis de muestras previos que tienen una ventana grande, la reacción de ensayo puede inactivarse manteniendo el tubo por encima de un imán para atraer las partículas magnéticas al fondo del tubo. Debido a que la ventana del tubo es relativamente grande en comparación con el número absoluto de partículas magnéticas, podría no formarse uniformemente un sedimento denso y puede ser necesaria una etapa adicional para la formación de sedimento. Un procedimiento para formar un sedimento magnético uniforme incluye usar un imán montado por debajo del tubo de ensayo, en el que el centro del imán se sitúa fuera del centro con respecto al eje del tubo de ensayo. Este procedimiento se ilustra en la Figura 5. Puede necesitarse normalmente solamente algunos segundos para que el imán induzca la formación de un sedimento en el fondo del tubo de ensayo. Normalmente, el sedimento toma la forma de un toroide, en el que no puede encontrarse casi ninguna partícula en el centro del sedimento. Rotando el tubo de ensayo alrededor de su eje central puede modularse el campo magnético experimentado por el sedimento de tal manera que el sedimento se haga más denso. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el objeto desvelado proporciona un procedimiento para la creación fiable de sedimentos de partículas magnéticas pequeños y densos.

Con referencia ahora a la Figura 5, se ilustra un procedimiento de formación de sedimentos fiable rotando el tubo de ensayo alrededor de un imán montado fuera del centro. La Figura 5A muestra una vista lateral del tubo de ensayo **500** y el imán **510**. Como se muestra en la Figura 5A, el imán **510** (por ejemplo, un bastón) se monta debajo del tubo de ensayo **500**, en el que el centro del imán se sitúa fuera del centro con respecto al eje del tubo de ensayo (mostrado como una línea discontinua en la Figura 5A). Se muestra una vista desde arriba del recipiente **500** y el imán **510** en la Figura 5B, en el que la parte superior del imán **510** se representa como un área de sección transversal **520**. En un ensayo basado en líquidos del tipo descrito en el presente documento, normalmente se necesita un periodo de tiempo corto, por ejemplo, algunos segundos, en que el imán **510** induzca la formación de un sedimento en el fondo del tubo de ensayo **500**. Normalmente, el sedimento toma la forma de un toroide, en el que no pueden encontrarse casi partículas en el centro del sedimento. La Figura 5C muestra una vista desde arriba de la formación del sedimento **530** en forma de un toroide. El área de sección transversal **520** del imán **510** puede verse a través del centro de sedimento **530**, que casi no contiene partículas. La material desvelada proporciona que al rotar el tubo de ensayo **500** alrededor de su eje central se module el campo magnético experimentado por el sedimento **530** de tal manera que el sedimento **530** se haga más denso. Con referencia ahora a la Figura 5D, se muestra una vista desde arriba de un sedimento más denso **540** formado después de rotar el tubo de ensayo **500** alrededor de su eje central.

### *C. Formación de sedimentos en ensayo basado en líquidos usando partículas magnéticas*

El pequeño tamaño del imán y la rotación adicional del tubo de ensayo puede conducir a un sedimento de partículas magnéticas más fiable y denso. Las fluctuaciones en la posición del imán, así como en la velocidad de rotación, sin embargo, pueden modular la posición del sedimento y la densidad y de este modo en última instancia pueden cambiar la señal óptica medida. Las etapas para formar el sedimento de partículas magnéticas deben realizarse por lo tanto con cuidado y habilidad. En consecuencia, existe la necesidad de un sistema para formar un sedimento de partículas magnéticas que tenga una densidad y forma uniformes en un tubo de ensayo, y que pueda conseguirse con un procedimiento más sencillo.

Haciendo referencia de nuevo a las Figuras 1 y 4, se ilustra un ejemplo de un ensayo de captura magnética y sistema de detección. El ensayo usa anticuerpos de captura unidos con partículas magnéticas. Se unen anticuerpos de detección con nanopartículas marcadas con dispersión de Raman potenciada en superficie (SERS). El anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección se unen cada uno específicamente con epítomos diferentes y definidos en un analito diana. En consecuencia, puede formarse un complejo mediado por antígeno entre la nanopartícula marcada con SERS y la partícula de captura magnética ("sándwich" S-A-M). Los complejos de sándwich S-A-M pueden después segregarse de la solución de muestra aplicando un campo magnético. Se usa un imán para atraer los complejos de sándwich al fondo del tubo en el que se mide una señal óptica del sedimento de partículas magnéticas resultantes. El objeto desvelado puede usarse con este procedimiento y técnica. Con este enfoque técnico, la magnitud de la señal óptica puede depender del tamaño, densidad y posición del sedimento de partículas magnéticas. La forma del sedimento magnético podría no ser siempre uniforme. Por ejemplo, la alteración de la funcionalidad de superficie de las partículas magnéticas puede cambiar la densidad y/o forma del sedimento. Como se muestra en la Figura 5, enfoques alternativos usan un imán montado debajo de un tubo de ensayo. Puede formarse un sedimento pequeño en el fondo del tubo de ensayo rotando el tubo de ensayo alrededor de su eje central. También se desvelan en el presente documento tubos de ensayo para su uso en los procedimientos desvelados.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 18A a 18C, un tubo de ensayo **1810** puede comprender un cuerpo alargado **1812** que tiene un extremo abierto **1814**, y una parte cónica **1816** que tiene un extremo cerrado **1818**. La parte cónica **1816** puede comprender además un fondo plano **1820** en el extremo cerrado **1818**. El tubo de ensayo **1810** puede tener un eje longitudinal central **1822** que es normal al fondo plano **1820**. Aunque las Figuras 18A-18C ilustran un cuerpo alargado cilíndrico **1812**, el objeto desvelado no se limita a un tubo de ensayo que tenga esta forma. El cuerpo alargado **1812** puede tener cualquier forma deseada, tal como, por ejemplo, triangular, cuadrada, multilateral, como pentagonal, hexagonal y octogonal, y otras formas geométricas. La forma de cuerpo alargado no es crítica. La parte cónica **1816**, ejemplificada en las Figuras 18A a 18C, tampoco se limita a un cono circular y

puede tener cualquier forma ahusada, tal como una forma externa que coincida con el cuerpo alargado o una forma diferente del cuerpo alargado, siempre que la parte sea ahusada o conduzca de otro modo a un diámetro o dimensión reducido en comparación con el diámetro o las dimensiones del cuerpo alargado.

5 El tubo de ensayo **1810** puede comprender una pared **1824** que tiene un grosor **1825** que varía de 0,1 mm a 1,25 mm, por ejemplo, 0,635 mm. Cualquier el espesor de pared es aceptable, y pueden usarse espesores de pared por encima y por debajo de este espesor dado. Según diversas realizaciones, el cuerpo alargado **1812** puede tener un diámetro interno **1826**, en el extremo abierto **1814**, que varía de 2,0 mm a 25 mm, por ejemplo, de 2,0 mm a 12 mm, o siendo 10,2 mm. Puede ser aceptable cualquier diámetro interno o interior, y pueden usarse diámetros internos por encima o por debajo de estas cantidades dadas. Además, cuando se usa una forma geométrica que no tiene un diámetro, los diámetros indicados pueden actuar como una longitud o longitud promedio o longitud más larga a través del espacio definido. Esta característica se aplica a todos los aspectos del objeto desvelado.

10 El cuerpo alargado **1812** puede ahusarse hacia la parte cónica **1816**, por ejemplo, de una manera ligera, tal como en un ángulo que oscila de 0 grados a 5 grados, tal como de un 1 grado a 3 grados. Pueden usarse ángulos por encima o por debajo de esta cantidad dada. El fondo plano **1820** puede tener un eje central **1834**, y la parte cónica **1816** puede ahusarse hacia el eje central **1834**. Este ángulo puede ser de 10 grados a 50 grados, de 15 grados a 45 grados, de 15 grados a 40 grados, o de 20 grados a 30 grados. Pueden usarse ángulos por encima o por debajo de esta cantidad dada. El ángulo en cada caso se determina usando el eje central **1834** como la línea de referencia.

15 El tubo de ensayo **1810** puede tener cualquier longitud general **1823**, tal como una que oscila de 10 mm a 50 mm, por ejemplo, de 20 mm a 30 mm, tal como 25,4 mm. Es aceptable cualquier longitud general, y pueden usarse longitudes generales por encima y por debajo de estas longitudes. El tubo de ensayo **1810** puede definir un volumen interior. El volumen interior puede oscilar de 0,1 ml a 50 ml, de 0,1 ml a 2,0 ml o más, o de 0,2 ml a 1,5 ml, por ejemplo, 1,4 ml, o 0,4 ml. Pueden usarse cantidades por encima o por debajo de este intervalo y no son críticas.

20 La parte cónica **1816** puede tener cualquier longitud, tal como una que oscila de 2,0 mm a 10,0 mm, por ejemplo, 6,35 mm. Pueden usarse longitudes por encima o por debajo de esta longitud. La parte cónica **1816** puede definir un volumen interior de cualquier cantidad, tal como oscilando 10 µl a 50 ml, de 10 µl a 5 ml, de 10 µl a 1 ml, de 10 µl a 500 µl, o de 50 µl a 400 µl, por ejemplo, 200 µl. El volumen interior puede estar por encima o por debajo de este intervalo.

25 El tubo de ensayo **1810** puede comprender un fondo plano **1820** que tiene una superficie interna **1826** y una superficie externa **1828**. La superficie interna **1826** y/o superficie externa **1828** pueden tener un acabado de calidad óptica o superficie pulida. El fondo plano **1820** puede tener cualquier espesor, tal como oscilando de 0,10 mm a 2,0 mm, o de 0,25 mm a 1,0 mm, por ejemplo, 0,635 mm. Pueden usarse otros espesores por encima o por debajo de estas cantidades.

30 El fondo plano **1820** puede tener cualquier diámetro interno **1829**, tal como uno que oscila de 0,25 mm a 10 mm, de 0,25 mm a 2,5 mm, o de 0,5 mm a 1,25 mm, por ejemplo, 1 mm. El fondo plano **1820** puede tener cualquier diámetro externo **1830**, tal como uno que oscila de 1,25 mm a 25 mm, por ejemplo, de 1,25 mm a 6 mm, por ejemplo 2,50 mm.

35 En general, para cualquier dimensión o volumen mencionado en el presente documento, pueden ser apropiados otros tamaños y dimensiones de tubos de ensayo. En general, se puede tener en cuenta, por ejemplo, el tipo y volumen de muestra, el tipo de ensayo, el volumen de los reactivos y/o el tamaño deseado del sedimento de partículas magnéticas.

40 El tubo de ensayo **1810** puede comprender un reborde **1821** que circunscribe el extremo abierto **1814**. El reborde **1821** puede tener cualquier espesor, tal como oscilando de 0,25 mm a 1,25 mm, por ejemplo, 0,80 mm.

45 El tubo de ensayo **1810** puede comprender además un tapón o dispositivo de cierre (no mostrado) que tiene una posición abierta y una posición cerrada para sellar el extremo abierto **1814**. El tapón puede configurarse para ajustar estrechamente en el extremo abierto **1814**. El tapón puede tener un tamaño y forma configurados para proteger y cubrir el perímetro de la apertura del tubo, y ayudar a mantener el interior del tubo de ensayo libre de cualquier contaminante. Los tapones pueden sellar los tubos de ensayo presionándolos hacia abajo frente a una fuerza de fricción resistente. El cierre puede ser de cualquier forma y puede implicar cualquier técnica de cierre, tal como ajuste por presión, ajuste por rosca y obturador. El tapón puede unirse con el tubo de ensayo **1810** por una bisagra flexible.

50 El tubo de ensayo **1810** puede comprender cualquier material que no reaccione con los componentes colocados en el mismo. Según diversas realizaciones, los materiales pueden tener un efecto mínimo sobre la transmisión de la luz y los espectros de fondo. El tubo de ensayo **1810** puede comprender material de vidrio, cerámico y/o polimérico, por ejemplo, polipropileno, polietileno, poliestireno, policarbonato y copolímero de olefina cíclica, o cualquier combinación de los mismos. El tubo de ensayo **1810** puede fabricarse por procedimientos convencionales, tales como, por ejemplo, moldeo por inyección u otras técnicas de moldeo.

55 El tubo de ensayo **1810** puede comprender un material térmicamente conductor y/o comprender paredes que tengan

un espesor que permita la rápida transferencia de calor, tal como se produce durante el ciclado térmico de la reacción en cadena de la polimerasa.

5 El fondo plano **1820** puede comprender una ventana de calidad óptica. Las características básicas de la ventana óptica pueden incluir calidad de superficie, uniformidad del espesor y/o pureza óptica. La calidad óptica se refiere a absorción mínima o ninguna y pérdida de dispersión de modo que puedan conseguirse niveles deseados de transmisión. La calidad óptica también incluye uniformidad de propiedades ópticas, tales como el índice de refracción. La ventana de calidad óptica puede no tener arañazos o defectos mayores de  $\alpha/2$  o no mayores de  $\alpha/4$ , siendo  $\alpha$  la longitud de onda de la luz emitida.

10 El objeto desvelado no se limita a tubos de ensayo de ensayo individuales. En consecuencia, un tubo de ensayo puede comprender una placa multipocillos. Un tubo de ensayo puede comprender, por ejemplo, una placa de 96 pocillos, una placa de 384 pocillos o una placa de 1536 pocillos. Las placas multipocillos pueden usarse en aplicaciones de alto rendimiento, que normalmente implican sistemas automáticos. En tales sistemas, por ejemplo, cada placa de 96 pocillos puede disponerse como 8 x 12 pocillos, cada placa de 384 pocillos puede disponerse como 16 x 24 pocillos, y cada placa de 1536 pocillos puede disponerse como 32 x 48 pocillos. Puede usarse cualquier disposición con el objeto desvelado.

15 Un sistema para formar un sedimento de partículas magnéticas en un tubo de ensayo puede comprender un tubo de ensayo y un imán situado adyacente y por debajo del tubo de ensayo. El tubo de ensayo puede comprender una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado, el tubo de ensayo capaz de mantener un volumen de partículas magnéticas contenidas en el mismo. El imán puede situarse adyacente (por ejemplo, debajo) del fondo plano del tubo de ensayo en el que el imán es capaz de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer partículas magnéticas contenidas dentro del volumen al fondo plano, formando de este modo un sedimento de partículas magnéticas. El tubo de ensayo puede contener una muestra que comprende partículas magnéticas dispuestas dentro del tubo de ensayo.

20 El tubo de ensayo puede contener además partículas magnéticas dispuestas dentro del tubo de ensayo. El fondo plano del tubo de ensayo puede tener un diámetro interno y puede formarse un sedimento de partículas magnéticas que tiene un diámetro o tamaño sustancialmente igual (dentro del 1 %, dentro del 5 %, dentro del 1 % del diámetro interno) que el diámetro interno.

25 Las partículas magnéticas pueden comprender materiales paramagnéticos, superparamagnéticos y/o ferromagnéticos. Las partículas magnéticas pueden ser o contener cualquier material magnético convencional, y pueden ser de cualquier tamaño/diámetro. Las partículas magnéticas pueden ser de cualquier tamaño, y según diversas realizaciones, puede tener un diámetro que oscila de 0,05  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$  o diámetros o longitudes/anchuras mayores o menores. Las partículas magnéticas pueden comprender, por ejemplo, óxido de hierro, magnetita o una combinación de los mismos. Las partículas magnéticas pueden comprender partículas magnéticas encapsuladas, por ejemplo, partículas que comprenden un núcleo rico en magnetita encapsulado con una cubierta polimérica. Las partículas magnéticas pueden comprender, por ejemplo, microsferas paramagnéticas, tales como de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, disponibles de Bangs Laboratories, Inc., Fishers, Indiana.

30 El área de superficie (por ejemplo, L x W) del imán puede ser igual, mayor o menor que el área de superficie del fondo plano. Por ejemplo, haciendo referencia ahora a la Figura 19, el área de superficie del imán **1940** puede ser mayor que el área de superficie del fondo plano **1920**. El imán **1940** puede situarse adyacente a y por debajo del fondo plano **1920** del tubo de ensayo **1910**. El imán puede solapar completamente y abarcar el fondo plano. El imán puede tener un área de superficie que es mayor que el área de superficie del fondo plano, por ejemplo, en un intervalo del 1 % al 200 %, o del 3 % al 100 % o del 5 % al 50 %, o del 5 % al 25 %, o del 5 % al 15 %, o del 1 % al 10 %. No hay un límite superior a cómo de grande puede ser el imán con respecto al área de superficie. Un imán que tenga un área de superficie mayor que, y que englobe, el fondo plano permite situar el tubo de ensayo **1910** con un grado de flexibilidad con respecto al imán y aun así producir un sedimento de partículas magnéticas uniforme.

35 Aunque las Figuras 19A y 19B ilustran un imán de forma circular **1940**, pueden usarse imanes de cualquier otra forma deseable. Preferentemente, los imanes proporcionan un campo magnético paralelo sustancialmente uniforme que se extiende a parte de o todo el volumen ocupado por el tubo de ensayo **1910** y tiene un gradiente uniforme dirigido hacia la superficie del imán. El imán **1940** puede tener, por ejemplo, una forma triangular, cuadrada, rectangular, hexagonal, trapezoidal o elíptica, u otra forma geométrica.

40 El imán **1940** puede comprender cualquier tipo de dispositivo productor de campo magnético externo. El imán **1940** puede comprender, por ejemplo, uno o más ferroimanes, ferri-imanes, imanes unidos a polímero, imanes de tierras raras, imanes cerámicos y/o electroimanes, o cualquier combinación de los mismos. El imán puede ser un dispositivo electromagnético. El imán **1940** puede comprender, por ejemplo, óxido de hierro, magnetita, gadolinio, alnico, ticonal, bario-estroncio, neodimio-hierro-boro y/o samario-cobalto, o cualquier combinación de los mismos. El imán **1940** puede producir un campo magnético suficiente para atraer a todas las partículas magnéticas al fondo plano **1920**, y el imán **1940** puede situarse de modo que el tubo de ensayo **1910** esté dentro de la influencia del campo magnético proporcionado por el imán **1940**. Si el campo magnético es demasiado débil, los sedimentos de partículas magnéticas pueden ser o bien incompletos o pueden necesitar más en completarse. El imán puede tener

una fuerza que varía de 1 militesla (mT) a 1 Tesla (T), o fuerzas por encima de este intervalo, por ejemplo 10 T. El imán puede ser una única pieza o puede ser múltiples piezas, tal como imanes múltiples dispuestos en cualquier configuración (por ejemplo, apilados y alineados uno junto al otro).

5 Los imanes pueden, por ejemplo, estar encerrados dentro de un alojamiento protector. El alojamiento puede ser capaz además de aceptar una pluralidad de tubos de ensayo, y pueden disponerse uno o más imanes en el alojamiento de modo que cada tubo de ensayo se sitúe dentro del alojamiento adyacente a al menos un imán. Además, pueden usarse múltiples electroimanes en los que cada electroimán se controla de forma independiente, por ejemplo, usando una fuente de energía dedicada.

10 El sistema puede comprender una pluralidad de tubos de ensayo, comprendiendo cada tubo de ensayo una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado y capaz de mantener un volumen de partículas magnéticas contenidas en el mismo. El sistema puede comprender además uno o más imanes situados adyacentes a y debajo de la pluralidad de tubos de ensayo, siendo el uno o más imanes capaces de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer las partículas magnéticas a un fondo plano respectivo de cada tubo de ensayo.

15 Como se ilustra en la Figura 19A, el tubo de ensayo **1910** puede tener un eje longitudinal **1922**, y el imán **1940** puede proporcionar un campo magnético **1942** que se alinea sustancialmente paralelo al eje longitudinal **1922**. El campo magnético **1942** puede mantener su alineamiento sustancialmente paralelo al volumen englobado por el tubo de ensayo **1910**. El tubo de ensayo **1910** y el imán **1940** pueden situarse adyacentes de modo que el campo magnético **1942** puede alinearse sustancialmente con el eje longitudinal **1922**. Adicionalmente, el alineamiento paralelo del campo magnético **1942** puede variar ligeramente en todo el volumen.

20 Como se ilustra en las Figuras 19A y 19B, el fondo plano **1920** puede comprender la superficie interna **1926**, y el imán **1940** puede proporcionar el campo magnético **1942** que se alinea sustancialmente normal a la superficie interna **1926**. El campo magnético **1942** puede mantener su alineamiento sustancialmente normal cuando penetra en un fluido dentro del tubo de ensayo **1910** que contiene partículas magnéticas, y también puede tener una fuerza sustancialmente uniforme a lo largo de la superficie interna completa **1926**.

25 En un procedimiento de formación de un sedimento de partículas magnéticas en un tubo de ensayo, puede proporcionarse un tubo de ensayo que comprende una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado, y que define un volumen interior en el mismo, y que contiene partículas magnéticas dentro del volumen interior. Puede situarse un imán adyacente a y debajo del fondo plano, en el que el imán es capaz de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer las partículas magnéticas al fondo plano y formar un sedimento de partículas magnéticas en el fondo plano. El fondo plano puede tener un diámetro interno y el sedimento de partículas magnéticas puede tener un diámetro de sedimentos que es sustancialmente igual o mayor que el diámetro interno.

30 El imán puede situarse adyacente a, y debajo de, el fondo plano del tubo de ensayo, y tanto el imán como el tubo de ensayo pueden permanecer estacionarios (por ejemplo, no es necesario girarlos) mientras se forma el sedimento de partículas magnéticas. El sedimento de partículas magnéticas puede formarse en el fondo plano durante un tiempo que oscila de 1 segundo a 5 minutos, o más, y en algunas realizaciones, 1 minuto.

35 Puede proporcionarse una pluralidad de tubos de ensayo, comprendiendo cada tubo de ensayo un cuerpo alargado y una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado, y que define un volumen interior en el mismo. Cada uno de los tubos de ensayo puede contener partículas magnéticas dentro del volumen interior. El procedimiento puede comprender además situar uno o más imanes adyacentes a y debajo de la pluralidad de tubos de ensayo, siendo el uno o más imanes capaces de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer las partículas magnéticas a un fondo plano respectivo de cada tubo de ensayo.

40 La fuerza magnética proporcionada a cada uno de la pluralidad de tubos de ensayo puede ser sustancialmente equivalente entre cada tubo de ensayo. Además, la fuerza magnética puede proporcionarse a cada tubo de ensayo durante sustancialmente el mismo periodo de tiempo. La fuerza magnética puede comenzar a atraer las partículas magnéticas en cada tubo de ensayo sustancialmente en el mismo momento en el tiempo.

45 Un sistema de detección de una señal puede comprender un tubo de ensayo que comprende una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado y capaz de mantener un volumen de complejo de partículas magnéticas contenido en el mismo. El tubo de ensayo puede contener un volumen de complejo de partículas magnéticas capaz de generar una señal detectable. Puede situarse un imán adyacente a y debajo del fondo plano del tubo de ensayo. El imán puede ser capaz de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer el complejo de partículas magnéticas contenido dentro del volumen al fondo plano para formar un sedimento de complejo de partículas magnéticas. El sistema puede comprender un detector capaz de detectar la señal generada del complejo de partículas magnéticas en el sedimento formado.

50 El complejo de partículas magnéticas puede comprender una partícula magnética que comprende una primera sonda de captura específica para un analito diana, una partícula activa en SERS que comprende una segunda sonda de captura específica para el analito diana, y el analito diana. El complejo de partículas magnéticas puede ser capaz de generar una señal de Raman. Los complejos se separan de la solución por aplicación de un campo magnético, y se mide la señal óptica del sedimento magnético resultante. Se describen adicionalmente

55

nanomarcadores marcados con SERS, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 6.514.767 y 7.192.778; y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/158870. Se describen adicionalmente agentes de captura magnética y ensayos de captura magnética en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.945.281 y 6.514.415; y O. Olsvik, "Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology", *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 7, 43-54 (1994).  
 5 Estos procedimientos y/o materiales pueden usarse en el objeto desvelado.

El tubo de ensayo puede comprender un fondo plano que comprende una ventana óptica. Puede detectarse una señal generada a partir del complejo de partículas magnéticas a través de la ventana óptica. La señal puede ser, por ejemplo, una señal de Raman. El detector puede comprender un láser capaz de explorar el complejo de partículas magnéticas. El detector puede comprender, por ejemplo, un espectrómetro y/o un dispositivo acoplado a carga. Con referencia a la Figura 4, se ilustra un sistema óptico para detectar una señal generada a partir de un complejo de partículas magnéticas. El sistema en la Figura 4 puede usarse con el tubo de ensayo y el procedimiento del objeto desvelado.  
 10

Un procedimiento de detección un analito diana en una muestra puede comprender proporcionar un tubo de ensayo que comprende una parte cónica que tiene un fondo plano cerrado, y que mantiene un volumen del complejo de partículas magnéticas contenido en el mismo. El complejo de partículas magnéticas puede comprender el analito diana y puede ser capaz de generar una señal detectable. El procedimiento puede comprender además situar un imán adyacente a y debajo del fondo plano, siendo el imán capaz de proporcionar una fuerza magnética suficiente para atraer el complejo de partículas magnéticas contenido dentro del tubo de ensayo al fondo plano y formar un sedimento de complejo de partículas magnéticas.  
 15

Puede formarse un sedimento de complejo de partículas magnéticas en el fondo plano. Puede detectarse una señal generada a partir del sedimento de complejo de partículas magnéticas y analizarse para determinar la presencia o ausencia del analito diana. Pueden determinarse la cantidad cuantitativa y/o la identidad del analito. Según el procedimiento, pueden proporcionarse una pluralidad de tubos de ensayo. Cada tubo de ensayo puede contener un volumen de complejo de partículas magnéticas que comprende un analito diana. El procedimiento puede comprender además situar uno o más imanes de modo que la fuerza magnética proporcionada a cada uno de la pluralidad de tubos de ensayo pueda ser sustancialmente equivalente entre cada tubo de ensayo. La fuerza magnética puede proporcionarse a cada tubo de ensayo durante sustancialmente el mismo periodo de tiempo. Además, la fuerza magnética puede comenzar a atraer al complejo de partículas magnéticas en cada tubo de ensayo sustancialmente en el mismo momento en el tiempo.  
 20

En el procedimiento, el complejo de partículas magnéticas puede comprender una partícula magnética que comprende una primera sonda de captura específica para el analito diana, una partícula activa en SERS que comprende una segunda sonda de captura específica para el analito diana y el analito diana. Un ejemplo del complejo de partículas magnéticas se ilustra en la Figura 1. El analito diana puede comprender un primer epítipo y un segundo epítipo que es diferente del primer epítipo. La primera sonda de captura puede comprender un primer resto que se une específicamente con el primer epítipo, y la segunda sonda de captura puede comprender un segundo resto que se une específicamente con el segundo epítipo. En consecuencia, puede formarse un complejo de "sándwich". El complejo de partículas magnéticas puede ser capaz de generar una señal de Raman.  
 25

Se introducen en un tubo de ensayo una partícula magnética que comprende una primera sonda de captura específica para un analito diana, una partícula activa en SERS que comprende una segunda sonda de captura específica para el analito diana y una muestra para analizar. Se proporcionan además condiciones apropiadas para permitir que se forme un complejo de partículas magnéticas. Por ejemplo, puede formarse un complejo de partículas magnéticas, tal como el complejo de "sándwich" ilustrado en la Figura 1. El procedimiento puede comprender una pluralidad de tubos de ensayo. Pueden situarse uno o más imanes de modo que pueda proporcionarse una fuerza magnética sustancialmente equivalente a cada tubo de ensayo sustancialmente en el mismo momento en el tiempo.  
 30

La formación del complejo de partículas magnéticas puede inactivarse de forma equivalente. El objeto desvelado puede usar una fuente de luz, por ejemplo, un láser, para explorar el complejo de partículas magnéticas. El tubo de ensayo puede comprender una ventana óptica y la señal puede detectarse a través de la ventana óptica. La señal puede detectarse usando un espectrómetro y/o un dispositivo acoplado a carga.  
 35

Por lo tanto, un sedimento magnético que es adecuado para un ensayo de captura magnética puede conseguirse con un procedimiento más sencillo que preferentemente no implica girar el tubo y/o imán para conseguir un sedimento magnético para fines del ensayo, tal como SERS u otras técnicas de detección. Puede conseguirse un ensayo uniforme, homogéneo y/o reproducible usando el objeto desvelado, de modo que pueda formarse un sedimento magnético reproducible en un tubo de ensayo que tenga las características deseadas y parámetros suficientes para los fines del ensayo como se describe en el presente documento. El alineamiento del imán con el tubo de ensayo no es crítico y puede obtenerse un complejo de partículas magnéticas homogéneo y/o reproducible uniforme que es capaz de generar una señal detectable para fines del ensayo. En algunos sistemas de ensayo anteriores, el alineamiento del imán era importante, en los que si el alineamiento no era apropiado, las partículas magnéticas no se formarían de una manera uniforme y deseable suficiente para usarse para fines del ensayo.  
 40

Otro beneficio es la capacidad del procedimiento desvelado para conseguir extinguir todo de una vez (por ejemplo,  
 45

en el plazo de 10 minutos, en el plazo de 5 minutos, en el plazo de 1 minuto, en el plazo de 30 segundos, en el plazo de 15 segundos). El diseño del tubo de ensayo permite que la extinción suceda esencialmente de una vez, de modo que la intercalación se inactiva y se detiene la reacción de anticuerpos, que permite conseguir un mejor complejo de partículas magnéticas que tiene los contenidos deseables para los fines de conseguir un ensayo preciso, completo y reproducible usando SERS.

Con referencia a la Figura 2, se muestran los resultados de un ensayo de hormona estimulante de la tiroides (TSFI). El ensayo se realizó usando un tubo de ensayo según el objeto desvelado. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra la curva de unión resultante. El límite de detección mínimo (MDL) conseguido y el límite de detección fiable (RDL) son al menos tan buenos como se observa normalmente usando diseños de tubos de ensayo previos.

#### 10 IV. ANALITOS DIANA DE INTERÉS REPRESENTATIVOS

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para evaluar o medir la presencia o cantidad de uno o más analitos diana en una muestra biológica. El término "analito", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una sustancia que va a detectarse, que puede estar presente o se sospecha que está presente en una muestra de ensayo. Más particularmente, un "analito" puede ser cualquier sustancia para la que existe un componente de unión específico que existe de forma natural, tal como una proteína de unión o receptor, o para el que puede prepararse un componente de unión específica. En consecuencia, un "analito" es una sustancia que puede unirse con uno o más componentes de unión específicos en un ensayo. El analito puede ser cualquier compuesto, tal como un metabolito, para ser detectado o medido y que tiene al menos un sitio de unión.

Los analitos diana pueden ser cualquier molécula o compuesto, cuya presencia o cantidad debe determinarse en una muestra que se ensaya. Ejemplos de clases de analitos que pueden medirse por los procedimientos desvelados incluyen aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, lípidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, glucoproteínas, tales como antígeno específico de la próstata (PSA), proteoglicanos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fármacos, metabolitos de fármaco, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas y polímeros naturales o sintéticos. Ejemplos de analitos diana incluyen glucosa, ácidos grasos libres, ácido láctico, proteína C reactiva y mediadores antiinflamatorios, tales como citocinas, eicosanoides o leucotrienos. Los analitos diana están seleccionados del grupo que consiste en ácidos grasos, proteína C reactiva y leucotrienos. Además, los analitos diana pueden seleccionarse del grupo que consiste en glucosa, ácido láctico y ácidos grasos.

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

El antígeno específico de la próstata (PSA) es una proteína producida por las células de la glándula prostática y normalmente está presente en cantidades pequeñas en el suero de hombres normales. El PSA puede elevarse en hombres afectados de cáncer de próstata u otros trastornos de la próstata. Se considera que los niveles normales en sangre de PSA normalmente están entre 0,0 y 4,0 ng/ml, mientras que los niveles de PSA entre 4 y 10 ng/ml (nanogramos por mililitro) se consideran sospechosos.

La creatina cinasa (CK), también conocida como fosfocreatina cinasa o creatina fosfocinasa (CPK), es una enzima encontrada predominantemente en el corazón, cerebro y músculo esquelético. La creatina cinasa comprende tres isoenzimas que difieren ligeramente en estructura: CK-BB (también denominada CPK-1) está concentrada en el cerebro y los pulmones; CK-MB (también denominada CPK-2) se encuentra principalmente en el corazón; y CK-MM (también denominada CPK-3) se encuentra principalmente en el músculo esquelético. Se realizan ensayos de diagnóstico para isoenzimas CPK específicas normalmente cuando el nivel de CPK total es elevado y puede ayudar a diferenciar la fuente del tejido dañado. Por ejemplo, una lesión al cerebro, por ejemplo, un accidente cerebrovascular, o pulmones, por ejemplo, una embolia pulmonar, puede asociarse con niveles elevados de CK-BB. Además, CK-MM es normalmente responsable de casi toda la actividad enzimática de CPK en sujetos sanos. Cuando esta isoenzima particular está elevada, habitualmente indica lesión o tensión al músculo esquelético.

Los niveles de CK-MB pueden medirse en sujetos que tienen dolor torácico para diagnosticar si han tenido un infarto de miocardio y/o como una indicación de daño miocárdico durante infartos de miocardio. Normalmente, los valores de CK-MB presentan un aumento significativo en los valores de CK-MB en las dos o tres primeras horas después de un infarto de miocardio. Si no hay daño adicional al músculo cardíaco, el nivel alcanza un máximo a las 12-24 horas y vuelve a la normalidad 12-48 horas después de la muerte tisular. Los niveles de CK-MB normalmente no se elevan con el dolor torácico producido por angina, embolia pulmonar (coágulo sanguíneo en el pulmón) o insuficiencia cardíaca congestiva. También pueden observarse niveles de CK-MB elevados en sujetos que padecen miocarditis (inflamación del músculo cardíaco, por ejemplo, debido a un virus), lesiones eléctricas, traumatismo en el corazón, desfibrilación cardíaca y cirugía a corazón abierto. Los valores de CK-MB en suero sanguíneo medidos en tales ensayos normalmente varían de 0,0 a 10 ng/ml. Los valores de CK-MB mayores de 5 ng/ml normalmente confirman un diagnóstico de infarto de miocardio.

La proteína troponina cardíaca I (cTnI) también es un factor pronóstico independiente de acontecimientos cardíacos importantes (véase, por ejemplo, Polanczyk, C. A., y col., "Cardiac troponin I as a predictor of major cardiac events in emergency department patients with acute chest pain", *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32, 8-14 (1998)). Los valores de cTnI en suero sanguíneo medidos en un sujeto que se sospecha que tiene un infarto de miocardio oscilan de 0,4 ng/ml a 1,5 ng/ml. *Ibidem*. Los ensayos de cTnI con límites de detección inferiores de 0,1 ng/ml tienen el potencial, sin embargo, de ser más sensibles para detectar lesión miocárdica. *Ibidem*.

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) se sintetiza y secreta por células tirotrópicas en la glándula pituitaria anterior que regula la función endocrina de la glándula tiroidea. Los niveles de TSH se ensayan en la sangre de sujetos que se sospecha que padecen un exceso (hipertiroidismo) o deficiencia (hipotiroidismo) de hormona tiroidea. Los niveles de TSH normales en adultos oscilan de 0,4 mili-unidades internacionales por litro (mUI/l) a 4,5 mUI/l. Los ensayos actuales para TSH incluyen ELISA de sándwich para la medición de TSH en suero sanguíneo o plasma, en los que TSH en la muestra se une con anticuerpos monoclonales anti-TSH y después se detecta por espectrofotometría o colorimetría.

Los ensayos desvelados en el presente documento también pueden usarse para detectar virus de la gripe. Existen tres tipos de virus de la gripe: virus de la gripe A; virus de la gripe B y virus de la gripe C. La gripe A (Flu A) y gripe C (Flu C) infectan a múltiples especies, mientras que la gripe B (Flu B) infecta casi exclusivamente a seres humanos. Los virus de tipo A son los patógenos humanos más virulentos entre los tres tipos de gripe y normalmente provocan la enfermedad más grave. El virus de gripe A puede subdividirse en diferentes serotipos basándose en la respuesta de anticuerpos a estos virus e incluyen H1N1 (es decir, "Gripe Española"); H2N2 (es decir, "Gripe de Hong Kong"); H5N1 (es decir, la cepa de la gripe aviar o "Gripe Aviar"); H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3 y H1N7. La gripe B es casi exclusivamente un patógeno humano y es menos común que la gripe A y solamente incluye un serotipo. El virus de la gripe C infecta a seres humanos y cerdos y puede provocar enfermedad grave y epidemias locales, pero es menos común que los otros tipos.

Los ensayos de diagnóstico disponibles para la gripe incluyen inmunoensayo rápido, ensayo de inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y cultivo viral. Los ensayos de inmunofluorescencia implican la tinción de especímenes inmovilizados en portaobjetos de microscopio usando anticuerpos marcados con fluorescencia para la observación por microscopía de fluorescencia. Los procedimientos de cultivo emplean aislamiento viral inicial en cultivo celular, seguido de inhibición de hemadsorción, inmunofluorescencia o ensayos de neutralización para confirmar la presencia del virus de la gripe. Los ensayos de detección de antígenos para diagnosticar la infección por gripe incluyen kits de ensayo DIRECTIGEN™ EZ Flu A o DIRECTIGEN™ EZ Flu A+B (disponibles de BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland). Tales inmunoensayos cromatográficos rápidos pueden usarse para la detección directa de antígenos virales de gripe A o de gripe A y B de lavados/aspirados nasofaríngeos, hisopos nasofaríngeos e hisopos de garganta de pacientes sintomáticos. Además, tales pruebas de diagnóstico pueden usarse para distinguir entre la gripe A y la gripe B.

El virus respiratorio sincitial (VSR) es la causa más común de bronquiolitis y neumonía entre bebés y niños de menos de 1 año de edad. El VSR es un virus de ARN con envoltura, de sentido negativo. Puede hacerse diagnóstico de infección por VSR mediante aislamiento de virus, detección de antígenos virales, detección de ARN viral, demostración de un aumento en los anticuerpos del suero, o una combinación de estos enfoques. Procedimientos tradicionales para la detección de virus respiratorios han incluido cultivo celular y anticuerpo fluorescente directo (DFA). Están disponibles inmunoensayos enzimáticos (EIA) y sistemas manuales rápidos para virus específicos tales como gripe A/B y VSR. En la actualidad, la mayoría de los laboratorios clínicos usan ensayos de detección de antígenos para diagnosticar infección por VSR, tales como el ensayo de VSR DIRECTIGEN™ EZ RSV (disponible de BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland), que es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección directa y cualitativa del antígeno de VSR en lavados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, hisopos nasofaríngeos e hisopos/lavados nasofaríngeos de sujetos que se sospecha que tienen una infección respiratoria viral.

En consecuencia, el objeto desvelado se refiere a un procedimiento de detección de la presencia o cantidad de un analito diana en una muestra biológica, por ejemplo, suero sanguíneo, en el que el analito diana incluye glucosa, antígeno específico de la próstata (PSA), isoenzima creatina cinasa MB (CKMB), proteína troponina cardíaca I (cTnI), hormona estimulante de la tiroides (TSH), antígeno de gripe A (Flu A), antígeno de gripe B (Flu B) y antígeno de virus respiratorio sincitial (VSR), comprendiendo el procedimiento poner en contacto la muestra biológica con un reactivo que comprende una o más nanopartículas activas en SERS que tienen asociadas con las mismas al menos un miembro de unión específico que tiene una afinidad por el analito, por ejemplo, una proteína de unión específica o anticuerpo monoclonal o policlonal para el analito de interés, y al menos una molécula indicadora activa en SERS; iluminar la muestra biológica con radiación incidente a una longitud de onda para inducir que la molécula indicadora activa en SERS produzca una señal de SERS; y medir la señal de SERS para detectar la presencia o cantidad de analito en la muestra biológica.

Como se usa en el presente documento, el término "hidrato de carbono" incluye monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. "Hidrato de carbono" también incluye moléculas que comprenden carbono, hidrógeno y oxígeno que no quedan dentro de la definición tradicional de un sacárido, es decir, un derivado aldehído o cetona de un alcohol polihidroxílico de cadena lineal, que contiene al menos tres átomos de carbono. Por lo tanto, por ejemplo, un hidrato de carbono como se usa en el presente documento puede contener menos de tres átomos de

carbono.

El término "ácidos grasos", como se usa en el presente documento, incluye todos los ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos libres (FFA) y ácidos grasos esterificados con otras moléculas. Ejemplos de ácidos grasos específicos incluyen palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato y araquidonato. El término "ácido graso libre" se usa en el presente documento como se conoce en la técnica porque los FFA no son parte de otras moléculas, tales como triglicéridos o fosfolípidos. Los ácidos grasos libres también incluyen ácidos grasos no esterificados que están unidos con o adsorbidos en albúmina. Como se usa en el presente documento, el término "ácido graso libre no unido" (FFA no unido) se usa para indicar un ácido graso libre o ácidos grasos libres que no están unidos o adsorbidos en albúmina u otras proteínas del suero.

Como se usa en el presente documento, el término "lípidos" se usa como en la técnica, es decir, una sustancia de origen biológico que está compuesta principalmente o exclusivamente de grupos químicos no polares de modo que sea fácilmente soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, pero solamente moderadamente soluble en disolventes acuosos. Ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos, triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, colesterol, esteroides y derivados de los mismos. Por ejemplo, los "lípidos" incluyen las ceramidas, que son derivados de esfingolípidos y derivados de ceramidas, tales como esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos. Los "lípidos" también incluyen las clases comunes de glicerofosfolípidos (o fosfolípidos), tales como ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidilglicerol.

Como se usa en el presente documento, un "fármaco" puede ser un fármaco conocido o un candidato farmacológico, cuya actividad o efectos sobre un tipo celular particular aún no se conocen. Un "metabolito de fármaco" es cualquiera de los subproductos o los productos de degradación de un fármaco que se cambia químicamente a otro compuesto o compuestos. Como se usa en el presente documento, "molécula orgánica pequeña" incluye una molécula orgánica o compuesto que no se ajusta precisamente a otras clasificaciones destacadas en el presente documento. Más particularmente, el término "molécula orgánica pequeña", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos, bien que existen de forma natural o bien creados de forma artificial (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Normalmente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de menos de 15 g/mol. Además, las moléculas pequeñas normalmente tienen múltiples enlaces carbono-carbono.

Además, se desvela un procedimiento de detección de uno o más de un ácido nucleico, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN), un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido y un oligonucleótido. Generalmente, el procedimiento comprende poner en contacto uno o más de un ácido nucleico, un fragmento de ADN, un nucleótido, un polinucleótido, un oligonucleótido, con una nanopartícula activa en SERS desvelada que tiene un oligonucleótido unido a la misma y detectar la presencia de o un cambio en el espectro de SERS del mismo. Los oligonucleótidos unidos con las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden tener una secuencia, o secuencias, complementarias a partes de la secuencia del ácido nucleico diana, fragmento de ADN, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido. Puede observarse un espectro de SERS detectable y/o un cambio en el espectro de SERS como resultado de la hibridación del oligonucleótido unido con la nanopartícula activa en SERS y el ácido nucleico diana, fragmento de ADN, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas, los oligonucleótidos, o ambos, pueden funcionalizarse para unir los oligonucleótidos con las nanopartículas. Tales procedimientos se conocen en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos funcionalizados con alcanotioles en los extremos 3' o extremos 5' se unen fácilmente con nanopartículas, que incluyen oro y otras nanopartículas metálicas (véase, por ejemplo, Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nano-phase Chemistry, Houston, Tex., pp. 19-121 (1996); véase también Mucic y col., Chem. Commun. 555-557 (1996) (que describe un procedimiento para unir ADN de tior en 3' con superficies de oro planas que también pueden usarse para unir oligonucleótidos con nanopartículas)).

Otros grupos funcionales adecuados para unir oligonucleótidos con superficies sólidas incluyen los grupos fosforotioato (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.472.881 de Beebe y col. para la unión de oligonucleótido-fosforotioatos con superficies de oro), alquilsiloxanos sustituidos (véase, por ejemplo, Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981) para la unión de oligonucleótidos con superficies de sílice y vidrio, y Grabar y col., Anal. Chem., 67, 735-743 (1995) para la unión de aminoalquilsiloxanos y para unión similar de mercaptoalquilsiloxanos). Los oligonucleótidos terminados con un tionucleósido en 5' o un tionucleósido de 3' también pueden usarse para unir oligonucleótidos con superficies sólidas.

Se conocen otros procedimientos en la técnica para unir oligonucleótidos con nanopartículas. Tales procedimientos se describen en las siguientes referencias representativas: Nuzzo y col., J Am. Chem. Soc., 109, 2358 (1987) (disulfuros en oro); Aliara y Nuzzo, Langmuir, 1, 45 (1985) (ácidos carboxílicos en aluminio); Aliara y Tompkins, J. Colloid Interface Sci., 49, 410-421 (1974) (ácidos carboxílicos en cobre); Iler, The Chemistry Of Silica, Capítulo 6, John Wiley & Sons, Nueva York (1979) (ácidos carboxílicos en sílice); Timmons y Zisman, J. Phys. Chem., 69, 984-990 (1965) (ácidos carboxílicos en platino); Soriaga y Hubbard, J. Am. Chem. Soc., 104, 3937 (1982) (compuestos de anillos aromáticos en platino); Hubbard, Acc. Chem. Res., 13, 177 (1980) (sulfolanos, sulfóxidos y otros

disolventes funcionalizados en platino); Hickman y col., J. Am. Chem. Soc., 111, 7271 (1989) (isonitrilos en platino); Maoz y Sagiv, Langmuir, 3, 1045 (1987) (silanos en sílice); Maoz y Sagiv, Langmuir, 3, 1034 (1987) (silanos en sílice); Wasserman y col., Langmuir, 5, 1074 (1989) (silanos en sílice); Eltekova y Eltekov, Langmuir, 3, 951 (1987) (ácidos carboxílicos aromáticos, aldehídos, alcoholes y grupos metoxi en dióxido de titanio y sílice); Lee y col., J. Phys. Chem., 92, 2597 (1988) (fosfatos rígidos en metales).

Además, los oligonucleótidos funcionalizados con un disulfuro cíclico, por ejemplo, disulfuros cíclicos que tienen un anillo de 5 a 6 miembros que incluye al menos dos átomos de azufre, también son adecuados para su uso con el objeto desvelado. Los disulfuros cíclicos adecuados también están disponibles en el mercado o pueden sintetizarse por procedimientos conocidos. También puede usarse la forma reducida de los disulfuros cíclicos. El disulfuro cíclico puede tener adicionalmente un conector, por ejemplo, un resto de hidrocarburo, tal como un resto esteroide, unido al mismo. Cada nanopartícula puede tener una pluralidad de oligonucleótidos unidos a la misma. Como resultado, cada conjugado de nanopartícula-oligonucleótido puede unirse con una pluralidad de oligonucleótidos o ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria. Son bien conocidos procedimientos de preparación de oligonucleótidos de una secuencia predeterminada (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y F. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1ª Ed. (Oxford University Press, Nueva York, 1991)). Pueden usarse procedimientos de síntesis en fase sólida para oligorribonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos (los procedimientos conocidos para sintetizar ADN también son útiles para sintetizar ARN). También pueden prepararse de forma enzimática oligorribonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos.

En consecuencia, se desvela un procedimiento de detección de ácidos nucleicos. Puede detectarse cualquier tipo de ácido nucleico por el procedimiento desvelado. Por lo tanto, los procedimientos desvelados pueden usarse en varias aplicaciones en las que se requiere la detección de un ácido nucleico, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedad y en la secuenciación de ácidos nucleicos. Ejemplos de ácidos nucleicos que pueden ser detectados por los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen genes (por ejemplo, un gen asociado con una enfermedad particular), ARN y ADN viral, ADN bacteriano, ADN fúngico, ADNc, ARNm, fragmentos de ARN y ADN, oligonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos modificados, ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios y ácidos nucleicos naturales y sintéticos.

Ejemplos representativos de los usos de los procedimientos de detección de ácidos nucleicos incluyen el diagnóstico y/o monitorización de enfermedades virales (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis, virus del herpes, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr), enfermedades bacterianas (por ejemplo, tuberculosis, enfermedad de Lyme, *H. pylori*, infecciones por *Escherichia coli*, infecciones por Legionella, infecciones por Mycoplasma, infecciones por Salmonella), enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, gonorrea), trastornos heredados (por ejemplo, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchene, fenilcetonuria, anemia de células falciformes) y cánceres (por ejemplo, genes asociados con el desarrollo del cáncer); en medicina forense; en secuenciación de ADN; para pruebas de paternidad; para la autenticación de líneas celulares; para monitorizar la terapia génica; y para muchos otros fines.

El ácido nucleico que va a detectarse puede aislarse por procedimientos conocidos, o puede detectarse directamente en células, muestra tisulares, fluidos biológicos (por ejemplo, saliva, orina, sangre, suero), soluciones que contienen componentes de PCR, soluciones que contienen grandes excesos de oligonucleótidos o ADN de peso molecular alto, y otras muestras, como también se conoce en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins, Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995)). También son bien conocidos en la técnica procedimientos de preparación de ácidos nucleicos para la detección con sondas de hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins, Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995)). Si está presente un ácido nucleico en cantidades pequeñas, puede aplicarse por procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) y B. D. Hames y S. J. Higgins, Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nueva York, 1995)).

Un procedimiento desvelado de detección ácido nucleico comprende poner en contacto el ácido nucleico con una o más de las nanopartículas desveladas que tienen oligonucleótidos unidos con las mismas. El ácido nucleico que va a detectarse puede tener al menos dos partes. Las longitudes de estas partes y la(s) distancia(s), si las hubiera, entre las mismas se eligen para que cuando los oligonucleótidos en las nanopartículas se hibriden con el ácido nucleico, pueda observarse una señal de SERS detectable. Estas longitudes y distancias pueden determinarse de forma empírica y dependen del tipo de partícula usado y su tamaño y el tipo de electrolito presente en soluciones usadas en el ensayo (como se conoce en la técnica, ciertos electrolitos afectan a la conformación de los ácidos nucleicos).

Además, cuando va a detectarse un ácido nucleico en presencia de otros ácidos nucleicos, las partes del ácido nucleico con las que van a unirse los oligonucleótidos en las nanopartículas deben seleccionarse para que contengan suficiente secuencia única de modo que la detección del ácido nucleico sea específica. Son bien conocidas en la técnica directrices para hacerlo. La puesta en contacto de los conjugados de nanopartículas-oligonucleótidos con el ácido nucleico tiene lugar en condiciones eficaces para la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con la(s) secuencia(s) diana del ácido nucleico. Estas condiciones de hibridación son bien

conocidas en la técnica y pueden optimizarse fácilmente para el sistema particular empleado (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989)). En algunas realizaciones, se emplean condiciones de hibridación rigurosas.

5 Se desvelan procedimientos representativos de detección de ácidos nucleicos usando nanopartículas activas en SERS que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas en la patente de EE.UU. N.º 7.169.556 de Park y col.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" incluye cualquier muestra de líquido o fluido, incluyendo una muestra derivada de una fuente biológica, tal como un fluido fisiológico, incluyendo sangre completa o componentes de sangre completa, tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, suero y plasma; líquido ascítico; orina; saliva; sudor; leche; líquido sinovial; líquido peritoneal; líquido amniótico; líquido percefalorraquídeo; 10 líquido linfático; embolia pulmonar; líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico; muestras cervicovaginales; extractos tisulares; extractos celulares; y otros constituyentes del cuerpo que se sospecha que contienen el analito de interés. Además de los fluidos fisiológicos, otras muestras líquidas, tales como agua y productos alimentarios, para el rendimiento de ensayos ambientales o de producción de alimentos son adecuados para su uso con el objeto desvelado. Un material sólido que se sospecha que contiene el analito también puede usarse como la muestra de 15 ensayo. En algunos casos podría ser beneficioso modificar una muestra de ensayo sólida para formar un medio líquido o para liberar el analito.

La muestra puede pretratarse antes de uso, tal como preparando plasma a partir de sangre o diluyendo líquidos viscosos. Tales procedimientos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, concentración, inactivación de 20 compuestos de interferencia y la adición de reactivos. La muestra puede ser cualquier muestra obtenida de un sujeto. El término "sujeto" se refiere a un organismo, tejido o célula del que puede obtenerse una muestra. Un sujeto puede incluir un sujeto humano para fines médicos, tales como diagnóstico y/o tratamiento de una afección o enfermedad, o un sujeto animal para fines médicos, veterinarios o fines de desarrollo. Un sujeto también puede incluir material de muestra de cultivo tisular, cultivo celular, replicación de órganos y producción de células madre. Sujetos animales adecuados incluyen mamíferos y aves. El término "aviar" como se usa en el presente 25 documento incluye pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes.

El término "mamífero", como se usa en el presente documento, incluye primates, por ejemplo, seres humanos, monos y simios; bovinos, por ejemplo, vacas y bueyes; ovinos, por ejemplo, ovejas; caprinos, por ejemplo, cabras; porcinos, por ejemplo, cerdos y puercos; equinos, por ejemplo, caballos, burros y cebras; felinos, incluyendo gatos salvajes y domésticos; caninos, incluyendo perros; lagomorfos, incluyendo conejos y liebres; y roedores, incluyendo 30 ratones y ratas. Preferentemente, el sujeto es un mamífero o una célula de mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano o una célula humana. Los sujetos humanos incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos. Además, un "sujeto" puede incluir un paciente aquejado de o que se sospecha que está aquejado de una afección o enfermedad. Por lo tanto, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento. Un sujeto también puede referirse a células o colecciones de células en laboratorio o cultivo de 35 bioprociamiento en ensayos para viabilidad, diferenciación, producción de marcadores y expresión.

Los procedimientos desvelados pueden usarse para diagnosticar, para el pronóstico, o la monitorización de una patología o afección. Como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" se refiere a un proceso predictivo en el que se evalúa la presencia, ausencia, gravedad o evolución del tratamiento de una enfermedad, 40 trastorno u otra afección médica. Para fines del presente documento, el diagnóstico también incluye procedimientos predictivos para determinar el resultado proveniente de un tratamiento. De forma similar, el término "diagnosticar" se refiere a la determinación de si un espécimen de ensayo presenta una o más características de una afección o enfermedad. El término "diagnosticar" incluye establecer la presencia o ausencia de, por ejemplo, un antígeno diana o dianas unidas a reactivo, o establecer, o determinar de otro modo una o más características de una afección o enfermedad, incluyendo el tipo, grado, estadio o condiciones similares. Como se usa en el presente documento, el 45 término "diagnosticar" puede incluir distinguir una forma de una enfermedad de otra. El término "diagnosticar" engloba el diagnóstico o detección inicial, el pronóstico y la monitorización de una afección o enfermedad.

El término "pronóstico", y derivaciones del mismo, se refiere a la determinación o predicción de la evolución de una enfermedad o afección. La evolución de una enfermedad o afección puede determinarse, por ejemplo, basándose en la esperanza de vida o calidad de vida. El "pronóstico" incluye la determinación de la evolución temporal de una 50 enfermedad o afección, con o sin un tratamiento o tratamientos. En el caso en el que se contemple(n) tratamiento(s), el pronóstico incluye determinar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, el término "riesgo" se refiere a un proceso predictivo en el que se evalúa la probabilidad de un resultado particular.

El término "monitorizar", tal como "monitorizar la evolución de una enfermedad o afección", se refiere al diagnóstico 55 continuado de muestras obtenidas de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o afección.

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

El objeto desvelado también proporciona procedimientos de monitorización de patologías en un sujeto, incluyendo

enfermedades crónicas, tales como enfermedad cardíaca, enfermedad de las arterias coronarias, diabetes, trastornos metabólicos, enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide y cáncer. Los trastornos metabólicos pueden incluir hiperlipidemias, hipolipidemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo. Además, los procedimientos desvelados pueden usarse para monitorizar marcadores específicos de una enfermedad crónica. Monitorizando las concentraciones de artefactos moleculares, metabolitos y moléculas perjudiciales y/o beneficiosas de una patología, puede evaluarse la progresión, regresión o estabilidad del sujeto, y pueden, a su vez, ajustarse o revisarse los tratamientos en consecuencia. Por ejemplo, los marcadores para enfermedad cardíaca que podrían controlarse *in vivo* usando los biosensores desvelados incluyen ácidos grasos totales, lactato, glucosa, ácidos grasos libres y diversos agentes cardiotónicos, tales como cardioglucósidos y simpatomiméticos. Los marcadores de diabetes incluyen glucosa, lactato y ácidos grasos. De forma similar, los marcadores para enfermedad de las arterias coronarias incluyen péptido C reactivo y ácidos grasos libres. En general, los marcadores de diversos trastornos metabólicos incluyen ácidos grasos específicos.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas también son adecuadas para su uso en dispositivos para monitorizar el tratamiento farmacológico. De hecho, la nanopartícula activa en SERS puede diseñarse para unirse específicamente con un fármaco, candidato farmacológico o un metabolito de fármaco. De esta manera, la concentración plasmática del fármaco podrían monitorizarse y las dosificaciones podrían ajustarse o mantenerse basándose en las mediciones de concentración proporcionadas por el procedimiento de SERS. En consecuencia, podría individualizarse un régimen farmacéutico para un sujeto particular, incluyendo el uso de una nanopartícula activa en SERS que puede unirse específica y reversiblemente con el fármaco o metabolito de fármaco para determinar las concentraciones en plasma del fármaco. Las concentraciones proporcionadas por el procedimiento de SERS podrían usarse después para determinar la biodisponibilidad del fármaco en el sujeto. La dosis del fármaco administrado al sujeto puede después alterarse para aumentar o reducir la biodisponibilidad del fármaco al sujeto para proporcionar beneficios terapéuticos máximos y evitar la toxicidad. Las nanopartículas activas en SERS desveladas también pueden usarse para monitorizar simultáneamente una variedad de metabolitos, cuyas mediciones podrían usarse para perfilar el estado metabólico o físico del sujeto. Por ejemplo, durante periodos prolongados de ejercicio intenso, la glucosa se degrada en procesos anaerobios a ácido láctico. Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden usarse para determinar los umbrales de lactato de atletas, para maximizar los beneficios del entrenamiento y reducir el tiempo de recuperación. De forma similar, pueden usarse nanopartículas activas en SERS para determinar los umbrales de lactato en soldados para evitar la fatiga y el cansancio y para reducir el tiempo de recuperación. Para ese fin, pueden usarse las nanopartículas activas en SERS desveladas para monitorizar los niveles de glucosa, niveles de ácido láctico y otros metabolitos durante el ejercicio o la tensión física.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas también pueden usarse para monitorizar una afección o patología en un paciente en una instalación de cuidados agudos, tal como una sala de urgencias o una sala de recuperación postoperatoria o un hospital. Por ejemplo, cuando se proporciona un procedimiento de monitorización de los niveles de glucosa en un sujeto, los estudios han mostrado que la mortalidad puede reducirse hasta el 3 % en pacientes postoperatorios cuando se monitorizan y se mantienen normales los niveles de glucosa. Por lo tanto, los ensayos de diagnóstico basados en SERS desvelados pueden usarse en situaciones en las que monitorizar la glucosa u otros metabolitos es esencial para la recuperación de la salud general del sujeto.

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

La cantidad (concentración) de un analito puede ser igual a cero, que indica la ausencia del analito particular que se busca o que la concentración del analito particular está por debajo de los límites de detección del ensayo. La cantidad medida puede ser la señal de SERS sin ninguna medición o manipulación adicional. Como alternativa, la cantidad medida puede expresarse como una diferencia, porcentaje o relación del valor medido del analito particular con respecto a un valor medido de otro compuesto incluyendo un patrón u otro analito. La diferencia puede ser negativa, que indica una reducción de la cantidad de analito(s) medido(s). Las cantidades también pueden expresarse como una diferencia o relación del (de los) analito(s) consigo mismo(s), medidas en un punto temporal diferente. Las cantidades de analitos pueden determinarse directamente a partir de una señal generada, o la señal generada puede usarse en un algoritmo, con el algoritmo diseñado para correlacionar el valor de las señales generadas con la cantidad de analito(s) en la muestra.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas son susceptibles a su uso con dispositivos capaces de medir continuamente las concentraciones de uno o más analitos. Como se usa en el presente documento, el término "continuamente", junto con la medición de un analito, se usa para indicar que el dispositivo o bien genera o bien es capaz de generar una señal detectable en cualquier momento durante la vida útil del dispositivo. La señal detectable puede ser constante, porque el dispositivo está generando siempre una señal, incluso si no se detecta una señal. Como alternativa, el dispositivo puede usarse de forma episódica, de modo que pueda generarse una señal

detectable, y detectarse, en cualquier momento deseado.

#### V. CAPTURA DE IMÁGENES CELULARES

El pequeño tamaño de las nanopartículas activas en SERS desveladas en el presente documento permite que las nanopartículas se incorporen en células. Por ejemplo, se ha demostrado el uso de SERS para estudiar la formación de complejos de un agente quimioterapéutico con ADN (véanse Nabiev, I. R., y col., "Selective analysis of antitumor drug interactions with living cancer cells as probed by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Eur. Biophys. J.*, 19, 311-316 (1991); Morjani, H., y col., "Molecular and cellular interactions between intoplicine, DNA, and topoisomerase II studied by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy", *Cancer Res.*, 53, 4784-4790 (1993)). También se ha usado SERS para investigar el mecanismo de resistencia quimioterapéutica a ciertos cánceres (véase Breuzard, G., y col., "Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 32, 615-621 (2004)). Además, se ha usado SERS para caracterizar la distribución de productos químicos particulares dentro de células y para distinguir entre el citoplasma y el núcleo de la célula (véase Kneipp, K., y col., "Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles", *Appl. Spectrosc.*, 56(2), 150-154 (2002)).

En consecuencia, pueden usarse nanopartículas marcadas con las moléculas indicadoras para captura de imágenes celulares, por ejemplo, para distinguir entre células anómalas, por ejemplo, una célula que presenta una anomalía, tal como una célula cancerosa, frente a células normales en una muestra biológica. En tal caso, la intensidad de la señal de Raman que surge del colorante es proporcional a la densidad de células detectada. Además, las nanopartículas marcadas con las moléculas indicadoras también pueden marcarse con otras especies, tales como un miembro de unión específico de un par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, para facilitar la unión con una célula de interés. El uso de nanopartículas activas en SERS para captura de imágenes celulares se describe en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0054506 y 2006/0046313.

En consecuencia, se desvela un procedimiento de detección de la presencia de una o más estructuras diana en una célula de muestra, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una o más células de muestra con una o más nanopartículas activas en SERS marcadas con uno o más miembros de unión en condiciones adecuadas para la unión del o los miembros de unión con una o más estructuras diana en la célula de muestra, en el que la nanopartícula activa en SERS tiene asociada con la misma una molécula indicadora capaz de producir una señal de Raman distinguible; y (b) detectar una o más señales SERS distinguibles de la célula de muestra para indicar la presencia de la una o más estructuras diana en la célula de muestra.

Las nanopartículas activas en SERS desveladas en el presente documento pueden usarse para teñir microestructuras dentro de una célula. Las nanopartículas activas en SERS pueden marcarse con al menos un ligando que se une específicamente con una microestructura o receptor diana conocido. Puede usarse un conjunto de sondas de nanopartículas activas en SERS, en el que cada miembro del conjunto comprende una combinación de un ligando que se une específicamente con una diana o receptor conocido y uno o más colorantes activos en SERS que pueden producir una señal SERS distinguible tras la unión con la diana.

En condiciones adecuadas, las nanopartículas activas en SERS marcadas pueden unirse específicamente con receptores y otras microestructuras dentro de la célula. Entonces pueden capturarse imágenes de las células "teñidas", por ejemplo, usando un microscopio de Raman de barrido para determinar la presencia y localización de receptores y microestructuras específicos en las células. Además, las señales de SERS de colorantes activos en Raman individuales asociados con un ligando particular pueden usarse para distinguir entre receptores y microestructuras específicos en la célula y para crear un perfil de los receptores y microestructuras en la célula. El perfil de una célula diana ensayada según el procedimiento desvelado puede compararse con un perfil obtenido de forma similar de una célula normal del mismo tipo para determinar la presencia de una anomalía en la célula diana. La célula diana puede estar viva o muerta.

Como se usa en el presente documento, el término "microestructura" incluye moléculas de matrices extracelulares, tales como fibronectina y laminina; estructuras intracelulares, tales como filamentos de actina y microtubos y estructuras del núcleo celular, tales como histonas. Ligandos adecuados para unión con dichas microestructuras pueden seleccionarse de los ligandos desvelados en el presente documento, e incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos antifibronectina y anticuerpos antiactina, y otros ligandos que existen de forma natural, tales como proteína anti-histona.

Pueden obtenerse imágenes de células que contienen información espectral de Raman por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede acoplarse un microscopio con una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD) de modo que puedan obtenerse imágenes completas de la muestra. Normalmente, en tales realizaciones, puede insertarse un dispositivo de filtrado del número de ondas (o longitud de onda), tal como un monocromador o filtro ajustable de cristal líquido, entre la muestra y la cámara CCD. El dispositivo de filtrado permite que solamente un ancho de banda estrecho de radiación dispersa alcance la cámara CCD en cualquier momento. Pueden recogerse imágenes múltiples por la cámara CCD, en el que cada imagen cubre un intervalo espectral particular de la radiación dispersa. Los espectros de cada punto en la imagen pueden ensamblarse en software. Como alternativa, puede dispersarse luz de un único punto de una imagen a través de un

monocromador y el espectro completo de ese punto puede adquirirse en un detector de matriz. La muestra puede explorarse de modo que cada punto en la imagen se adquiera por separado. Entonces se ensambla la imagen de Raman en software. En otro enfoque, puede construirse un instrumento de exploración lineal que excite la muestra con una línea de radiación. Se capturan imágenes de la línea espacialmente a lo largo de un eje de una cámara CCD mientras que simultáneamente se dispersa espectralmente a lo largo del eje ortogonal. Cada lectura de la cámara adquiere el espectro completo de cada píxel espacial en la línea.

Para completar la imagen la línea se explora en toda la muestra. Se describe un ejemplo de un instrumento de Raman adecuado para captura de imágenes en Talley, y col., "Nanoparticle Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", NATO Advanced Study Institute: Biophotonics, Ottawa, Canadá (6 de enero de 2005). Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden incorporarse en una célula o tejido por un mecanismo de captación pasiva. Otro mecanismo para incorporar nanopartículas en células es mediante el uso de péptidos pequeños, que pueden unirse con receptores endocíticos en la superficie celular e introducir las nanopartículas en la célula a través de endocitosis (véase Tkachenko. A. G., y col., "Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains", *Bioconjugate Chem.*, 15, 482-490 (2004). Además, las nanopartículas activas en SERS pueden introducirse en células mediante microinyección, transfección, electroporación y enfoques mediados por endocitosis, incluyendo el uso de péptidos antipáticos, tales como PEP-1, el uso de reactivos basados en lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, Estados Unidos de América), y el uso de micelas y reactivos de transfección tales como transferrina, manosa, galactosa y Arg-Gly-Asp (RGD), y otros reactivos tales como el reactivo basado en dendrímeros SUPERFECT™ (Qiagen, Inc., Valencia, California, Estados Unidos de América). De forma intracelular, pueden usarse procedimientos indirectos para mostrar que las partículas están unidas con las dianas deseadas. Un procedimiento adecuado para demostrar la especificidad de las sondas es inmunofluorescencia, que puede usarse para verificar la localización de las nanopartículas activas en SERS. Varias sondas fluorescentes disponibles en el mercado son útiles para marcar estructuras celulares (tales como las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico) en células vivas. Conjugando un anticuerpo que se dirige a la misma estructura, puede determinarse la fracción de nanopartículas que marca de forma activa su diana. De forma similar, también puede determinarse qué porcentaje de nanopartículas se unen de forma no específica. Otro enfoque para verificar la localización de las nanopartículas activas en SERS es usar fusiones de proteínas fluorescentes, tales como GFP y sus análogos.

Se proporcionan agentes de captura de imágenes que comprenden las nanopartículas activas en SERS desveladas para su uso en diagnóstico médico. Los agentes de captura de imágenes desvelados en el presente documento son útiles para capturar imágenes de un paciente en general, y/o específicamente diagnosticar la presencia del tejido enfermo en un paciente. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, seleccionando el tamaño, forma y composición del núcleo de la nanopartícula; la identidad del colorante; y la composición y espesor del encapsulante, si se desea, pueden ajustarse las frecuencias de excitación y emisión óptimas de las nanopartículas activas en SERS para que estén entre 630 nm y 1000 nm, es decir, la región mínima para absorción y dispersión por tejidos.

Puede llevarse a cabo un procedimiento de captura de imágenes administrando un agente de captura de imágenes que comprende una o más nanopartículas activas en SERS desveladas a una célula, una muestra tisular o a un sujeto, tal como un paciente, y después explorando la célula, muestra tisular o sujeto usando cualquier sistema conocido en la técnica que pueda realizar captura de imágenes espectral, incluyendo microscopios confocales de exploración puntual, sistemas de exploración lineal y sistemas tomográficos de coherencia óptica. La presencia de las nanopartículas activas en SERS desveladas en una célula, muestra tisular o sujeto también puede observarse por cualquier sistema de captura de imágenes que detecte más de una única banda de longitud de onda, así como cualquier sistema de captura de imágenes de fluorescencia que incluya una fuente de luz de excitación y detección de imagen filtrada. Se describen otros sistemas de captura de imágenes adecuados para su uso con las nanopartículas activas en SERS desveladas en Tuchin, V. V., *Handbook of optical biomedical diagnostics*, Bellingham, Wash., EE.UU.: SPIE Press, 2002. Otros procedimientos de captura de imágenes, incluyendo procedimientos de dominio temporal, tales como espectroscopia y tomografía de dispersión de luz dinámica, captura de imágenes de tiempo de vuelo, espectroscopia de dispersión de la luz casi elástica, espectroscopia de correlación fotónica, espectroscopía de Doppler y espectroscopia de ondas de difusión son adecuados para su uso con el objeto desvelado. Todas estas técnicas permiten diferenciar entre fotones y dónde han estado basándose en sus identificaciones temporales. Debido a que las nanopartículas activas en SERS pueden tener diferentes identificaciones temporales que las sustancias fluorescentes, pueden diferenciarse frente a tejidos y otros marcadores con estos procedimientos. Parámetros de instrumentos útiles también incluyen una fuente de luz modulada y detector sensible al tiempo. La modulación puede ser por pulsos o continua.

La exploración de la célula, muestra tisular o sujeto proporciona espectros o imágenes de una región interna de la célula, muestra tisular o sujeto, y puede usarse para detectar o diagnosticar la presencia de una afección o una patología. Por región de una célula, muestra tisular o sujeto, se entiende la célula completa, muestra tisular o sujeto, o un área o parte particular de la célula, muestra tisular o sujeto. Cuando el sujeto es un paciente, los agentes de captura de imágenes desvelados pueden usarse para proporcionar imágenes de órganos internos del paciente, incluyendo vasculatura, corazón, hígado y bazo, y en la captura de imágenes de la región gastrointestinal u otras cavidades corporales, o de otra manera como resultará rápidamente evidente para los expertos en la materia, tal como en caracterización tisular y captura de imágenes de acumulación de sangre.

También se desvela un procedimiento de diagnóstico de la patología anómala *in vivo*, incluyendo el procedimiento introducir una pluralidad de nanopartículas activas en SERS dirigidas a una molécula implicada en la patología anómala en un fluido corporal poniendo en contacto la patología anómala, en el que las nanopartículas activas en SERS pueden asociarse con la molécula implicada en la patología anómala y captura de imágenes de las nanopartículas activas en SERS asociadas *in vivo*. El procedimiento desvelado es aplicable en general a cualquier órgano accesible por las sondas de nanopartículas activas en SERS, incluyendo el tracto gastrointestinal, corazón, pulmón, hígado, cuello uterino y mama. Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden introducirse en un sujeto mediante un endoscopio, como en el caso de una colonoscopia, o una aguja, o usarse con una punta desechable o manguito, o mediante endocitosis, transfección y microinyección. Las sondas de nanopartículas activas en SERS pueden introducirse directamente introduciendo la sonda de captura de imágenes en sí misma. Pueden introducirse fibras ópticas individuales, o haces de fibras ópticas, en organismos vivos para captura de imágenes. Tales procedimientos se han demostrado para captura de imágenes de nervios, cerebro, microvasos, células, así como para caracterizar la biodistribución. Se conocen bien fibras ópticas revestidas con gel en la bibliografía de sensores. Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden estar unidas de forma no covalente con el gel, en el que las nanopartículas pueden difundir en el tejido tras la introducción en el tejido. Una variedad de otros procedimientos para inmovilizar nanopartículas activas en SERS en la superficie externa de fibras de modo que puedan difundir a fases líquidas con las que están en contacto también son adecuados para su uso con el objeto desvelado.

Se desvela un procedimiento de marcado de un animal con una nanopartícula activa en SERS, comprendiendo el procedimiento introducir una nanopartícula activa en SERS en el animal. Las nanopartículas activas en SERS desveladas pueden introducirse en un animal por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo cualquier procedimiento de implantación subcutánea o por vía intravenosa. La nanopartícula activa en SERS puede detectarse usando instrumentación apropiada. Se desvela un sistema de identificación para animales, incluyendo ganado y mascotas domesticadas, en el que la nanopartícula activa en SERS se implanta bajo la piel (o pellejo) del animal para permitir la identificación.

### **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar directrices para un experto en la materia para practicar realizaciones representativas del objeto desvelado. Los ejemplos que ya no están cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

#### **Ejemplo 1**

Ensayo de SERS de captura magnética con marcadores de referencia

Se compraron biomarcadores Nanoplex™ de Oxonica Inc. (Mountain View, California). Las partículas fueron partículas de oro que tenían un diámetro de 50 nm y marcadas con indicador de Raman seleccionado de trans-1,2-bis(4-piridil)-etileno (BPE) o 4,4-dipiridilo (DPY) y encapsuladas con vidrio como se describe en el presente documento. El encapsulante de vidrio estaba biotinilado. Se obtuvieron partículas magnéticas (aproximadamente 1 µm de diámetro) de Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, Indiana) y se marcaron con estreptavidina. Se mezclaron dos soluciones de nanopartículas marcadas con BPE y DPY biotiniladas cada una con las partículas magnéticas revestidas con estreptavidina. Estas dos soluciones se mezclaron entonces entre sí juntas en una relación de 7:3 y se aplicó un campo magnético usando un sistema del tipo ilustrado en la Figura 4, formando de este modo un sedimento en el fondo del tubo de ensayo. El sedimento se rompió y volvió a formar repetidas veces, y se midió la señal de Raman para cada configuración de sedimento, donde la señal de Raman del indicador BPE y DPY se midió simultáneamente. En los espectros de Raman registrados el pico a 1590 cm<sup>-1</sup> corresponde con el indicador de Raman BPE y el pico a 1180 cm<sup>-1</sup> se corresponde con el indicador DPY.

La señal del indicador BPE solo proporciona una medida de la repetibilidad de la señal cuando no se usan referencias. Usando el indicador DPY como referencia, se calcula la relación del indicador BPE y DPY. La Figura 3 muestra una comparación de la señal sin referencia y con referencia. El coeficiente de variación para cinco rondas de sedimentación y rotura es del 8,4 % para la señal sin referencia y 3,8 % para la señal con referencia. Por lo tanto, la reducción en la variación de señal se reduce el 55 %, cuando se usa un segundo indicador como una referencia.

#### **Ejemplo 2**

Ensayo de SERS de captura magnética con reactivo de lisis

Se marcaron nanopartículas Nanoplex™ de Oxonica con grupos tiol de superficie con anticuerpos policlonales anti-cTnI humana de cabra (BiosPacific, Emeryville, CA) usando Sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato). Por separado, se marcaron partículas magnéticas (perlas magnéticas terminadas con carboxilo BcMag® de 1 µm de Bioclone) con anticuerpos monoclonales anti-cTnI humano (BiosPacific, Emeryville, California) usando clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilamino-propil]carbodiimida (EDC). Se creó una mezcla maestra de nanopartículas marcadas con anticuerpo y partículas magnéticas, que produjeron que cada ensayo de 162 µl contuviera 5,1 x 10<sup>9</sup> nanopartículas y 15 µg de partículas magnéticas. Se preparó también una solución de reactivo de lisado, que contenía HEPES 10 mM, β-glicerofosfato 50 mM, NaCl 70 mM, EDTA 2 mM, 1 %

de Tritón X100 y mezcla de inhibidores de proteasa IX Sigma P2714.

Para probar el impacto del reactivo de lisado en el rendimiento del ensayo, se prepararon muestras que consistían en tampón diluido de PBS, plasma o sangre. Las muestras se dividieron en cuatro grupos. En el primer grupo, se añadió reactivo de lisado a cada uno de los tres medios (tampón, plasma y sangre) y después de aproximadamente 10 minutos, las muestras se enriquecieron con troponina I cardíaca, previamente disuelta en tampón, hasta una concentración final de 100 ng/ml. En el segundo grupo de muestras, se añadió de nuevo reactivo de lisado, pero, en su lugar, se añadió tampón sin troponina I para constituir las muestras a 0 ng/ml. El tercer y cuarto grupo consistieron en muestras de control sin reactivo de lisado, que contenían 0 o 1 ng/ml de troponina I. Para cada muestra, se añadieron 100 µl de la muestra a 62 µl de la solución de mezcla madre y se incubaron durante 30 minutos (rotación lenta, temperatura ambiente). La concentración final del fluido biológico fue del 21 % en las muestras de plasma y sangre. Las reacciones se detuvieron formando un sedimento magnético, y se leyó la señal de SERS en cada tubo en un instrumento adaptado. La Figura 6 muestra los niveles de señal de SERS con y sin el reactivo de lisado para 0 y 100 ng/ml de troponina I cardíaca. Las barras de error en la gráfica indican ± desviación típica de tres repeticiones.

**Ejemplo 3**

Formación de sedimentos por rotación del tubo de ensayo

Se usaron partículas magnéticas de Bangs Laboratories (aproximadamente 1 µm de diámetro) dispersadas en agua para formar un sedimento denso de la siguiente manera. Se monta un imán (por ejemplo, una barra) debajo de un tubo de ensayo, en el que el centro del imán se sitúa fuera del centro con respecto al eje del tubo de ensayo (véase la Figura 5). Después de algunos segundos, el imán indujo la formación de un sedimento en el fondo del tubo de ensayo. El tubo de ensayo se giró alrededor de su eje central, modulando de este modo el campo magnético experimentado por el sedimento de tal manera que el sedimento se hiciera más denso. El esquema en la Figura 5 muestra el proceso de formación del sedimento girando el tubo de ensayo sobre un imán montado fuera del centro.

Después de haber colocado el imán debajo del tubo de ensayo, las partículas se capturan por el imán en unos segundos. El sedimento formado puede ser de forma irregular y puede asemejarse a la sección transversal de un toroide. Después de girar el tubo de ensayo alrededor de su propio eje, el sedimento se hace más denso. Después de algunas vueltas más, la forma del sedimento ya no cambia. El sedimento resultante es más denso y más pequeño que el sedimento formado sin la rotación del tubo de ensayo.

**Ejemplo 4**

Espectros de referencia de Raman mejorados

Se realizó un experimento múltiple en el que se mezclaron entre sí cinco nanopartículas activas en SERS diferentes, es decir, nanopartículas activas en SERS que tenían diferentes colorantes de Raman, también denominados en el presente documento "marcadores", en proporciones variables. Se usó una técnica de unión de biotina-avidina para unir las nanopartículas con perlas magnéticas (aproximadamente 1 µm de diámetro). Se formaron sedimentos como se ha descrito en el Ejemplo 3 inmediatamente antes en el presente documento. Se analizaron los espectros de las mezclas sedimentadas usando dos conjuntos de espectros de referencia: las nanopartículas en solución y las nanopartículas en sedimentos de perlas magnéticas. Se construyeron curvas de calibración usando los pesos de ajuste para los sedimentos que contenían cada nanopartícula activa en SERS sola. Después se estimaron las concentraciones de nanopartículas activas en SERS para cada mezcla. Las concentraciones de nanopartículas activas en SERS variaron de 1,25E7/ml a 2,5E8 partículas/ml. Aún cuando los espectros de referencia en solución y en sedimentos pueden ser difíciles de distinguir visualmente (véase la Figura 12), las diferencias pueden ser importantes para la estimación precisa de concentraciones bajas en un sistema múltiple. Mejoraron la exactitud y precisión para las estimaciones de concentración de cero y concentraciones bajas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1										
Marcador	Error promedio					Desviación estándar de errores				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Referencias de solución										
0	1,50	0,23	0,28	0,32	0,05	1,46	2,67	0,39	0,56	0,32
1,25E+07	0,93	0,10	0,14	0,48	0,07	1,41	0,50	0,43	0,72	0,37
2,50E+08	0,53	2,81	-1,49	6,07	-1,16	4,92	6,40	5,63	6,86	5,67

(continuación)

Tabla 1										
		Error promedio				Desviación estándar de errores				
Referencias de sedimento										
0	0,24	0,30	0,17	-0,22	0,03	0,22	2,60	0,14	0,47	0,22
1,25E+07	0,07	0,16	0,06	0,14	0,02	0,29	0,38	0,28	0,54	0,36
2,50E+08	-1,57	2,99	-1,63	5,01	-1,20	4,29	6,37	5,61	6,47	5,55

5 También se representan las estimaciones de concentraciones para el marcador 1 en la Figura 13. Aunque la descripción anterior de esta técnica de referencia se basa en señales generadas por nanopartículas activas en SERS acopladas con partículas magnéticas y extraídas en un sedimento para análisis de Raman, el concepto es aplicable a cualquier situación en la que se configuren marcadores en una configuración particular durante una detección que difiere de una configuración más temprana que podría usarse como una referencia. Como se muestra en la Figura 11, puede asignarse erróneamente una señal aleatoria a variables de entrada debido al alineamiento engañoso de las características. Se ajustó el ruido aleatorio de distribución normal con una desviación típica de 10.000 usando una rutina de mínimos cuadrados. La señal de entrada **1100** se muestra en la Figura 11A. El espectro ajustado **1100** refleja errores debido al ruido aleatorio en la señal de entrada **1100**. En este caso particular, se asignó al marcador 4 un peso de 0,5 para equilibrar los pesos negativos de otros marcadores. Se muestra un espectro ajustado **1120** para el marcador 4 en la Figura 11B.

15 Se muestran espectros de referencia representativos en la Figura 12. Con referencia a la Figura 12A, el espectro **1200** representa un espectro de SERS del marcador 1 en solución, mientras que el espectro **1210** representa un espectro de SERS del marcador 5 en solución. Con referencia ahora a la Figura 12B, el espectro **1220** representa un espectro de SERS del marcador 1 en un sedimento, mientras que el espectro **1230** representa un espectro de SERS del marcador 5 en un sedimento.

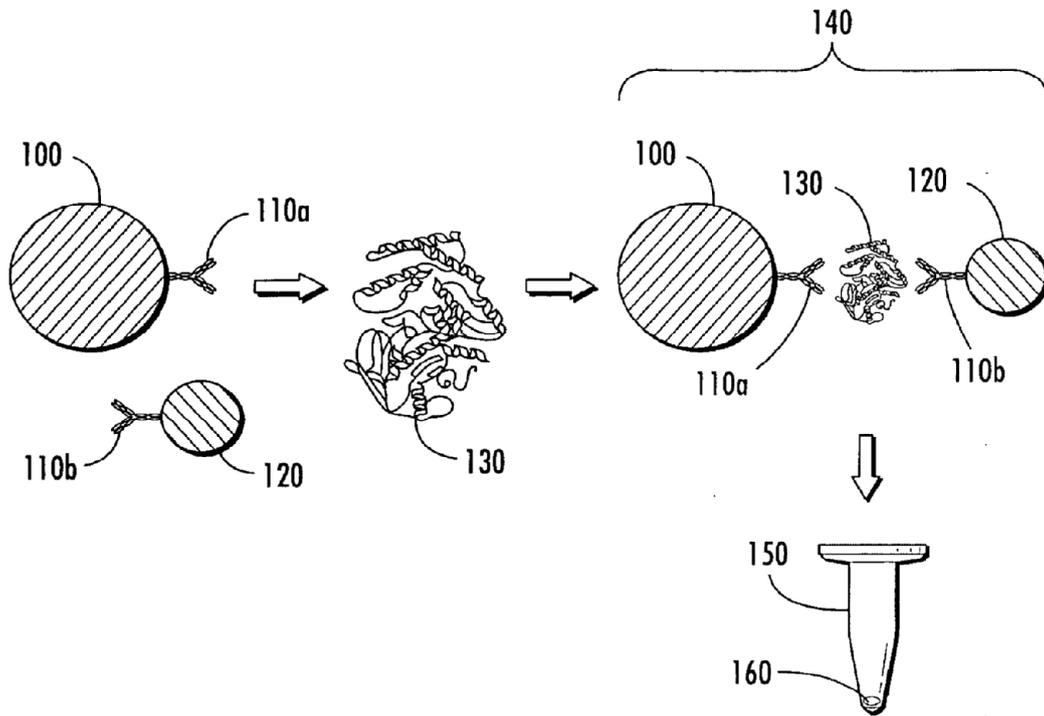
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de calibrado de un ensayo para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

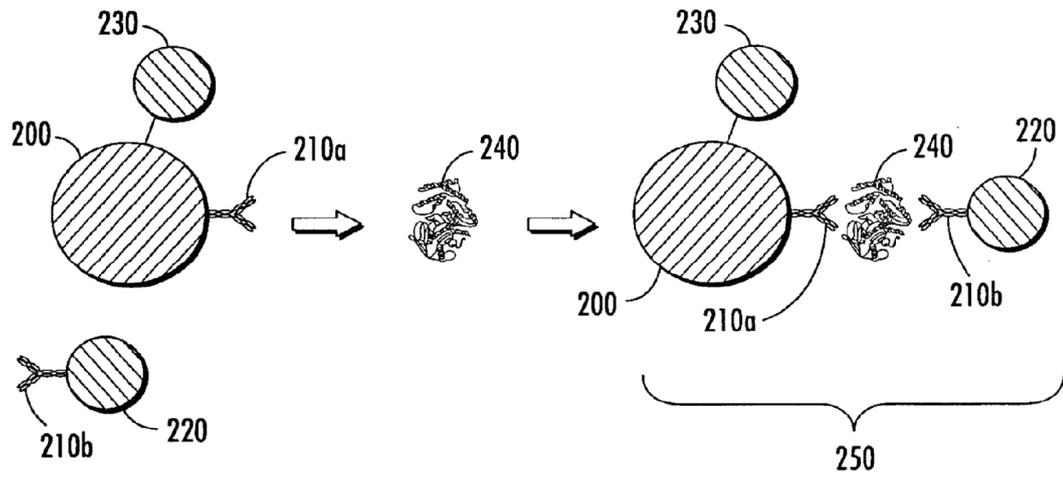
(a) proporcionar:

- 5 (i) una o más partículas magnéticas (200) capaces de ser situadas en un área localizada de un recipiente de ensayo;
- (ii) una primera nanopartícula activa en SERS (220) que tiene asociada con ella al menos un miembro de unión específico (210b) que tiene afinidad por uno o más analitos de interés (240) en la muestra biológica y capaz de producir una primera señal detectable, en el que la primera señal detectable depende de una cantidad del uno o más analitos (240) en la muestra biológica; y
- 10 (iii) una segunda nanopartícula activa en SERS (230) que está unida con dicha una o más partículas magnéticas (200) y que tiene asociada con ella al menos un miembro de unión específico (210a) que tiene afinidad por uno o más analitos de interés (240) en la muestra biológica y capaz de producir una segunda señal detectable, en el que la segunda señal detectable depende de una cantidad y una posición de la una o más partículas magnéticas (200) y es sustancialmente independiente de la cantidad del uno o más analitos
- 15 (240) en la muestra biológica; y

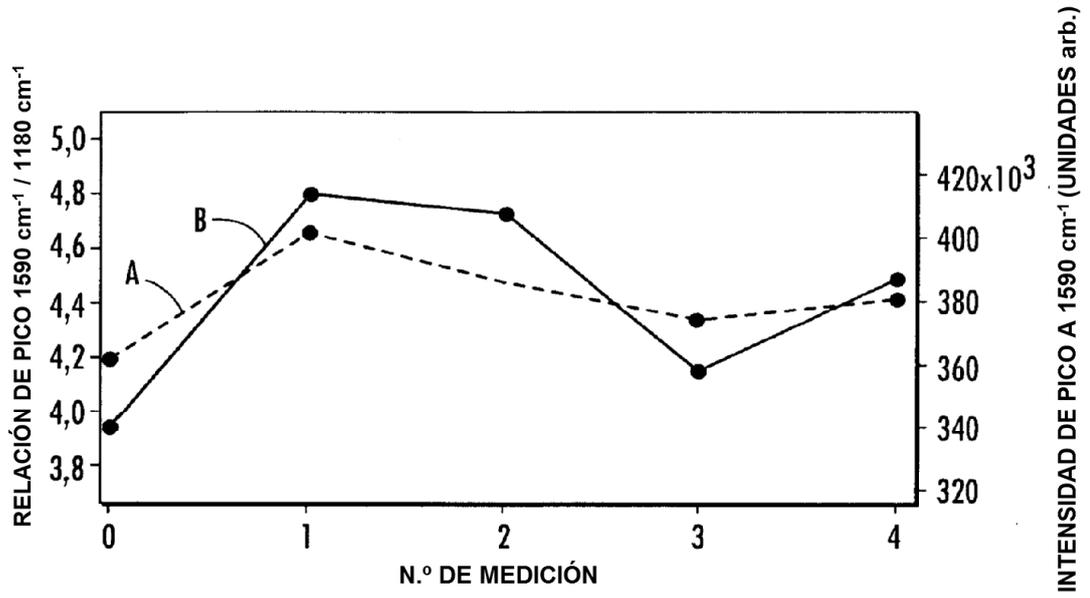
(b) comparar la primera señal detectable con la segunda señal detectable para calibrar el ensayo para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos en la muestra biológica.



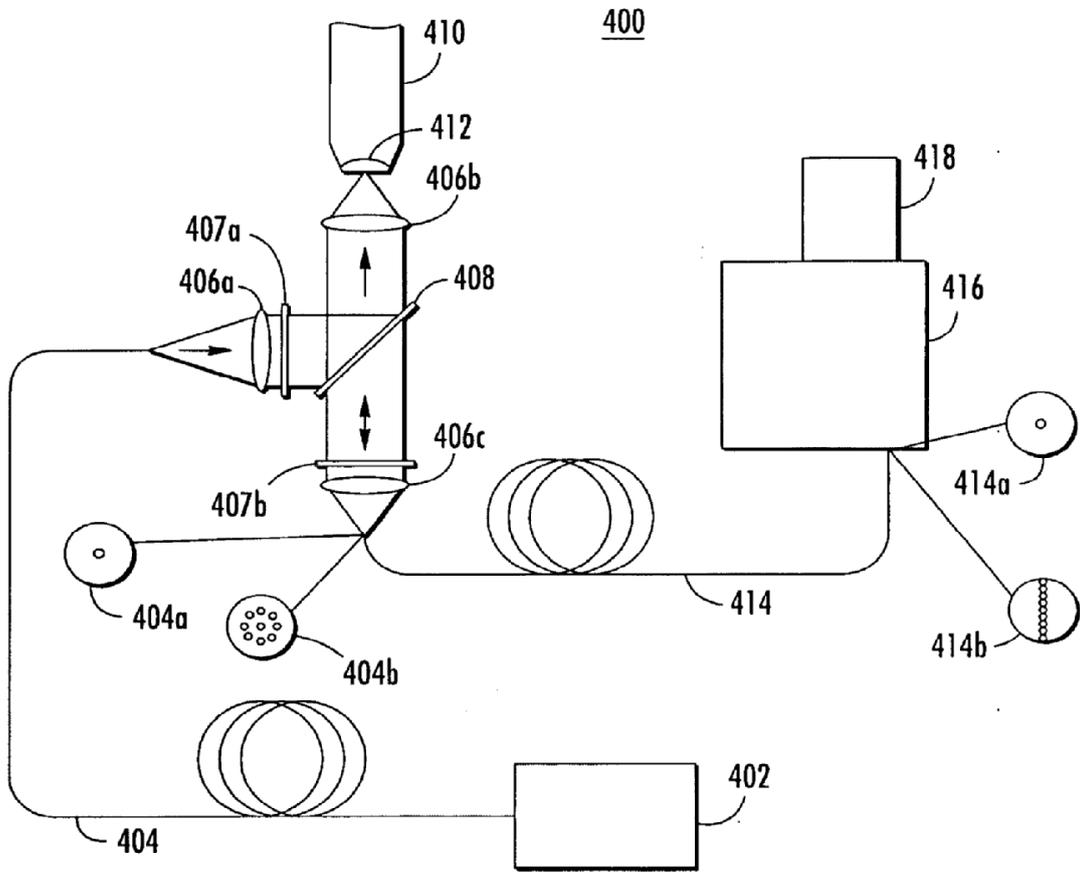
***FIG. 1***



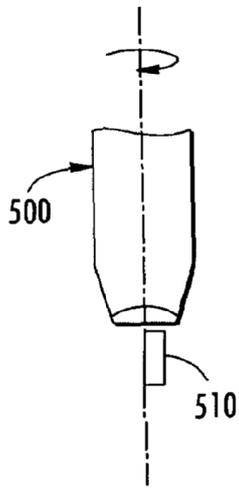
**FIG. 2**



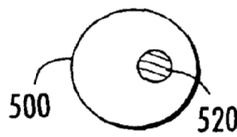
**FIG. 3**



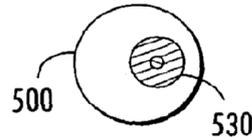
**FIG. 4**



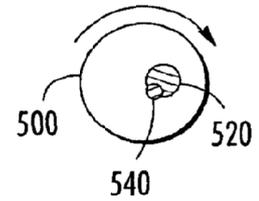
**FIG. 5A**



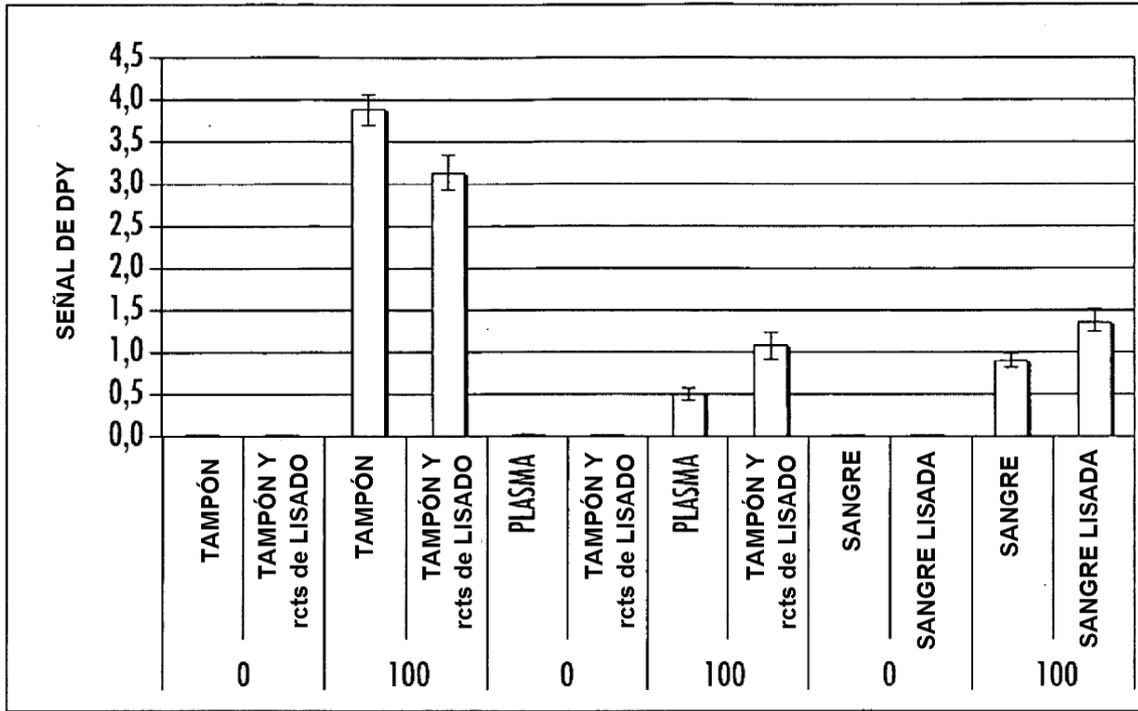
**FIG. 5B**



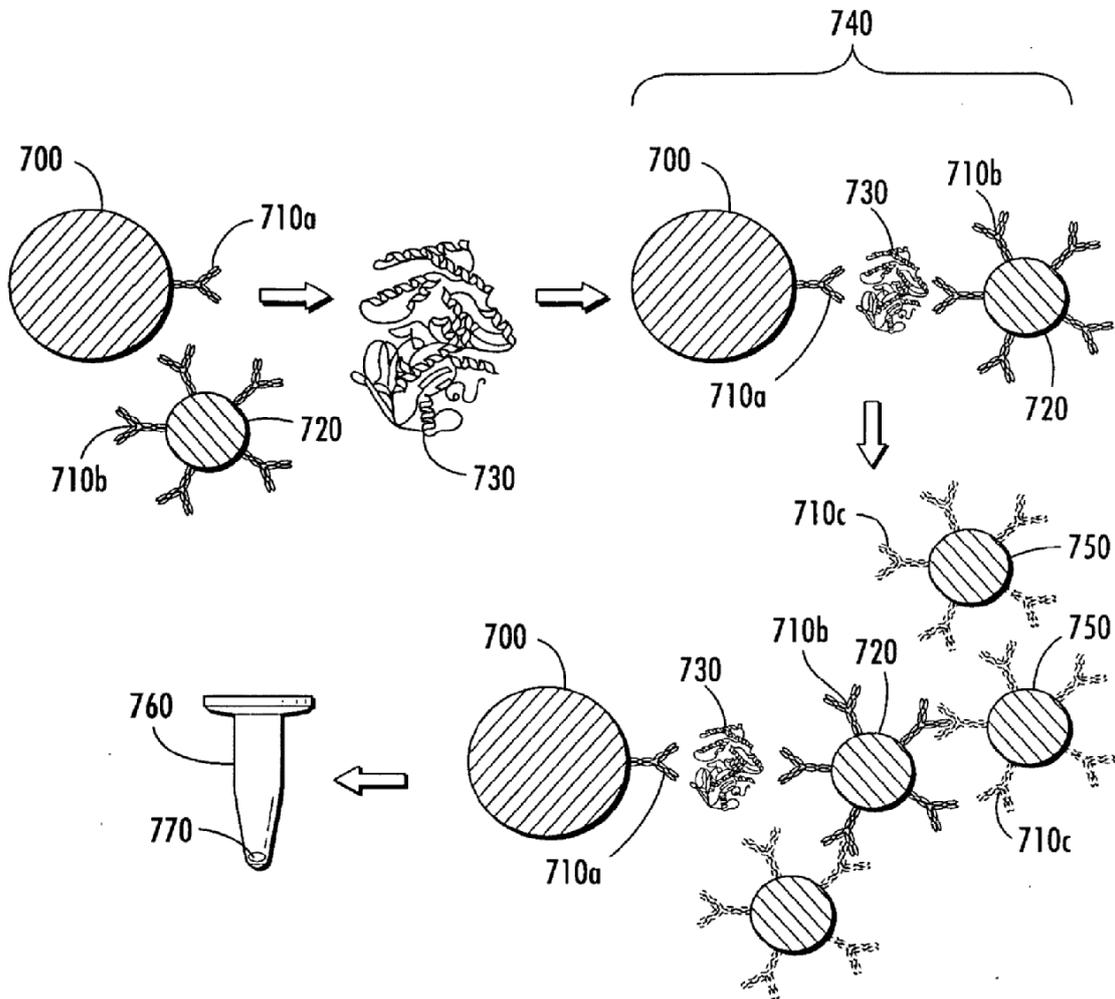
**FIG. 5C**



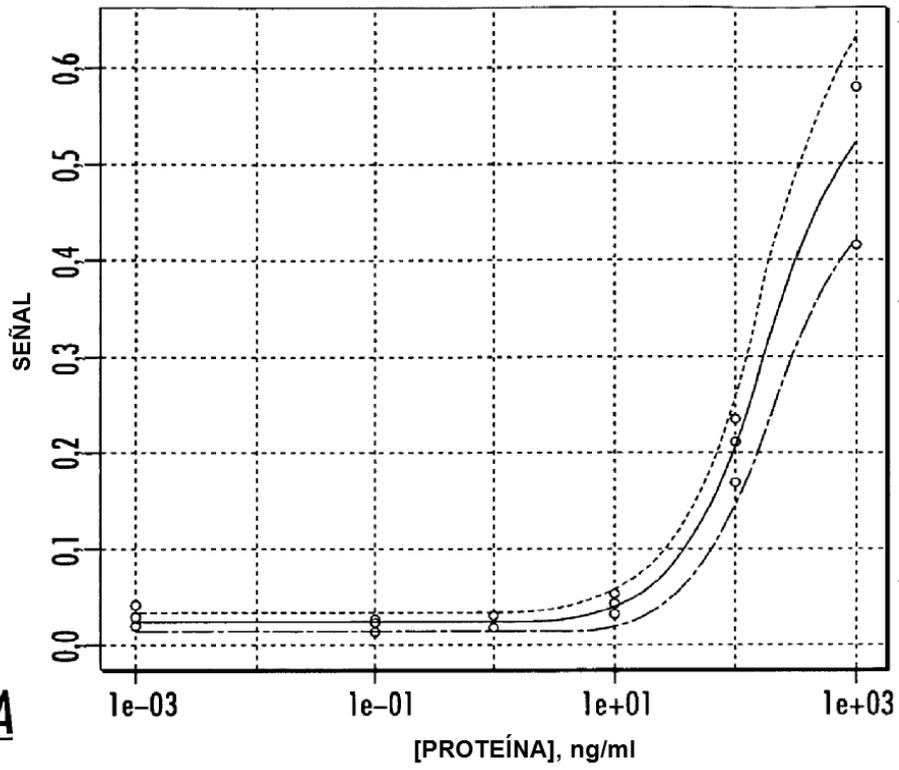
**FIG. 5D**



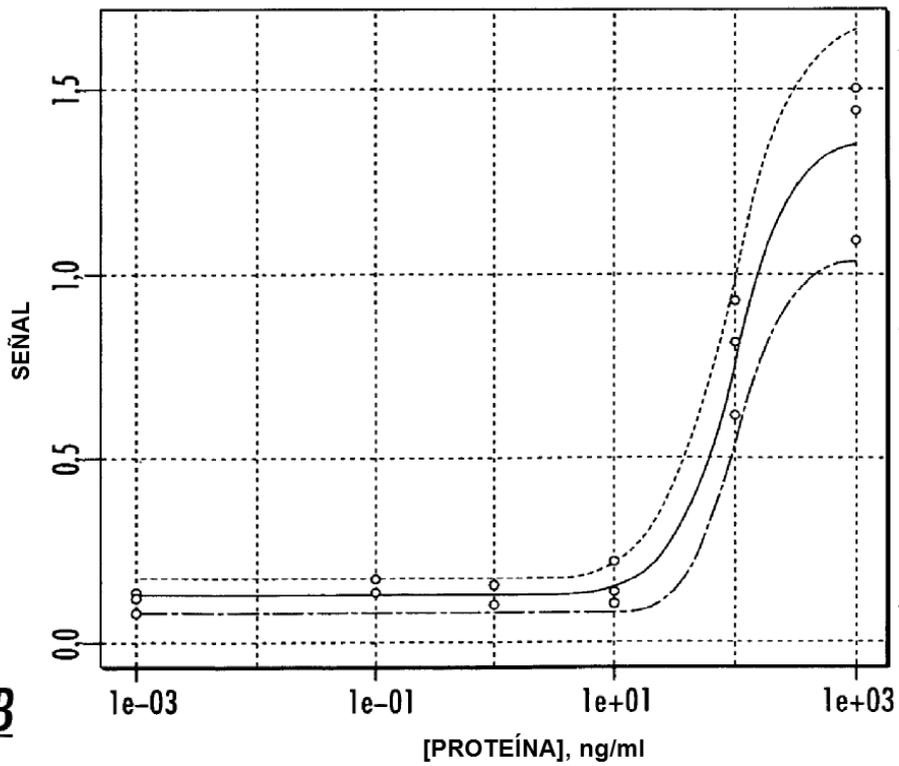
**FIG. 6**



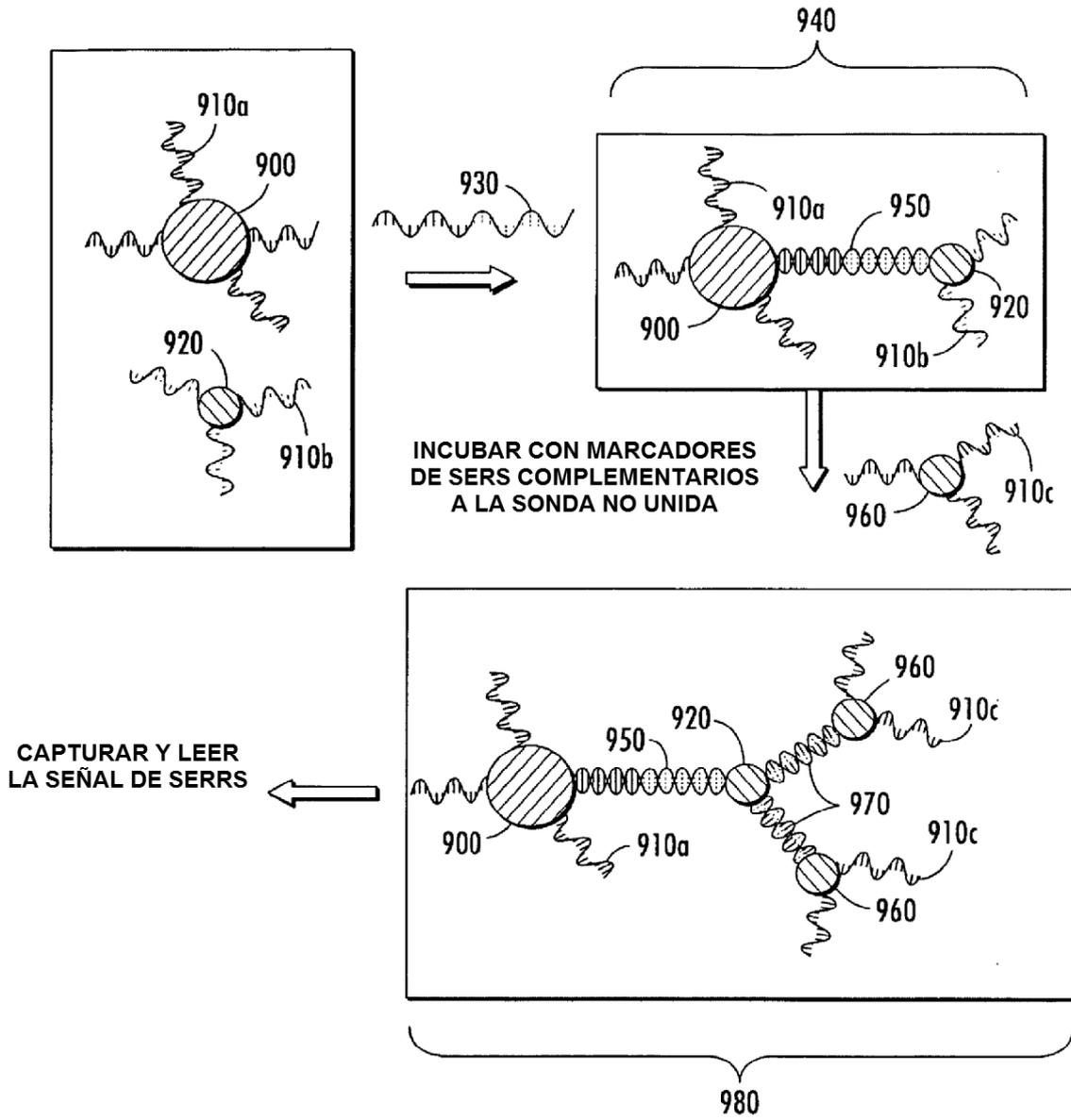
**FIG. 7**



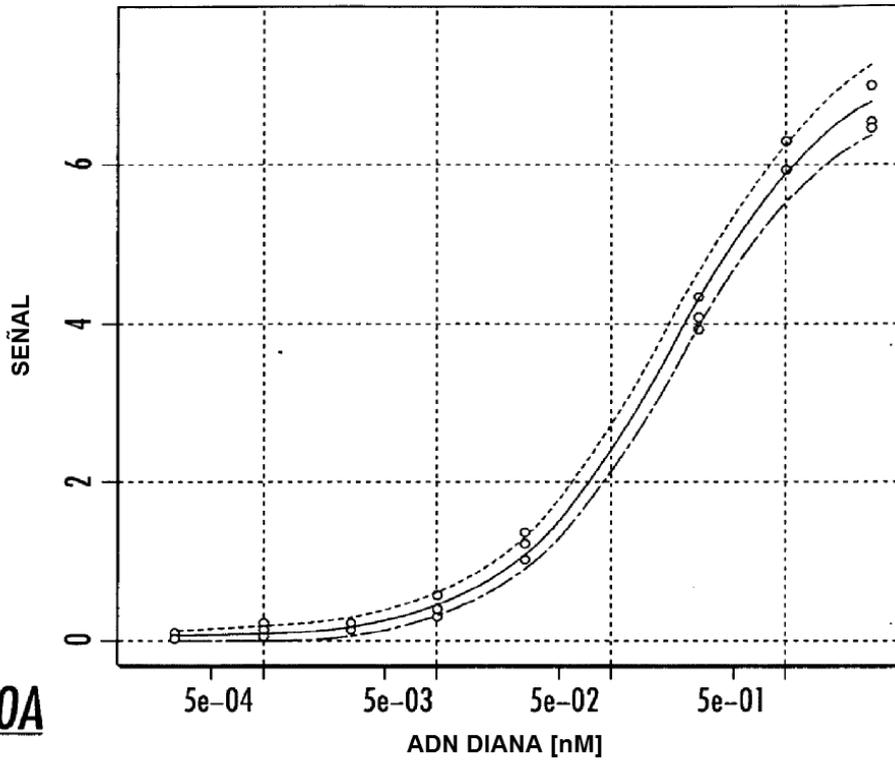
**FIG. 8A**



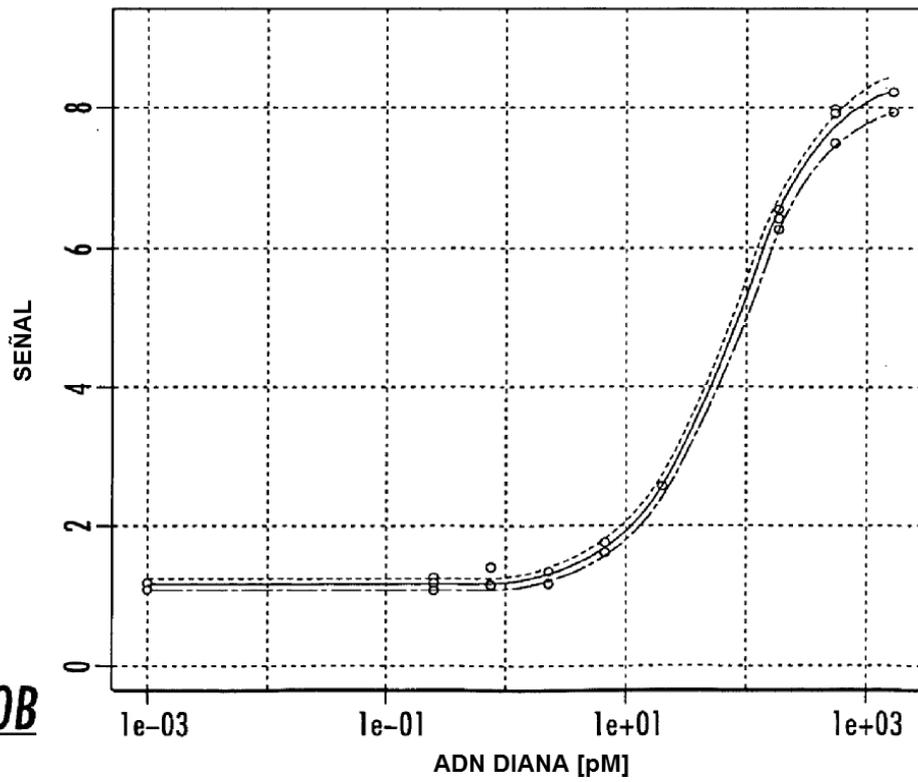
**FIG. 8B**



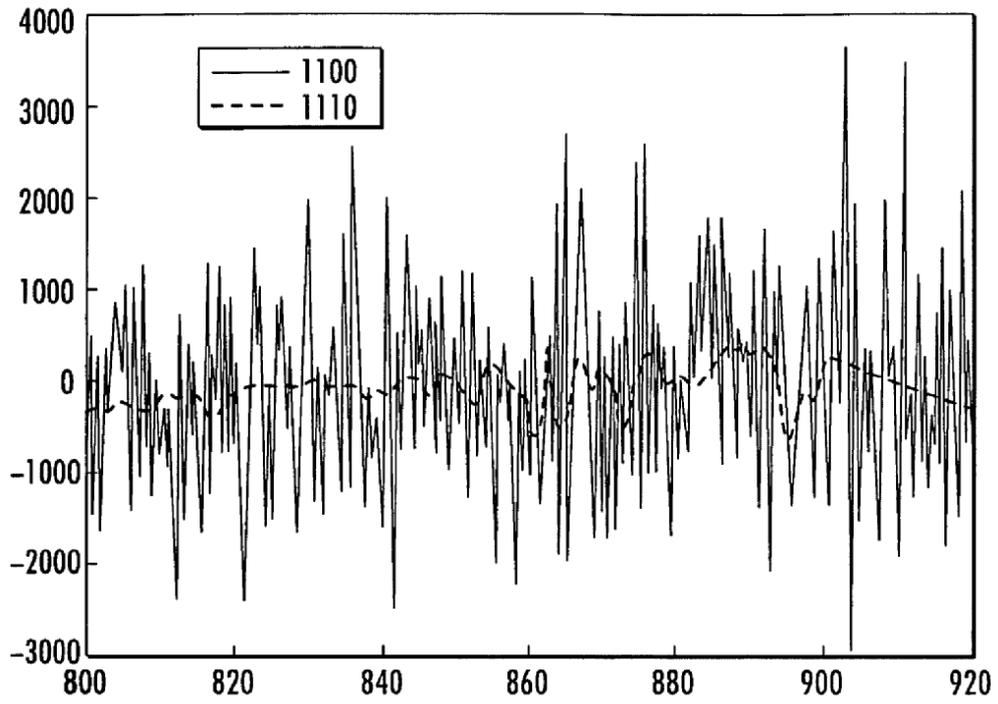
**FIG. 9**



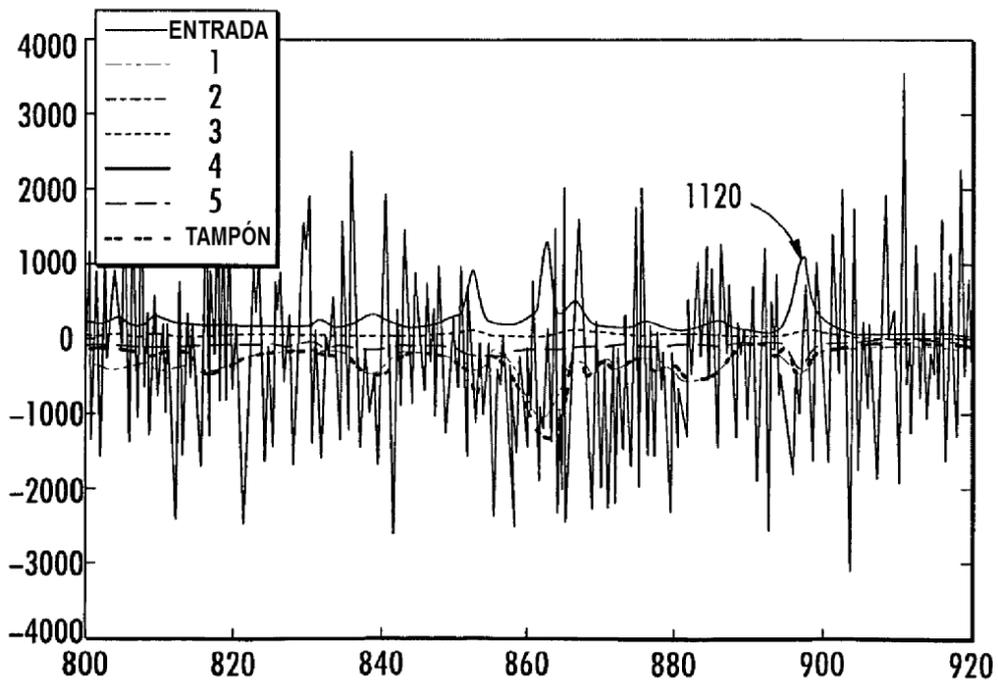
**FIG. 10A**



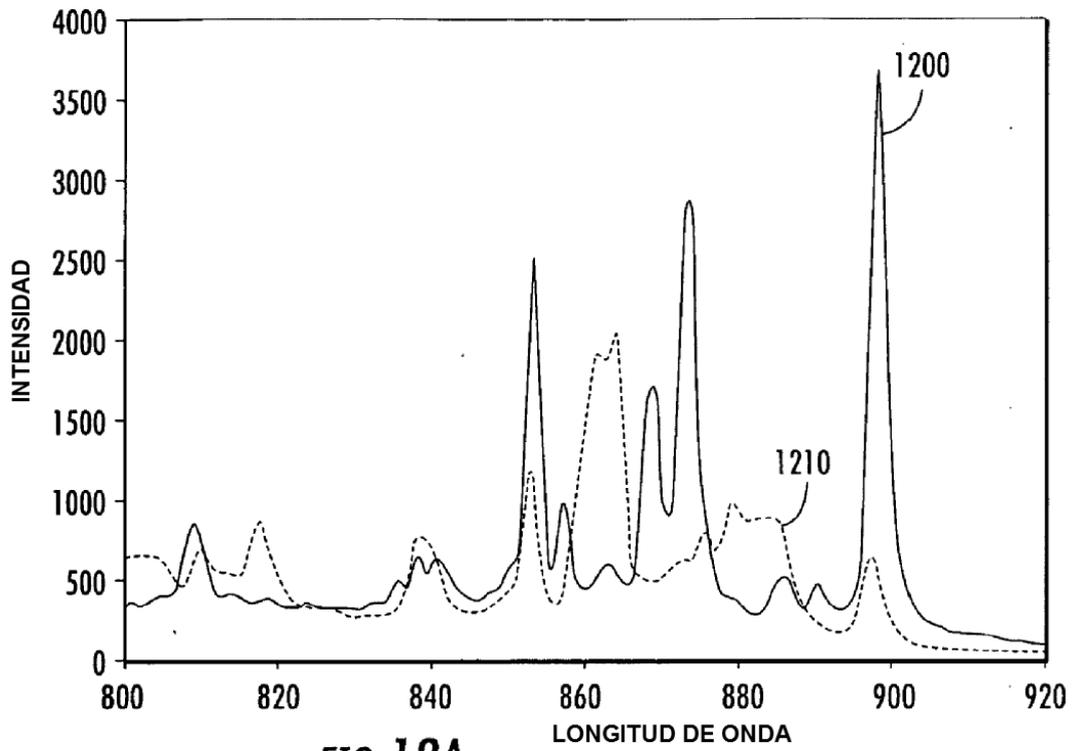
**FIG. 10B**



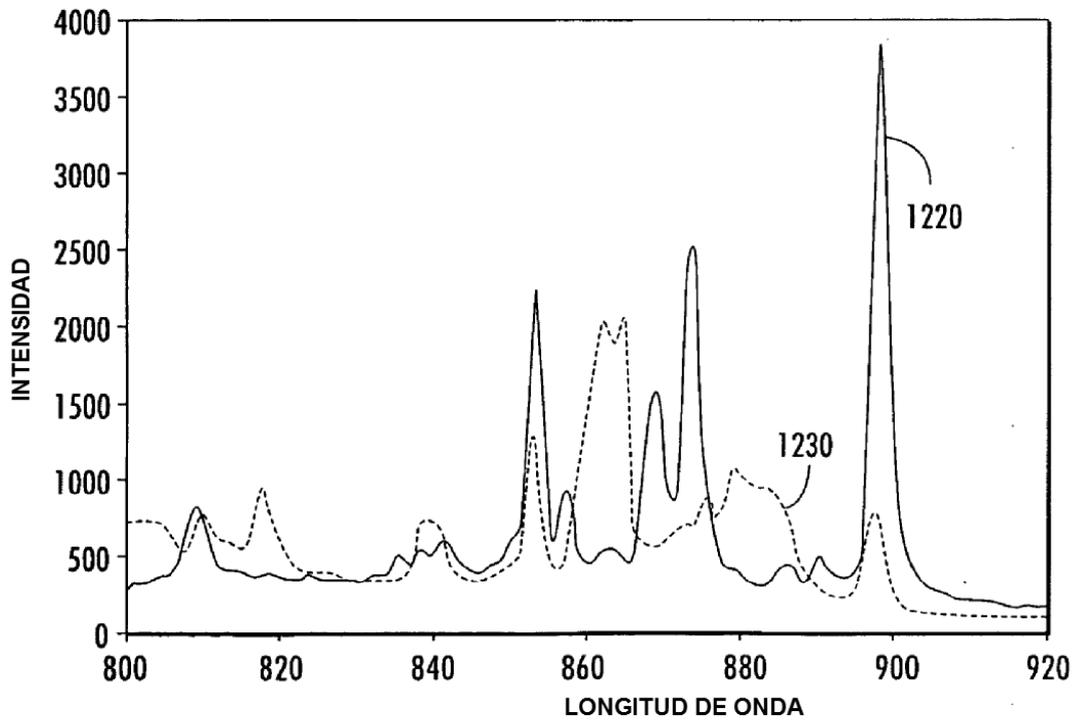
**FIG. 11A**



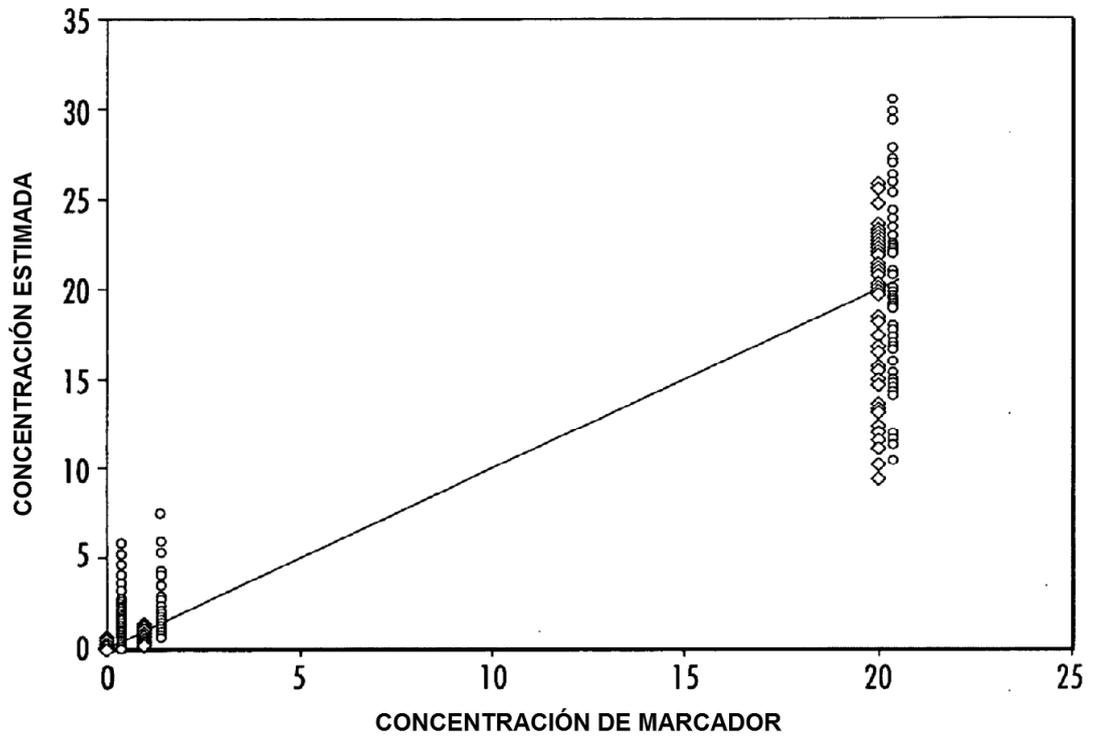
**FIG. 11B**



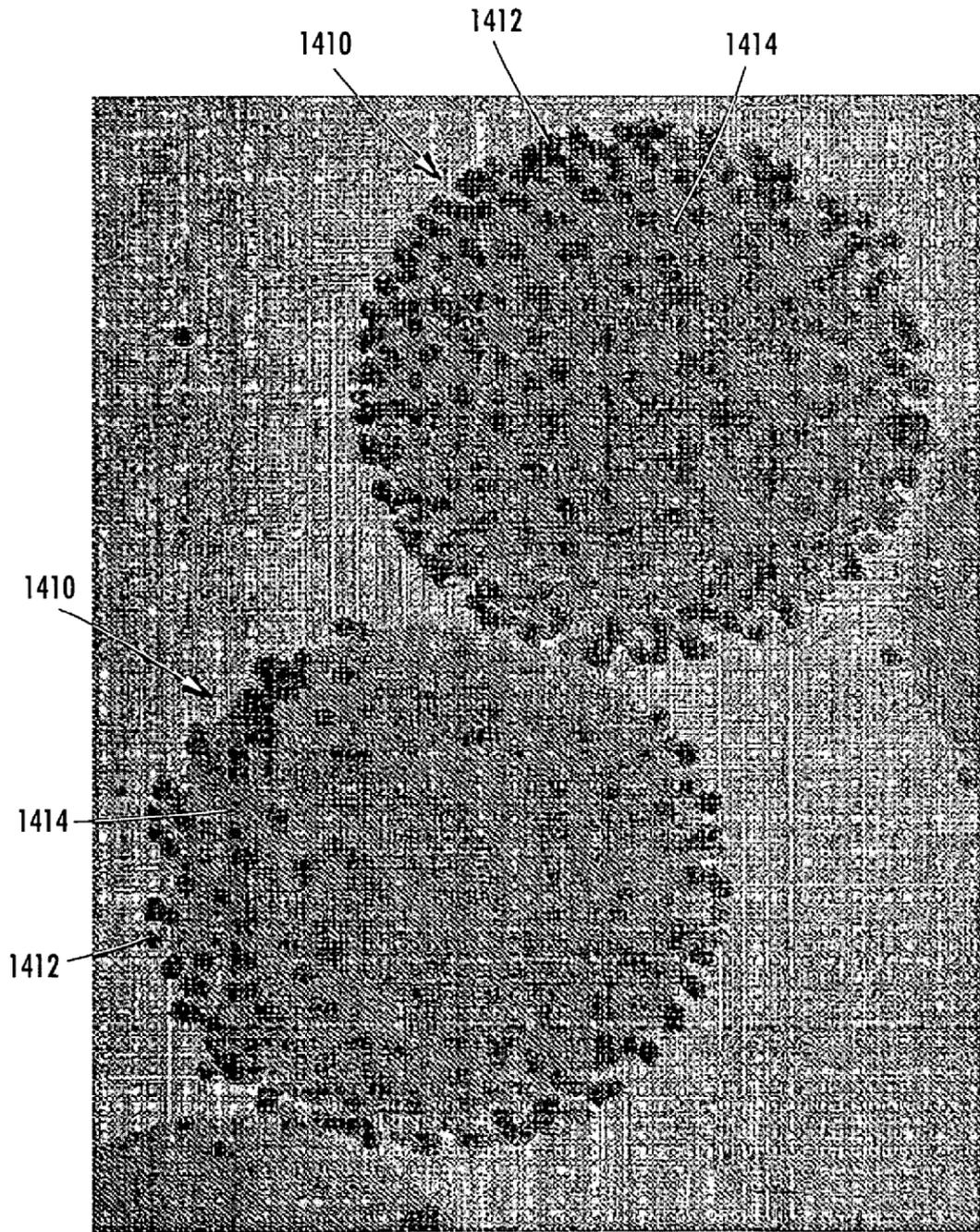
**FIG. 12A**



**FIG. 12B**

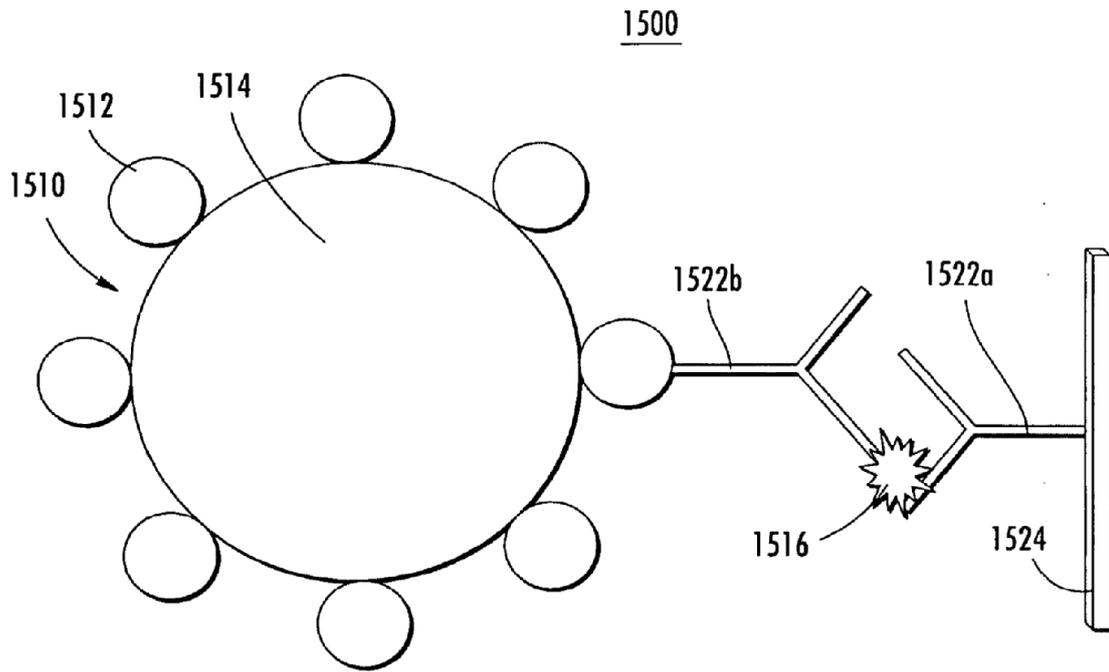


***FIG. 13***

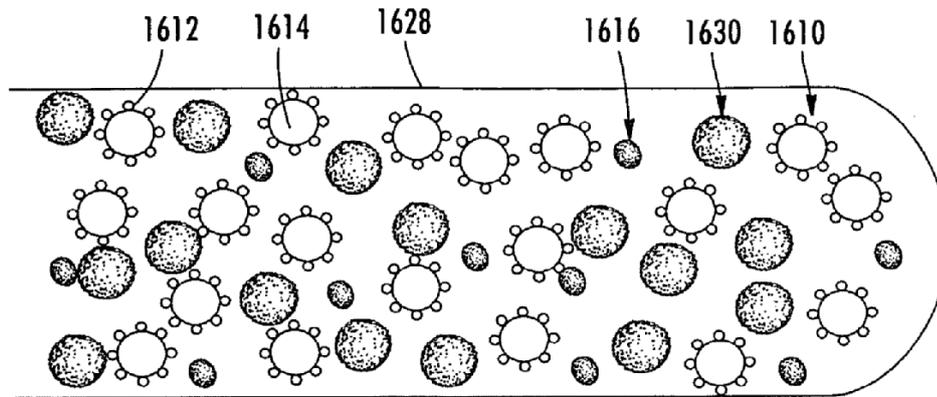


1400

***FIG. 14***

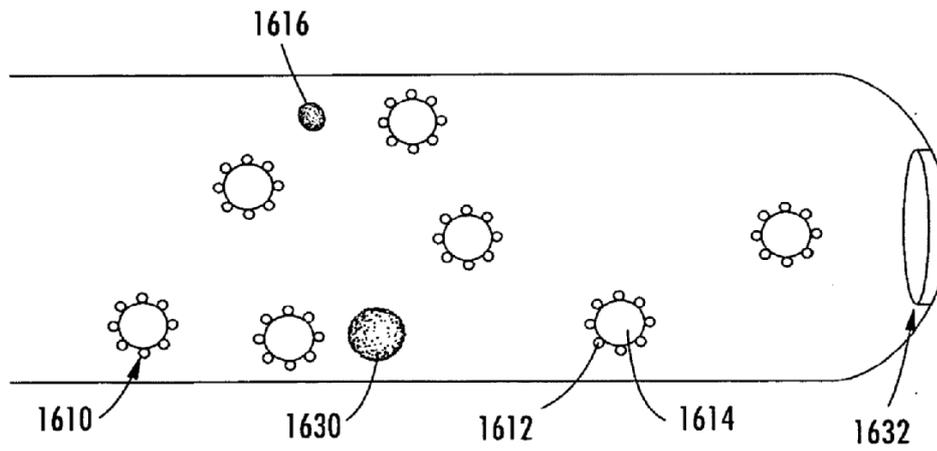


**FIG. 15**



**FIG. 16A**

1600



**FIG. 16B**

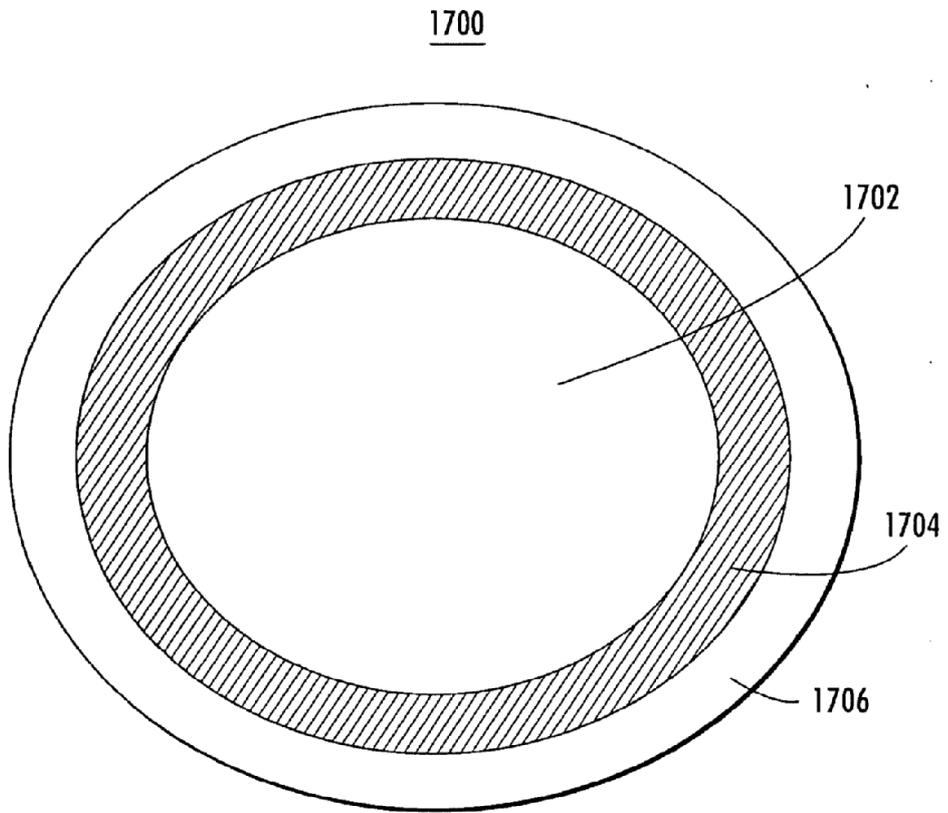
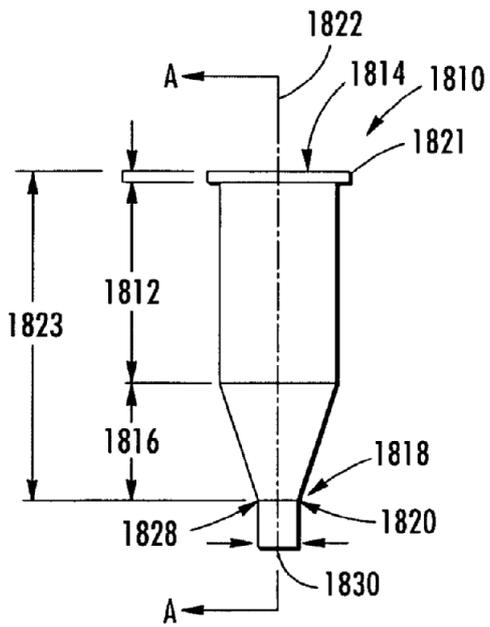
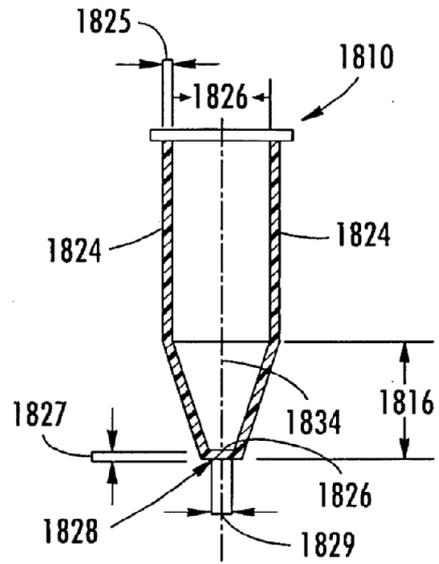


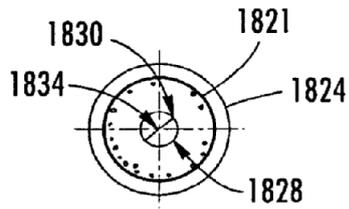
FIG. 17



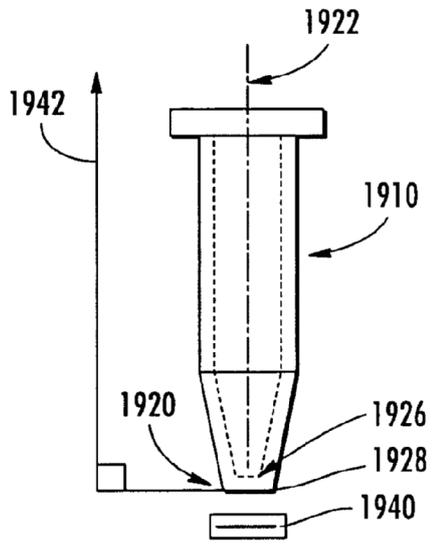
**FIG. 18A**



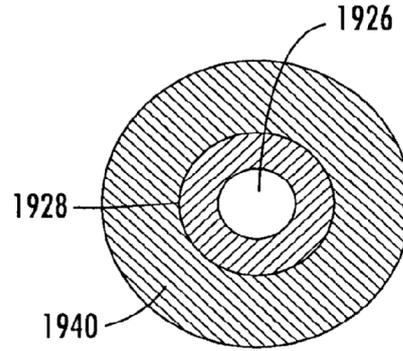
**FIG. 18B**



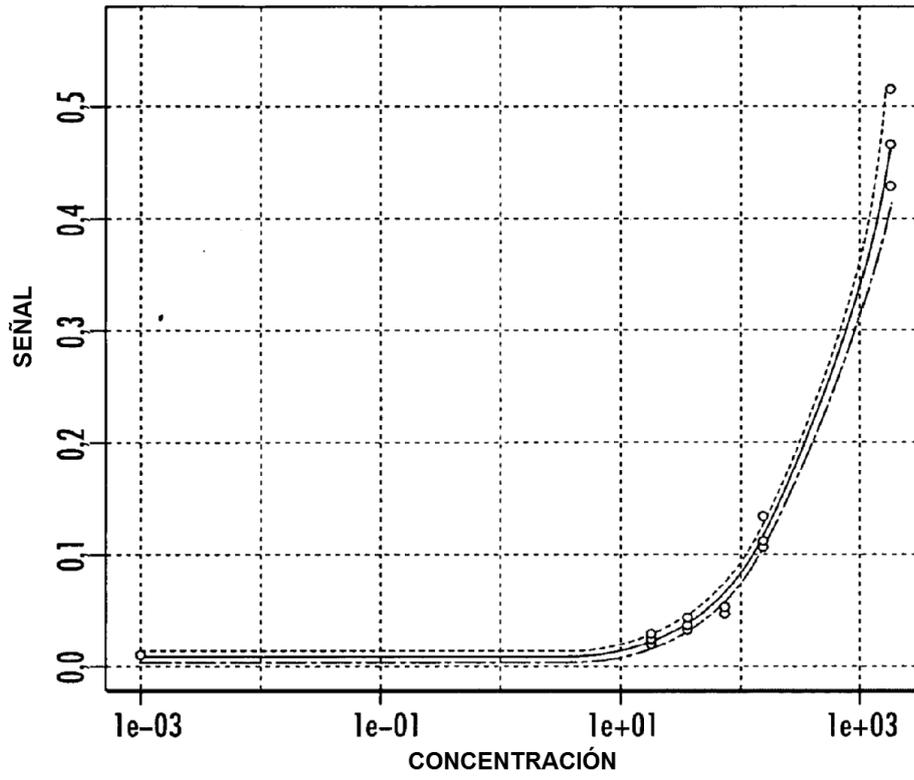
**FIG. 18C**



**FIG. 19A**



**FIG. 19B**



**FIG. 20**