

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 101**

51 Int. Cl.:

**C09K 11/02** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C09K 11/06** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C09K 11/58** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/KR2015/005067**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15178688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15796131 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3272831**

54 Título: **Nanocompuesto núcleo-cubierta para fluorescencia mejorada por metal**

30 Prioridad:

**20.05.2014 KR 20140060090**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

**SNU R&DB FOUNDATION (100.0%)  
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu  
Seoul 151-010, KR**

72 Inventor/es:

**NAM, JWA MIN;  
HWANG, JAE HO;  
KIM, MIN HO y  
LEE, JUNG HOON**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 749 101 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

Nanocompuesto núcleo-cubierta para fluorescencia mejorada por metal

## 5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un nanocompuesto núcleo-cubierta que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie del mismo, a un método de fabricación del mismo, y a un uso del nanocompuesto núcleo-cubierta como sonda para fluorescencia mejorada por metal.

10

## [Antecedentes en la técnica]

A pesar del uso de la fluorescencia en técnicas altamente sensibles, todavía existe un gran impulso para reducir los límites de detección en los sitios en los que las moléculas individuales son detectables. Por lo general, los límites de detección están restringidos por el rendimiento cuántico de un fluoróforo, la autofluorescencia de una muestra y la fotoestabilidad del fluoróforo. Por lo tanto, de forma repentina ha aumentado el uso de nanoestructuras metálicas para modificar de forma satisfactoria las propiedades ópticas del fluoróforo y relajar las restricciones fotofísicas. El uso de interacciones fluoróforo-metal se ha denominado fluorescencia mejorada por metal (MEF) por el Dr. Chris D. Geddes. El uso de MEF incluye aplicaciones de una superficie metálica para una mayor capacidad de detección y fotoestabilidad del fluoróforo, una mejor detección de proteínas y ADN/ARN, emisión de fluorescencia autoextinguible de una proteína marcada, mejor detección radiométrica de la longitud de onda y detección de ensayo amplificada, etc. El equipo de investigación del Dr. Geddes también ha desarrollado numerosas superficies nanoestructuradas para fluorescencia mejorada por metal, tales como islas de plata, coloides de plata, nanotriángulos de plata, nanovarillas de plata y superficies tratadas con plata de tipo fractal. Se han desarrollado diversos modos para la deposición de plata sobre vidrio y plásticos en un aspecto óptico o electroquímico, e incluso modos que usan electrodos. Por ejemplo, se marcan una superficie y una superficie de vidrio tratada con plata con un complejo fluoróforo-proteína, y las dos superficies se irradian con la misma fuente de excitación de láser para observar la fluorescencia. Como resultado, se puede observar fluorescencia mejorada en la superficie tratada con plata, en comparación con la superficie de vidrio. En este caso, la fluorescencia mejorada no surge de los fotones reflejados desde una superficie reflejada, tal como una imagen tomada a través de un filtro de emisión, sino que en realidad surge del acoplamiento y la amplificación plasmónicas. Las señales de fluorescencia se pueden amplificar potencialmente hasta varios millones de veces, y dicho potencial para amplificar las señales de fluorescencia se aplica de forma adecuada a la ciencia biológica y la microscopía cuyos intereses principales son el flujo de fotones y la capacidad de detección.

35

Una nanoestructura plasmónica ha recibido mucha atención debido a las propiedades ópticas útiles y designables, que se pueden aplicar a nanoantenas, dispersión Raman mejorada por superficie (SERS) y fluorescencia mejorada por metal (MEF). En particular, una estructura metálica de metal plasmónica puede tener una señal de fluorescencia mejorada cuando un fluoróforo se dispone de forma adecuada en una superficie de la nanoestructura metálica y, de ese modo, tiene el potencial de ser una sonda de fluoróforo que exhibe una mayor intensidad de señal. El desarrollo de nanosondas de MEF se puede utilizar de manera eficaz de inmediato en una diversidad de campos de investigación y aplicaciones, incluyendo la investigación biológica y la medicina, debido a que la mayoría de las plataformas de detección convencionales se basan en la fluorescencia. Sin embargo, existen diversos problemas relacionados con la comercialización de estas estructuras. Se requiere una comprensión más profunda y precisa del mecanismo de MEF, y se debe diseñar un mejor método para la síntesis de una nanoestructura de MEF que tenga mayor reproducibilidad estructural y rendimiento de síntesis. Literalmente, se ha informado un factor de mejora de MEF de hasta aproximadamente  $10^3$  para la medición de moléculas individuales. Sin embargo, los resultados basados en la medición de una o varias moléculas son un tanto engañosos para las aplicaciones reales que utilizan muestras a granel, y un factor de mejora de MEF promedio en conjunto en una en de solución es solo de aproximadamente 50 veces. Dado que una señal de fluorescencia puede inactivarse o mejorarse de acuerdo con una distancia entre un fluoróforo y una superficie de un metal, es importante obtener una intensidad de señal estable y cuantitativa de las sondas de MEF. Además, tales sondas de MEF deben ser estables para que se puedan utilizar de forma eficaz en diversas condiciones, incluyendo diversas longitudes de onda de láser de excitación, una amplia gama de ligandos y diversas condiciones de tampón.

55

El documento de Patente US2013029360 A1 desvela una nanoestructura dimérica, que comprende dos nanopartículas, con una molécula activa Raman localizada en una unión entre las mismas, consistiendo cada nanopartícula en un núcleo de oro o plata con oligonucleótidos unidos a su superficie, y una cubierta de oro o plata que reviste el núcleo, estando unidas las partículas entre sí mediante los oligonucleótidos. Hui Li; Min Wang; Weibing Qiang; Hongting Hu; Wei Li; Danke Xu, "Metal-enhanced fluorescent detection for protein micro-arrays based on a silver plasmonic substrate", Analyst, 2014, 139, 1653 (doi:10.1039/c3an01875j) desvela nanopartículas núcleo-cubierta de Ag/Au y la fluorescencia mejorada por metal de estas nanopartículas en diferentes colorantes fluorescentes.

## 65 [Divulgación]

**[Problema técnico]**

Los presentes inventores se han esforzado en diseñar sondas que tengan una estructura novedosa, que tengan un excelente efecto de fluorescencia mejorada por metal y que simultáneamente proporcionen señales estables, y descubrieron que un nanocompuesto que tiene una estructura núcleo-cubierta, que se prepara uniendo un polinucleótido que tiene una longitud constante, que tiene un extremo marcado con un fluoróforo, a las superficies de nanovarillas de un primer metal a través del otro extremo del polinucleótido, e introduciendo una cubierta de un segundo metal sobre las nanovarillas del primer metal ajustando el espesor de la cubierta introducida del segundo metal para que el fluoróforo quede expuesto estando separado una distancia constante desde la cubierta del segundo metal, puede proporcionar una señal de fluorescencia cuya intensidad mejora de forma notable debido a la fluorescencia mejorada por metal, y el compuesto fijo también puede proporcionar señales que tienen una mayor reproducibilidad debido a una notable disminución en la variación de la señal ya que se introduce una capa de sílice en el nanocompuesto para que el fluoróforo expuesto esté incorporado a la cubierta de sílice, y puede exhibir un aumento adicional en la intensidad de fluorescencia cuando la cubierta de sílice incluye además un fluoróforo. Por lo tanto, la presente invención se ha basado en estos hechos.

**[Solución técnica]**

Un aspecto de la presente invención proporciona un nanocompuesto núcleo-cubierta que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie del mismo, que incluye nanovarillas de un primer metal que tienen cierta relación de aspecto; un polinucleótido que tiene una longitud constante, unido a las nanovarillas del primer metal a través de un extremo del mismo y que tiene un fluoróforo unido al otro extremo del mismo; y una cubierta de un segundo metal formada sobre las nanovarillas del primer metal al que está unido el polinucleótido ajustando el espesor de modo que esté separada una distancia constante del fluoróforo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para la fabricación de un nanocompuesto núcleo-cubierta que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante desde una superficie del mismo en una dirección vertical, que incluye un primer paso de preparación de nanovarillas de un primer metal; una segunda etapa de unión de un polinucleótido que tiene una longitud constante, que tiene el fluoróforo unido a un extremo del mismo, a las nanovarillas del primer metal; y un tercer paso de formación de una cubierta de un segundo metal sobre las nanovarillas del primer metal al que está unido el polinucleótido ajustando el espesor de modo que este separado una distancia constante del fluoróforo.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona una sonda para fluorescencia mejorada por metal que incluye el nanocompuesto núcleo-cubierta.

**[Efectos ventajosos]**

De acuerdo con el nanocompuesto núcleo-cubierta de la presente invención que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie del mismo, se puede proporcionar una sonda que tiene una estructura novedosa capaz de exhibir un excelente efecto de fluorescencia mejorada por metal y también proporciona señales estables, mediante la selección de dos metales que tengan parámetros de red similares, que puede utilizar un polinucleótido para que se pueda disponer un fluoróforo en una ubicación separada una distancia constante desde la superficie para maximizar la fluorescencia mejorada por metal, introducir una cubierta con un espesor uniforme y controlar el espesor de la cubierta introducida a un nivel subnanométrico. Además, debido a que se puede introducir una cubierta de sílice para estabilizar las señales de fluorescencia, el nanocompuesto núcleo-cubierta se puede usar de forma eficaz como sonda para mejorar de forma notable la sensibilidad de detección en análisis usando fluorescencia.

**[Descripción de las figuras]**

La Figura 1 es un diagrama que muestra de forma esquemática un mecanismo de fluorescencia mejorada por metal y un método para la síntesis de (a) nanoparalelepípedos rectangulares de núcleo-cubierta de Au-Ag modificados con ADN marcados con fluorescencia (f-RNP) para una fluorescencia mejorada por metal (MEF) mediante la aplicación de acuerdo con la presente invención y (b) RNP (Si-RNP) cuyas superficies están revestidas además con sílice.

La Figura 2 es un diagrama que muestra una imagen de TEM de la AuNR sintetizada previamente y las propiedades físicas y ópticas calculadas de la AuNR sintetizada previamente. La AuNR sintetizada previamente se analizó mediante el uso de espectrometría UV-visible, TEM e ICP-AES para medir suficientemente las características dimensionales y ópticas.

La Figura 3 es un gráfico que muestra resultados de análisis cuantitativos de un oligonucleótido tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546 en una superficie de AuNR. En promedio, están unidos 293,4 oligonucleótidos tiolados modificados con Alexa Fluor™ 546 a la superficie de una AuNR.

La Figura 4A es un diagrama que muestra una imagen de TEM de una serie de f-RNP (f-RNP 1 a 6) de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

La Figura 4B es un diagrama que muestra una imagen de SEM de f-RNP 5 inclinada un ángulo de 52° de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

5 La Figura 4C es un gráfico que muestra los espectros UV-visibles de la serie de f-RNP (f-RNP 1 a 6) de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

La Figura 4D es un diagrama que muestra los resultados del análisis dimensional estadístico basado en TEM de la serie de f-RNP (f-RNP 1 a 6) de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

10 La Figura 5 es un diagrama que muestra (a a d) imágenes de mapeo elemental, (e) una imagen de TEM de campo oscuro, y (f) una imagen de HR-TEM y un área seleccionada de difracción de electrones (inserción) de f-RNP 5 de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

La Figura 6 incluye gráficos que muestran (a) las intensidades de fluorescencia integradas y (b) los espesores de cubierta y los factores de mejora de PL de la serie de f-RNP (f-RNP 1 a 6) de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

15 La Figura 7 es un gráfico que muestra las actividades de fluorescencia de la serie de f-RNP (f-RNP 1 a 6) y Alexa Fluor™ 546 libre de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención. La concentración de f-RNP es 0,0728 nM. La mayor actividad de fluorescencia se observó para f-RNP 5.

20 La Figura 8 es un diagrama que muestra (a) una imagen de TEM de f-RNP revestidos con sílice sintetizados de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención y (b) las intensidades de fluorescencia integradas de f-RNP 5 y f-RNP 5 revestidas con sílice (Si-f-RNP 5).

La Figura 9 es un diagrama que muestra de forma esquemática un proceso de revestimiento de una superficie de f-RNP con sílice de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención. Se diseña una cubierta de sílice fluorescente para que cada uno de los f-RNP muestre una mayor capacidad de carga de fluoróforo, así como una ubicación fija de fluoróforo y una estabilidad mejorada.

25 La Figura 10 es un diagrama que muestra una imagen de TEM de f-RNP revestidas con sílice fluorescentes preparadas de acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención. Una nanovarilla revestida de sílice tenía un tamaño total de aproximadamente 150 nm, y la forma y el tamaño de la nanovarilla se mantuvieron durante un proceso de revestimiento con sílice.

### 30 **[Mejor modo]**

Para solucionar los problemas mencionados anteriormente, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un nanocompuesto núcleo-cubierta que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie del mismo, que incluye nanopartículas de un primer metal; un conector que tiene una longitud constante, unido a las nanopartículas del primer metal a través de un extremo del mismo y que tiene el fluoróforo unido al otro extremo del mismo; y una cubierta de un segundo metal formado sobre las nanopartículas del primer metal al que está unido el conector ajustando un espesor de un modo tal que esté separada una distancia constante del fluoróforo.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la fabricación de un nanocompuesto núcleo-cubierta que incluye un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante desde una superficie del mismo en una dirección vertical, que incluye un primer paso de preparación de nanopartículas de un primer metal; un segundo paso de unión de un conector que tiene una longitud constante, que tiene el fluoróforo unido a un extremo del mismo, a las nanopartículas del primer metal; y un tercer paso de formación de una cubierta de un segundo metal sobre las nanopartículas del primer metal al que está unido el conector ajustando el espesor de un modo tal que esté separada una distancia constante del fluoróforo.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una sonda para fluorescencia mejorada por metal que incluye el nanocompuesto núcleo-cubierta de acuerdo con un aspecto de la presente invención

50 En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle la presente invención.

Un nanocompuesto núcleo-cubierta de acuerdo con la presente invención se caracteriza por incluir un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie de un metal, exhibiendo de ese modo un notable efecto de fluorescencia mejorada por metal. En este caso, es importante 1) seleccionar de forma adecuada el material de una cubierta metálica que se introduce e 2) introducir una cubierta metálica ajustando el espesor de la cubierta metálica para maximizar el efecto de fluorescencia mejorada por metal. Cuando la cubierta metálica se forma demasiado gruesa para que el fluoróforo entre en contacto con una superficie del metal o está demasiado cerca de la superficie del metal, la energía de excitación puede ser eliminada al conducirse en lugar de inducir la mejora de la fluorescencia a través de resonancia.

La expresión "fluorescencia mejorada por metal (MEF)" se refiere a un fenómeno en el que la intensidad de las señales de fluorescencia se ve mejorada por la interacción de un fluoróforo y un metal dispuesto cerca del fluoróforo, en comparación con la mejora mediante el propio fluoróforo. De forma específica se puede producir un fenómeno de fluorescencia mejorada por metal como resultado de la interacción entre el fluoróforo en un estado excitado y un

plasmón superficial inducido en una superficie de un metal. La fluorescencia mejorada por metal tiene ventajas tales como 1) eficiencia mejorada de emisión de fluorescencia, 2) sensibilidad de detección mejorada, 3) prevención del fotoblanqueo de materiales fluorescentes y 4) aplicabilidad a todo tipo de moléculas, incluyendo los cromóforos endógenos y exógenos, etc. En general, un metal adecuado para fluorescencia mejorada por metal incluye metales  
5 que tienen una alta densidad de electrones libres. Además, una película delgada metálica continua puede exhibir emisión de fluorescencia mejorada cuando un fluoróforo se dispone dentro de 100 nm de una superficie de la película delgada.

Preferentemente, las nanopartículas del primer metal pueden ser nanovarillas que tienen una relación de aspecto de  
10 1,2 a 10. Cuando la relación de aspecto es inferior a 1,2, el nanocompuesto núcleo-cubierta puede no exhibir un efecto de fluorescencia mejorada por metal debido a una disminución en la eficacia de dispersión de las nanopartículas metálicas. Por otro lado, cuando la relación de aspecto es mayor que 10, puede ser difícil controlar la formación de la cubierta del segundo metal.

15 Preferentemente, cada uno del primer metal y el segundo metal pueden ser independientemente oro, plata, cobre, paladio o platino, pero la presente invención no se limita a los mismos. Algunos ejemplos de metales pueden incluir materiales que tienen un efecto de fluorescencia mejorado por metal que se conoce bien en la técnica relacionada. Además, se pueden usar sin limitación metales capaces de exhibir un efecto de fluorescencia mejorada por metal. Preferentemente, el primer metal y el segundo metal pueden ser metales que tienen los mismos o similares  
20 parámetros de red. De forma específica, el primer metal y el segundo metal se pueden seleccionar entre metales que tienen una relación de parámetros de red de 1:1,4 a 1,4:1. De acuerdo con los aspectos de la presente invención, preferentemente se introduce una cubierta del segundo metal de forma uniforme sobre un núcleo del primer metal para que tenga un espesor constante de modo que un fluoróforo esté dispuesto separado una distancia predeterminada de una superficie del segundo metal. Por lo tanto, el primer metal y el segundo metal que tienen los  
25 mismos parámetros de red o similares se pueden seleccionar de un modo tal que se puede introducir una cubierta del segundo metal en las nanovarillas del primer metal con la misma forma de red con un espesor constante. Por ejemplo, el metal más utilizado para la investigación en fluorescencia mejorada por metal en la técnica relacionada es la plata. Por lo tanto, cuando se introduce plata para formar una cubierta del segundo metal con el fin de exhibir fluorescencia mejorada por metal, se usa preferentemente oro como el material para las nanopartículas del primer  
30 metal. Debido a que el oro es un metal altamente reactivo, es deseable introducir un polinucleótido que tenga una longitud constante, que tenga un fluoróforo unido a un extremo del mismo. Además, el oro tiene la ventaja de que se puede introducir una cubierta de plata de manera uniforme debido a que el oro tiene parámetros de red similares a los de la plata.

35 Para disponer el fluoróforo a una distancia constante de las nanovarillas del primer metal, se puede usar el polinucleótido como conector. Algunos ejemplos del polinucleótido pueden incluir ADN o ARN mono o bicatenario. Más preferiblemente, el conector puede ser ADN. En teoría, se puede usar un polímero que tiene una longitud constante para lograr el fin de disponer el fluoróforo a una distancia constante de las nanovarillas del primer metal. Sin embargo, debido a que el polímero es una mezcla de hebras poliméricas separadas que tienen un peso  
40 molecular medio constante pero diferentes pesos moleculares, es decir, diferentes longitudes, en efecto, no es fácil separar hebras poliméricas de forma pura que tengan una longitud constante. Por otra parte, se puede obtener un polinucleótido que tiene una longitud constante con facilidad mediante la síntesis de un polinucleótido ajustando el número de nucleótidos que constituyen el polinucleótido. Además, se puede unir un polinucleótido tal como ADN y ARN a otra cadena que tenga enlaces complementarios para formar una cadena doble. En este caso, se puede  
45 proporcionar una cadena principal más rígida cuya longitud se controle con mayor facilidad. Por otra parte, puede estar presente un polinucleótido compuesto por varias a varias decenas de nucleótidos en forma de una varilla algo rígida sin doblarse, incluso cuando está presente como una sola cadena. En particular, debido a que el ADN es estable incluso en condiciones generales de reacción, a diferencia del ARN que se degrada con facilidad y, de ese modo, requiere condiciones de reacción especiales (condiciones libres de ARNasa), el ADN puede ser útil para la  
50 introducción de un fluoróforo que tenga una distancia constante de acuerdo con un objeto de la presente invención

Preferentemente, se puede incorporar el fluoróforo separado una distancia constante de una superficie de la cubierta del segundo metal para que se exponga al exterior revistiendo además una superficie externa del nanocompuesto núcleo-cubierta con una cubierta de sílice, obteniendo de ese modo señales de fluorescencia más estables. Además,  
55 la cubierta de sílice puede incluir además un fluoróforo que exhiba el efecto adicional de mejorar las señales de fluorescencia.

De acuerdo con una realización a modo de ejemplo de la presente invención, se puede ver que un nanocompuesto núcleo-cubierta en el que se introduce una cubierta de plata con un espesor constante después de que un extremo  
60 del ADN tiolado que tiene una longitud de aproximadamente 10 nm se marque con Alexa Fluor 546 como fluoróforo y el otro extremo se una a nanovarilla de oro, puede exhibir un efecto de fluorescencia mejorada por metal cuando el fluoróforo se dispone a una distancia predeterminada de una superficie de la cubierta (Figuras 6 y 7). Además, se puede ver que el nanocompuesto núcleo-cubierta puede tener señales de fluorescencia mejoradas que tienen una variación de señal más estable, es decir, una variación de señal más pequeña, introduciendo además una cubierta  
65 de sílice en el nanocompuesto núcleo-cubierta de un modo tal que el fluoróforo expuesto esté incorporado en la

cubierta de sílice para que se fije en la ubicación correspondiente (Figura 8).

Además, la sonda para fluorescencia mejorada por metal que incluye el nanocompuesto núcleo-cubierta de acuerdo con la presente invención es aplicable a la detección de una sola molécula debido a una excelente sensibilidad y, de ese modo, se puede usar de forma eficaz como un biosensor para el diagnóstico *in vitro* de enfermedades diana, seguimiento intracelular de biomateriales, imágenes *in vivo*, células solares, detección de fármacos, secuenciación de genes, etc., cuando un material diana o un material de detección que se une específicamente al material diana se marca con la sonda.

## 10 [Modo para la invención]

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán las configuraciones y los efectos de la presente invención se describirán con más detalle por referencia a ejemplos de los mismos. Se ha de entender que los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ayudar a comprender la presente invención, pero no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

### <Materiales>

Todos los reactivos químicos ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , CTAB,  $\text{NaBH}_4$ , ácido L-ascórbico,  $\text{AgNO}_3$ , dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), ditioneitol (DTT), CTAC, EtOH, MeOH, 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), dimetilamina y ortosilicato de tetraetilo) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), y se usaron sin purificación adicional. Se adquirió un oligonucleótido tiolado codificado con colorante purificado por HPLC en IDT Inc. (Coralville, IA, EE. UU.), y se redujo usando ditioneitol (0,1 M) disuelto en un tampón fosfato (170 mM, pH = 8,0). Después de eso, el oligonucleótido reducido se purificó a través de una columna de desalación NAP-5 (medio Sephadex G-25, calidad de ADN). Se usó  $\text{H}_2\text{O}$  NANOpure ( $> 18,0 \text{ M}\Omega$ ) purificada mediante el uso de un sistema de purificación de agua Milli-Q en todos los experimentos. El ácido carboxílico Alexa Fluor™ y los fluoróforos de éster de succinimido se adquirieron en Molecular Probes (Eugene, Oregon, EE. UU.). Se utilizaron un HR-TEM (JEM ARM 200F, JEOL, Japón, 200 kV, FEI Company, Hillsboro, Oregon, EE. UU.) equipado con una rejilla de cobre revestida con carbono de forma variable (Ted Pella, Inc. Redding, CA, EE. UU.) y una unidad de espectroscopía de dispersión de energía (EDS) (EDAX) para el mapeo elemental y análisis de red, y se obtuvieron otras imágenes de TEM utilizando JEM-2100 (JEOL, Japón, 200 kV). Se usó un espectrómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP-ES, ICPS-7510, Shimadzu, Japón) para medir la concentración en masa de las nanovarillas de oro (AuNR) preparadas, y se usó un fluoroespectrómetro NanoDrop 3300 para medir las nanovarillas. La forma de las nanovarillas de oro formadas se observó usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM, Helios 650, FEI, EE. UU.).

### Ejemplo 1: Preparación de nanovarillas de oro (AuNR)

Se fabricaron AuNR que tienen un valor de relación de aspecto de aproximadamente 4,0 usando un método mediado por semillas ligeramente modificado conocido en la técnica. De forma específica, se preparó una semilla mezclando 5 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM con 5 ml de CTAB 0,2 M, y se añadieron rápidamente a la misma 600 ml de una solución de  $\text{NaBH}_4$  0,01 M enfriada en hielo. La solución de semilla se usó 2 horas después de la etapa de reducción. Se mezclaron 5 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,5 mM con 5 ml de una solución de CTAB 0,2 M, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{AgNO}_3$  y luego se añadieron a la misma 70  $\mu\text{l}$  de ácido L-ascórbico 78 mM. Después de que la mezcla resultante se mezclara suavemente, se añadieron 12  $\mu\text{l}$  de la solución de semilla preparada con antelación, y la mezcla se incubó durante al menos 4 horas para obtener las AuNR. Las AuNR preparadas de ese modo se analizaron usando TEM, espectrometría UV-Vis y un ensayo de ICP-AES. Los tamaños y las relaciones de aspecto de 202 AuNR se analizaron utilizando el software ImageJ. Las AuNR tenían un tamaño de  $50,32 (\pm 4,26) \text{ nm} \pm 12,81 (\pm 0,94) \text{ nm}$  y un valor de relación de aspecto de  $3,95 (\pm 0,42)$ . Se reveló que el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) calculado a 520 nm era de  $1,374 \times 10^9$ , y la absorbancia a 520 nm era de 0,249 cuando se analizaba usando ICP-AES. A partir de estos resultados, se confirmó que la concentración de oro de la solución preparada de las AuNR era de 69,5  $\mu\text{M}$ . Se observaron modos transversales y longitudinales a 510 y 765 nm, respectivamente (Figura 2).

### 55 Ejemplo 2: Preparación de AuNR modificadas con ADN marcadas con fluorescencia mediante un proceso salino

Un oligonucleótido (ADN) tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546 se unió a una superficie de las AuNR sintetizadas en el Ejemplo 1. En primer lugar, se mezclaron 1.500  $\mu\text{l}$  de una solución de oligonucleótido tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546 reducido recientemente y 67,8  $\mu\text{l}$  de una solución al 10 % de SDS con 4.500  $\mu\text{l}$  de una solución de AuNR 1,16 nM. La solución mezclada se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, la solución se diluyó con un tampón fosfato 100 mM para alcanzar una concentración final de fosfato de 10 mM (pH 7,4), y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron tres partes alícuotas de  $\text{NaCl}$  2 M (PB 10 mM, 0,1 % de SDS) a agua hirviendo cada 20 minutos para formar una solución de  $\text{NaCl}$  0,3 M. Una hora después de la adición final, la solución coloidal formada se centrifugó dos veces (a

9.500 rpm durante 10 min), y el precipitado se volvió a dispersar en agua desionizada. Antes de una etapa de crecimiento de la cubierta, se midió una densidad óptica (DO) de las partículas modificadas con ADN mediante un espectrofotómetro UV-visible a 520 nm para determinar la concentración de las partículas modificadas con ADN.

### 5 Ejemplo 3: Cuantificación de oligonucleótidos modificados por AuNR individual

Para determinar el número de oligonucleótidos marcados con colorante cargados en cada partícula de AuNR, se midió la concentración de nanopartículas de AuNR y la concentración de oligonucleótidos fluorescentes en cada muestra. Para determinar la concentración de la solución de AuNR en cada parte alícuota, se utilizó un espectrofotómetro visible-UV. La concentración de AuNR se asoció directamente con un valor de absorbancia a través de la ley de Lambert-Beer ( $A = \epsilon bc$ ). El coeficiente de extinción molar que se utilizó en la presente invención fue de  $1,374 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 520 nm. Para determinar la concentración de los oligonucleótidos fluorescentes en cada alícuota, se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de los oligonucleótidos modificados en la solución de AuNR con un volumen igual de una solución de KCN 100 mM para destruir la estructura reticular de AuNR, separando de ese modo los oligonucleótidos de la superficie de AuNR. En esta etapa, la concentración de los oligonucleótidos se diluyó dos veces. La solución mixta se incubó para liberar los oligonucleótidos en la solución y se obtuvo un sobrenadante para medir la intensidad de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se comparó con una curva estándar basada en oligonucleótidos tiolados modificados con Alexa Fluor™ 546 libres, y se midieron tres lotes diferentes para obtener la desviación estándar (Figura 3). Para la medición de la fluorescencia, el fluoróforo se excitó a 510 nm para medir la fluorescencia. Como resultado, se confirmó que, en promedio, se unieron 293,4 oligonucleótidos fluorescentes a una partícula de AuNR.

### Ejemplo 4: Formación de cubierta de plata sobre las superficies de las AuNR modificadas con ADN marcadas con fluorescencia

Se formó una cubierta de Ag sobre las AuNR modificadas con ADN marcadas con fluorescencia (ADN-AuNR) y se aumentó de forma gradual el espesor de la cubierta de Ag. La solución de AuNR preparada en el Ejemplo 2 se diluyó de un modo tal que la DO a 520 nm se convirtiera en 0,5. Una solución diluida de AuNR (100  $\mu\text{l}$ ) se mezcló de forma secuencial con CTAC,  $\text{AgNO}_3$  y una solución de ácido L-ascórbico 0,1 M, y la mezcla resultante se incubó a 60 °C durante 3 horas. Las concentraciones de los reactivos añadidos fueron de forma secuencial CTAC 2,5 mM (f-RNP 1), 5,0 mM (f-RNP 2), 7,5 mM (f-RNP 3), 10,0 mM (f-RNP 4), 15,0 mM (f-RNP 5) y 20,0 mM (f-RNP 6); y  $\text{AgNO}_3$  0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 y 2,0 mM, respectivamente. De forma específica, las concentraciones de CTAC y  $\text{AgNO}_3$  aumentaron mientras que se mantuvo una relación molar entre CTAC y  $\text{AgNO}_3$  de 10 para preparar una serie de muestras. Después de la incubación, las soluciones resultantes se centrifugaron a 7.000 rpm (f-RNP 1 y f-RNP 2), 6.000 rpm (f-RNP 3 y f-RNP 4) o 5.000 rpm (f-RNP 5 y f-RNP 6) durante 10 minutos, y se dispersaron de nuevo en agua desionizada. Las AuNR modificadas con ADN marcadas con fluorescencia fabricadas que tienen una cubierta formada en sus superficies se denominaron nanoparalelepípedos rectangulares plasmónicos funcionalizados con ADN fluorescente, que en lo sucesivo en el presente documento se abrevian como f-RNP. Cada una de las muestras se distinguió por un número después del nombre abreviado descrito anteriormente.

### Ejemplo 5: Revestimiento de f-RNP con cubierta de sílice fluorescente o no fluorescente

Se mezclaron 3,5  $\mu\text{l}$  de 3-aminopropiltriétoxilano (APTES) al 0,2 % (v/v, una solución de EtOH) con 62,5  $\mu\text{l}$  de DMF y 8,4  $\mu\text{l}$  de Alexa Fluor™ 546 marcado con éster de succinimidilo carboxílico 0,8 mM (una solución en MeOH). La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 12 horas, y se añadieron a la misma 700  $\mu\text{l}$  de etanol y 53,3  $\mu\text{l}$  de una solución de dimetilamina. Después de 4 horas, se mezclaron 750  $\mu\text{l}$  de la solución con 50  $\mu\text{l}$  de f-RNP 5 1,82 nM (una solución en agua destilada) y se incubaron durante 30 minutos. Después de eso, se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de ortosilicato de tetraetil al 10 % (v/v, una solución en EtOH), y la solución resultante se incubó durante otras dos horas y media. La solución se centrifugó dos veces (a 5.000 rpm durante 15 minutos), se lavó y a continuación se dispersó de nuevo en agua desionizada.

### Ejemplo 6: Caracterización de los f-RNP

Las características espectroscópicas y morfológicas de los f-RNP se analizaron utilizando un espectrómetro UV-visible y TEM (Figura 4). A medida que aumentaba la cantidad de un precursor de Ag usada, se observó un cambio espectroscópico notable. Los f-RNP 1 a 3 se compararon con las AuNR, y se observó un pico transversal más amplio (a 510 nm) y un pico longitudinal más amplio (a 765 nm). A medida que aumentaba la cantidad del precursor de Ag usada, también aumentaban las intensidades de los dos picos (Figura 4C). A partir de la imagen de TEM (Figura 4A), se confirmó que los depósitos de Ag tenían espesores casi idénticos en ambas direcciones, longitudinal y transversal, en el caso de la serie de los f-RNP de acuerdo con la presente invención. Se sabe que las AuNR que tienen una relación de aspecto de 3 a 7 tienen una dirección de crecimiento longitudinal; y una sección transversal octogonal encerrada por los planos {100} y {110}, y los planos {110} y {111} están expuestos a través de una región truncada en un extremo de la misma. Inicialmente, se produjo un sobrecrecimiento conformacional inducido por vía termodinámica en las regiones final y lateral de la AuNR. Cuando se lleva a cabo una etapa de crecimiento de Ag utilizando un agente de protección CTAC, los planos {110} y {111} de la AuNR tienen una tasa de crecimiento

epitaxial más alta que el plano {100}.

A medida que crecía la cubierta de Ag, las partículas núcleo-cubierta de Au-Ag se fueron rodeando de forma gradual por el plano {100} de Ag, que está fuertemente unido al agente de protección y al CTAC. Para los f-RNP 3 a 6, las capas de Ag se hicieron más gruesas en una dirección transversal que en una dirección longitudinal, y los f-RNP tenían bordes relativamente afilados (Figura 4A). Además, se determinó la forma tridimensional de paralelepípedo rectangular de f-RNP 5 usando la medición de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo usando una inclinación de 52° (Figura 4B). A partir de estos resultados, se confirmó que un extremo de la partícula núcleo-cubierta se rodeaba con mayor rapidez por la cara {100}, en comparación con las regiones laterales. El CTAC fuertemente unido a una superficie de Ag fue capaz de bloquear el crecimiento de la cubierta para inducir una diferencia en la tasa de crecimiento de la cubierta entre las direcciones transversal y longitudinal de las partículas núcleo-cubierta después del f-RNP 3. Se observaron cuatro modos plasmónicos distintos a 280 nm, 390 nm, 440 nm y 580 nm en el espectro UV-visible (Figura 4C). En particular, los modos plasmónicos a 280 y 390 nm representan dos formaciones distintas de cubierta de Ag (en las direcciones longitudinal y transversal), y los modos plasmónicos a 440 y 580 nm pueden explicar los modos transversal y longitudinal de los f-RNP.

Además, se llevó a cabo un análisis de TEM específico utilizando el software ImageJ ([rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/); Figura 4D). Para cada una de las estructuras de f-RNP, se midieron al menos 100 partículas. Las longitudes transversales y longitudinales de los f-RNP aumentaron de 12,8 nm a 36,1 nm y de 50,3 nm a 60,4 nm, respectivamente, lo que indica que el espesor de la cubierta de Ag aumenta por lo general en la dirección transversal. Los espesores medios transversales y longitudinales de la cubierta se calcularon restando la dimensión de la AuNR de la dimensión medida de cada uno de los f-RNP. Los espesores de cubierta transversales y longitudinales fueron de 11,6 y 5,0 nm, respectivamente. El espesor de la cubierta transversal (11,6 nm) del f-RNP 6 fue similar a la longitud teórica del oligonucleótido tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546, mientras que la longitud longitudinal del f-RNP 6 fue mucho menor que la longitud teórica del oligonucleótido fluorescente. Las relaciones de aspecto de los f-RNP disminuyeron de forma gradual a medida que aumentó el espesor de la cubierta de Ag formada (Figura 4D).

Para analizar adicionalmente las características estructurales de los f-RNP, se obtuvo una imagen de mapeo elemental e información reticular del f-RNP 5 (Figura 5). Los resultados mostraron por lo general que el núcleo de la AuNR y la cubierta de Ag estaban claramente separados sin mezcla entre los elementos de Au y Ag. Además, se confirmaron estructuras rectangulares de paralelepípedo que tienen esquinas de Ag bien definidas en la imagen de TEM de campo oscuro (Figura 5E). La Figura 5F muestra una imagen de TEM de alta resolución (HR-TEM) y los resultados de difracción de electrones de área seleccionada (SAED). Se observaron franjas claras y continuas que tienen un eje de zona reticular [001] con una distancia de 2,0 Å y que pueden indexarse con {200} de Ag cúbico centrado en las caras (fcc) en la imagen de HR-TEM. Los patrones de SAED correspondientes indicaron puntos de simetría cuadrados. A partir de estos resultados, se confirmó que la cubierta de Ag tenía una única estructura cristalina rodeada por el plano {100}. Se puede ver que se observaron bordes claros en las regiones de las esquinas de la cubierta de Ag en la imagen de HR-TEM mostrando secciones rectangulares fusionadas por el plano {100}.

A continuación, se midió la mejora de la señal de fluorescencia para 2 ml de una solución de f-RNP usando un fluoroespectrómetro NanoDrop 3300 (Figuras 6 y 7). Un gráfico integrado de intensidad de fluorescencia mostró que la intensidad de la señal de fluorescencia aumentó de forma lineal a medida que creció la cubierta de Ag, de los f-RNP 3 a 5. Para el f-RNP 6 que tiene una cubierta de Ag transversal que tiene un espesor de aproximadamente 12 nm, las señales de fluorescencia comenzaron a disminuir cuando el colorante de fluoróforo y la cubierta de Ag estaban cerca o en contacto entre sí. Esto indica que la cubierta de Ag se forma preferentemente en un estado en el que el colorante de fluoróforo y la cubierta de Ag se mantuvieron separados a una distancia adecuada, considerando que la diferencia principal entre RNP 5 y RNP 6 surgió del espesor transversal de la cubierta de Ag. Los factores de mejora de fotoluminiscencia (PL) de los f-RNP se calcularon a partir de las intensidades de fluorescencia medidas. Las señales de fluorescencia de los f-RNP se compararon con la señal de fluorescencia del oligonucleótido tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546 libre para obtener un factor de mejora de PL para cada una de las estructuras de f-RNP (Figura 6B). El factor de mejora PL se define de la siguiente manera:

$$\frac{I_{MEF}/C_{MEF}}{I_{PL}/C_{PL}}$$

en la que  $I_{MEF}$  y  $C_{MEF}$  representan la intensidad de PL integrada de los f-RNP y la concentración de Alexa Fluor™ 546 en la solución.  $I_{PL}$  y  $C_{PL}$  representan la intensidad de PL integrada y la concentración de un oligonucleótido tiolado modificado con Alexa Fluor™ 546 libre. Basándose en los resultados, se confirmó que f-RNP 5 con un espesor de cubierta de Ag transversal y longitudinal de 9,64 nm y 4,81 nm en una nanovarilla de oro unida a ADN que tiene una longitud de aproximadamente 15 pb y un fluoróforo marcado en un extremo, es una sonda adecuada para MEF, y el factor de mejora de MEF para la sonda f-RNP 5 en la solución fue de aproximadamente

300.

Además, se confirmó que la estabilidad de las partículas y la toxicidad biológica de los f-RNP se podían mejorar cuando las partículas se revestían con una cubierta de sílice. En general, una superficie de Ag expuesta a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o suero humano puede causar inestabilidad de las partículas. Además, la desviación de las señales de fluorescencia medidas aumentó cuando la distancia entre el colorante de fluoróforo y la superficie del metal es fija o variable debido al movimiento del colorante. Después de buscar el espesor óptimo de la cubierta de Ag para MEF, se formó una cubierta de sílice para que el fluoróforo se fijara en una ubicación optimizada de fluoróforo de f-RNP, y el fluoróforo se incorporara a la cubierta de sílice para minimizar la fluctuación de la señal de fluorescencia en una única partícula y la fluctuación de la señal de fluorescencia de partícula a partícula (Figura 1B).

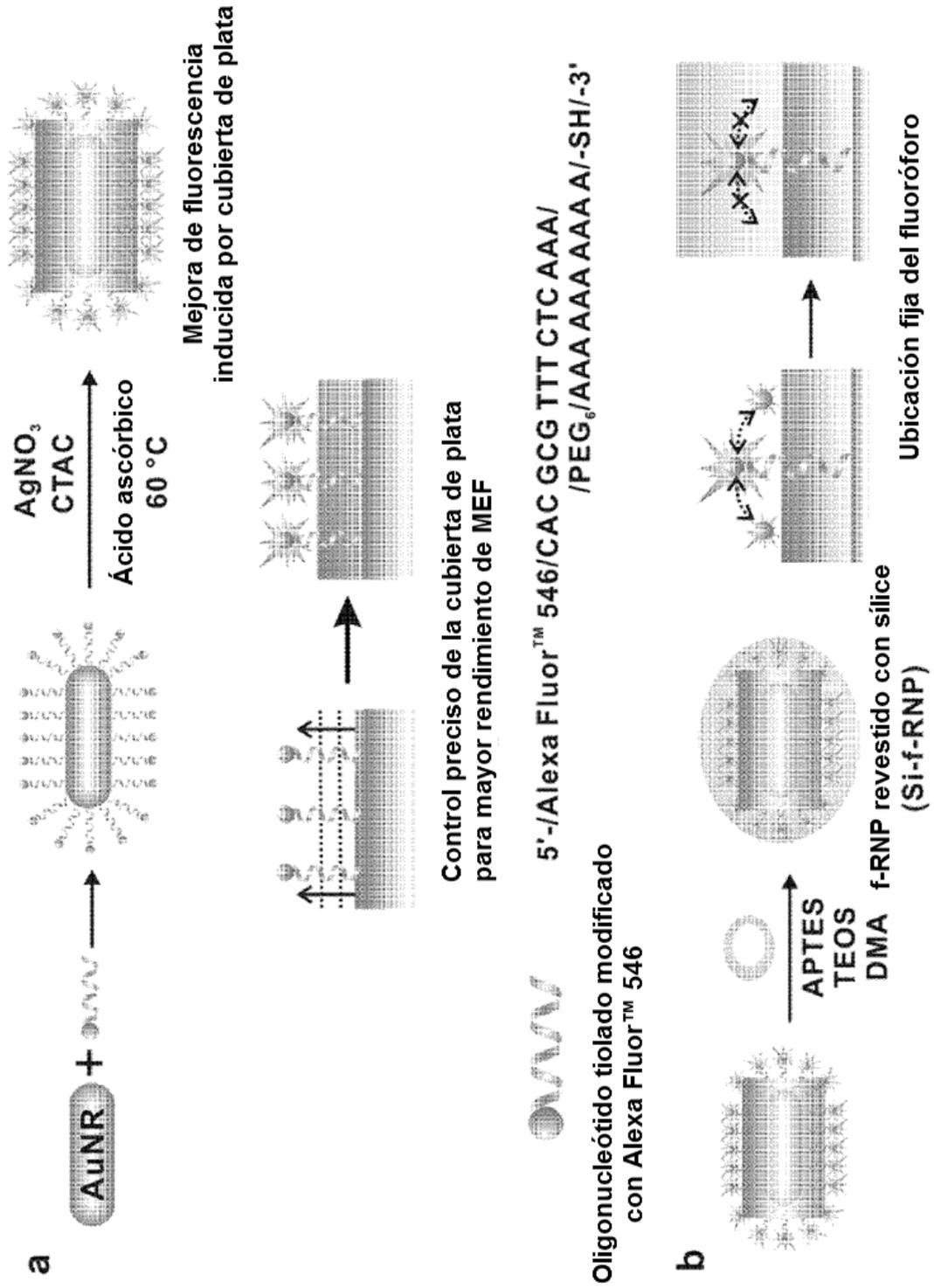
En un experimento representativo para formar la cubierta de sílice, se mezclaron 3,5  $\mu$ l de APTES al 0,2 % (v/v, en EtOH) con 762,5  $\mu$ l de EtOH y 53,3  $\mu$ l de una solución de dimetilamina. Después de mantener la solución resultante a temperatura ambiente durante 4 horas, se mezclaron 750  $\mu$ l de la solución con 50  $\mu$ l de una solución de f-RNP 5 1,82 nM disuelta en agua destilada, y la solución mezclada se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se añadieron a la misma 2 ml de ortosilicato de tetraetilo al 10 % (v/v, en EtOH), y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La solución se centrifugó dos veces (a 5.000 rpm durante 15 minutos) y luego se dispersó de nuevo en agua desionizada. Se midió una imagen de TEM para determinar si se formó una cubierta de sílice en el f-RNP (Figura 8A). Como resultado, los f-RNP estaban completamente encerrados por la cubierta de sílice, y casi todas las cubiertas de sílice incluían los f-RNP. A continuación, se determinaron las diferencias en la intensidad de la señal de fluorescencia y la actividad de reproducibilidad entre f-RNP 5 y f-RNP 5 revestido de sílice (Si-f-RNP 5). Como resultado, las intensidades de la señal de fluorescencia fueron muy similares antes y después del revestimiento con sílice. Sin embargo, la desviación estándar de la intensidad de la señal de fluorescencia de Si-f-RNP 5 disminuyó en comparación con el f-RNP 5, lo que indica que la reproducibilidad de la señal se pudo mejorar aún más a través de la formación de la cubierta de sílice (aproximadamente una mejora de 2 veces en la desviación estándar; Figura 8B). En este caso, cuando se incorporaron moléculas fluorescentes adicionales a la cubierta de sílice para el revestimiento durante el proceso de formación de la cubierta de sílice, la intensidad de fluorescencia de cada una de las partículas se pudo mejorar aún más (Figuras 9 y 10).

A modo de resumen, los presentes inventores desarrollaron una estrategia sintética para analizar sistemáticamente una sonda de RNP óptima para MEF usando ADN marcado con fluorescencia cuya longitud era ajustable y ajustando el espesor de una cubierta de plata formada regulando de forma precisa la química de formación de la cubierta para ajustar la distancia entre el fluoróforo marcado y la superficie de la cubierta de plata sobre el ADN. Para este fin, se analizaron específicamente las características estructurales y ópticas de los f-RNP. Se reveló que se consigue un factor de mejora de PL de aproximadamente 300 para las muestras en solución en condiciones optimizadas. Además, los presentes inventores confirmaron que la estabilidad y la reproducibilidad de la señal de la sonda mejoraron mediante la formación de una cubierta de sílice en los f-RNP. La estructura Si-f-RNP puede ser una plataforma prometedora para el uso práctico de la sonda de MEF. Los presentes inventores esperan que las estrategias y los resultados de acuerdo con la presente invención proporcionen beneficios para el uso de la sonda de MEF en una mejor comprensión de la sonda de MEF, investigación cuantitativa fiable usando la sonda de MEF, detección química y biológica, y aplicaciones de formación de imágenes biológicas.

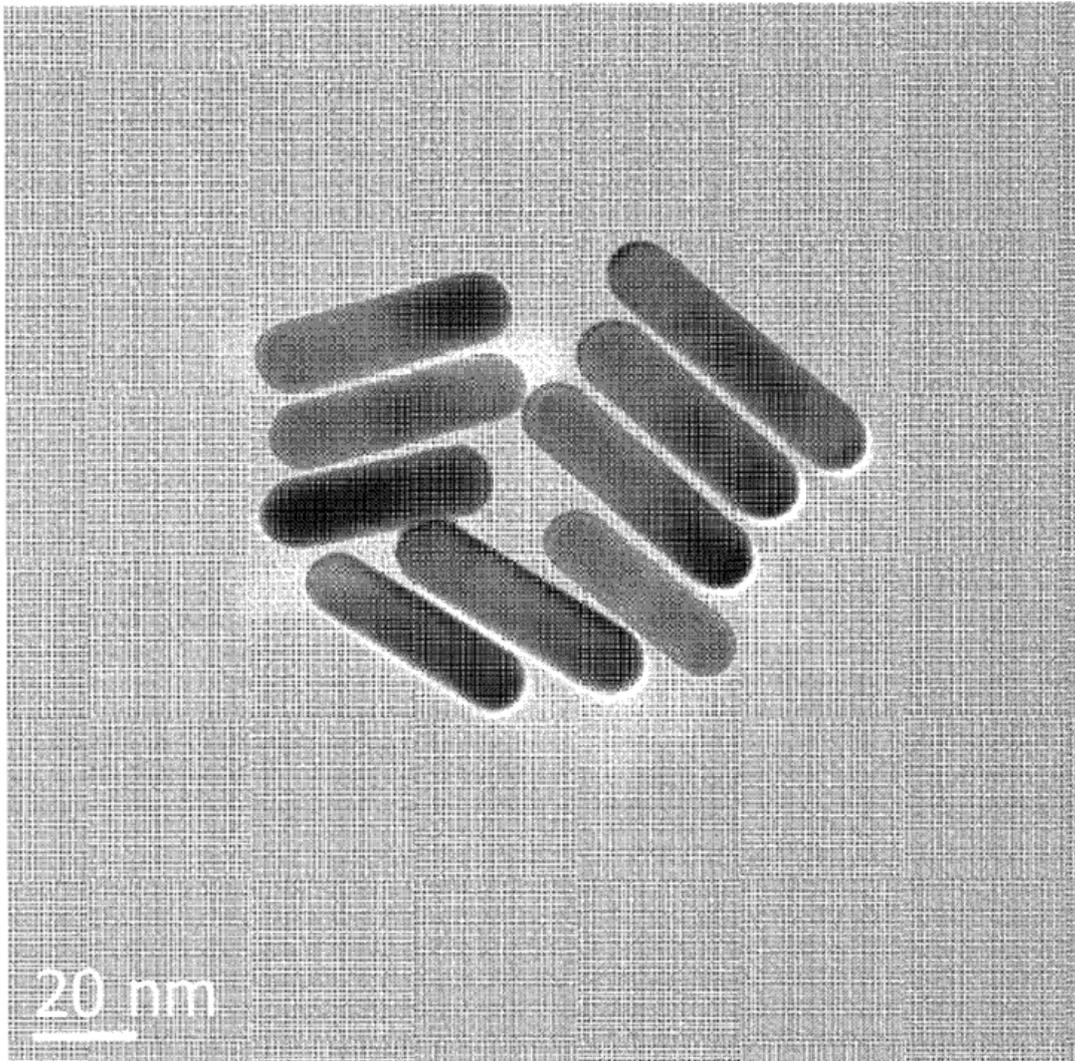
**REIVINDICACIONES**

1. Un nanocompuesto núcleo-cubierta que comprende un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante en una dirección vertical desde una superficie del mismo, que comprende:
  - 5 nanopartículas de un primer metal;
  - un conector que tiene una longitud constante, unido a las nanopartículas del primer metal a través de un extremo del mismo y que tiene el fluoróforo unido al otro extremo del mismo; y
  - 10 una cubierta de un segundo metal formada sobre las nanopartículas del primer metal al que está unido el conector ajustando el espesor de modo que esté separada una distancia constante del fluoróforo.
2. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 1, que tiene un efecto de fluorescencia mejorada por metal.
3. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 1, en el que las nanopartículas del primer metal
  - 15 comprenden nanovarillas que tienen una relación de aspecto de 1,2 a 10.
4. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 1, en el que el primer metal y el segundo metal son cada uno independientemente oro, plata, cobre, paladio, o platino.
- 20 5. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 4, en el que el primer metal y el segundo metal tienen una relación de parámetros de red de 1:1,4 a 1,4:1.
6. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 1, en el que el conector es ADN o ARN mono o bicatenario.
- 25 7. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 1, en el que el fluoróforo está revestido además con una cubierta de sílice de un modo tal que el fluoróforo está incorporado en un estado en el que el fluoróforo mantiene una distancia constante desde una superficie de la cubierta del segundo metal.
8. El nanocompuesto núcleo-cubierta de la reivindicación 7, en el que la cubierta de sílice comprende además un
  - 30 fluoróforo.
9. Un método de fabricación de un nanocompuesto núcleo-cubierta que comprende un fluoróforo dispuesto para tener una distancia constante desde una superficie del mismo en una dirección vertical, que comprende:
  - 35 una primera etapa de preparación de nanopartículas de un primer metal;
  - una segunda etapa de unión de un conector que tiene una longitud constante, que tiene el fluoróforo unido a un extremo del mismo, a las nanopartículas del primer metal; y
  - una tercera etapa de formación de una cubierta de un segundo metal sobre las nanopartículas del primer metal al que está unido el conector ajustando el espesor de modo que esté separada una distancia constante del
    - 40 fluoróforo.
10. El método de la reivindicación 9, en el que las nanopartículas del primer metal comprenden nanovarillas que tienen una relación de aspecto de 1,2 a 10.
- 45 11. El método de la reivindicación 9, en el que cada uno del primer metal y el segundo metal es independientemente oro, plata, cobre, paladio, o platino.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el primer metal y el segundo metal tienen una relación de parámetros de red de 1:1,4 a 1,4:1.
- 50 13. El método de la reivindicación 9, en el que el conector es ADN o ARN mono o bicatenario.
14. El método de la reivindicación 9, que comprende además una cuarta etapa de revestimiento del nanocompuesto núcleo-cubierta con una cubierta de sílice que comprende además o no comprende un fluoróforo.
- 55 15. Una sonda para fluorescencia mejorada por metal que contiene el nanocompuesto núcleo-cubierta definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

[Fig. 1]

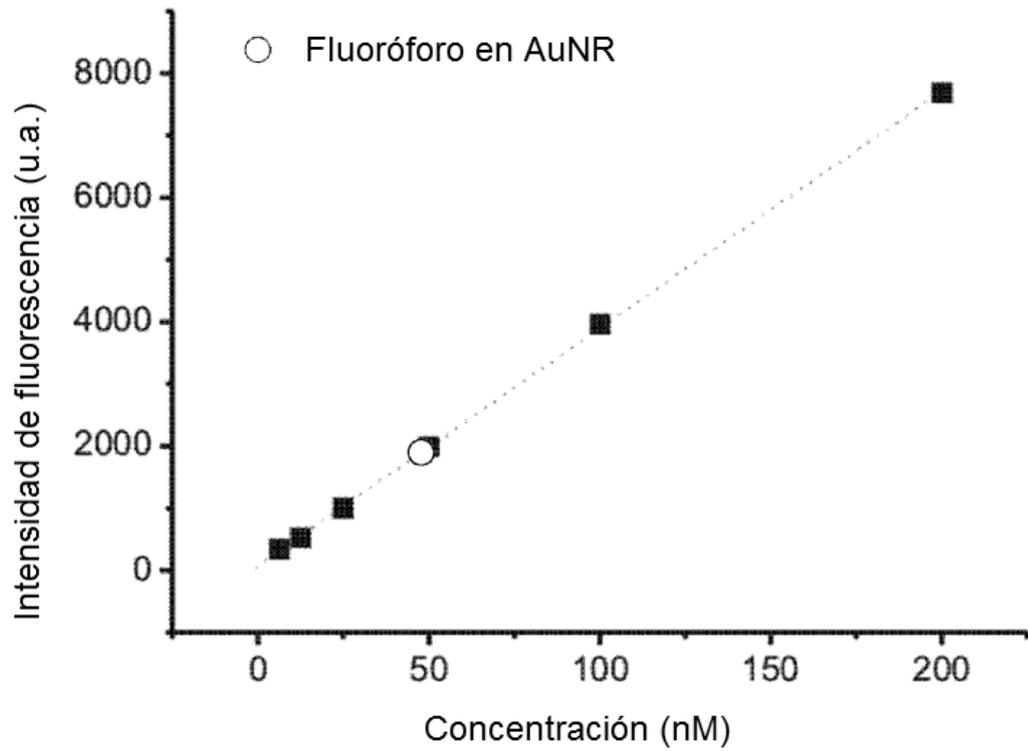


[Fig. 2]

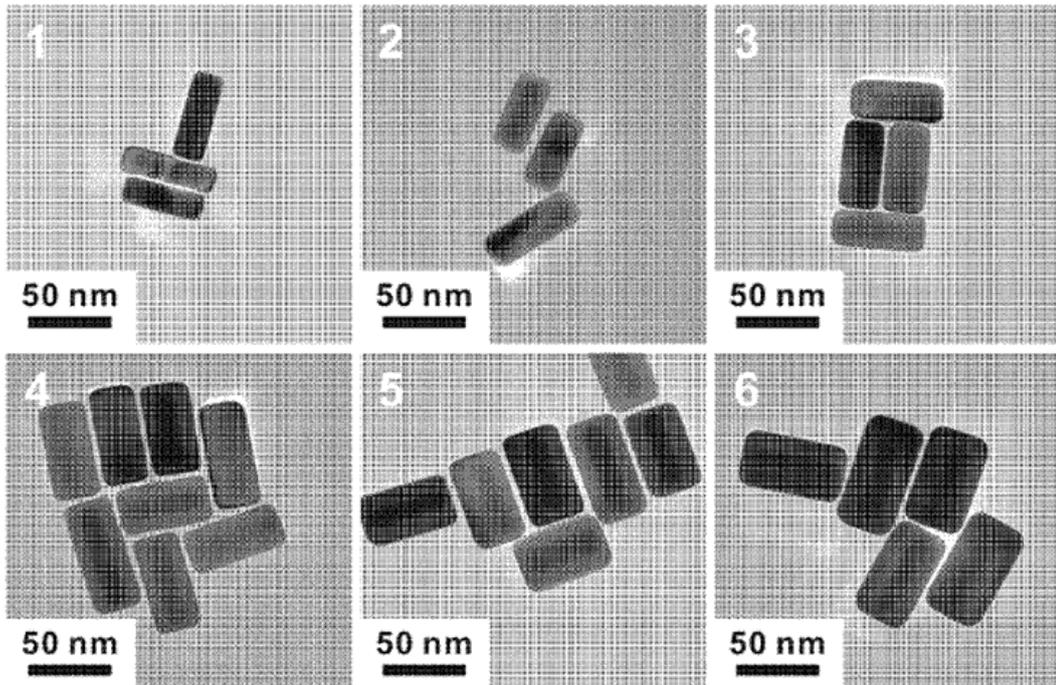


Dimensiones (nm)	50,32(4,26) x 12,81(0,94)
Relación de aspecto	3,95(0,42)
Modo transversal (nm)	510
Modo longitudinal (nm)	765
$\epsilon_{520\text{nm}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$1,374 \times 10^9$

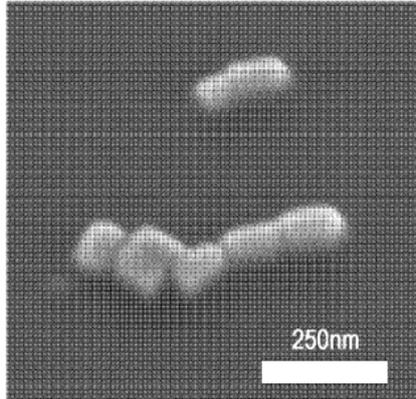
[Fig. 3]



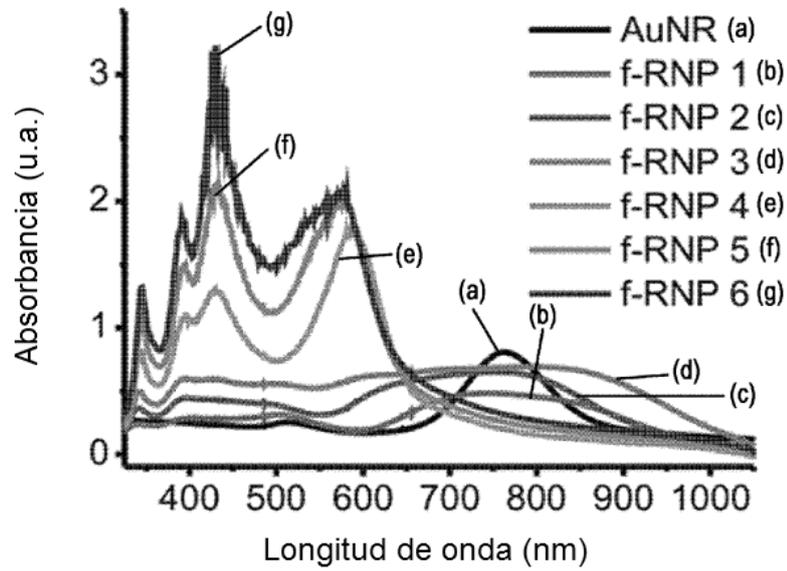
[Fig. 4a]



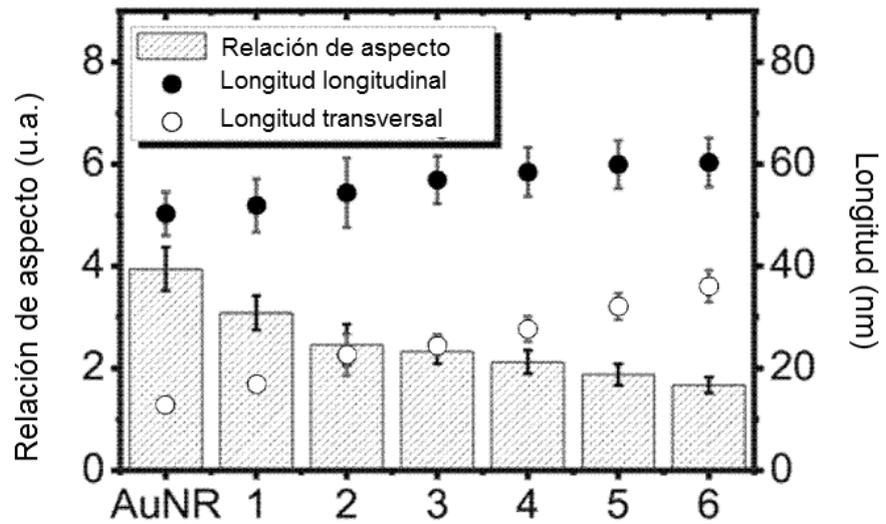
[Fig. 4b]



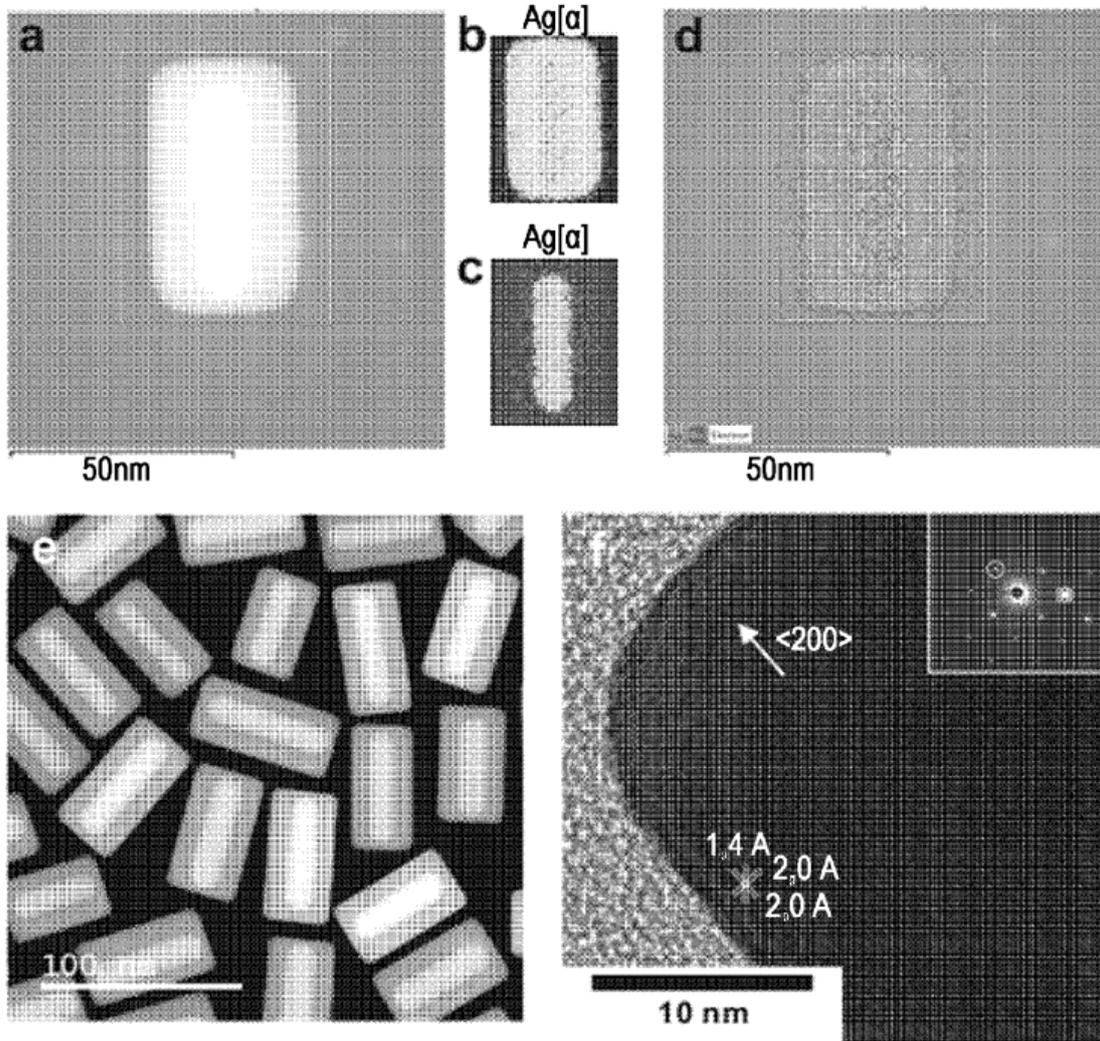
[Fig. 4c]



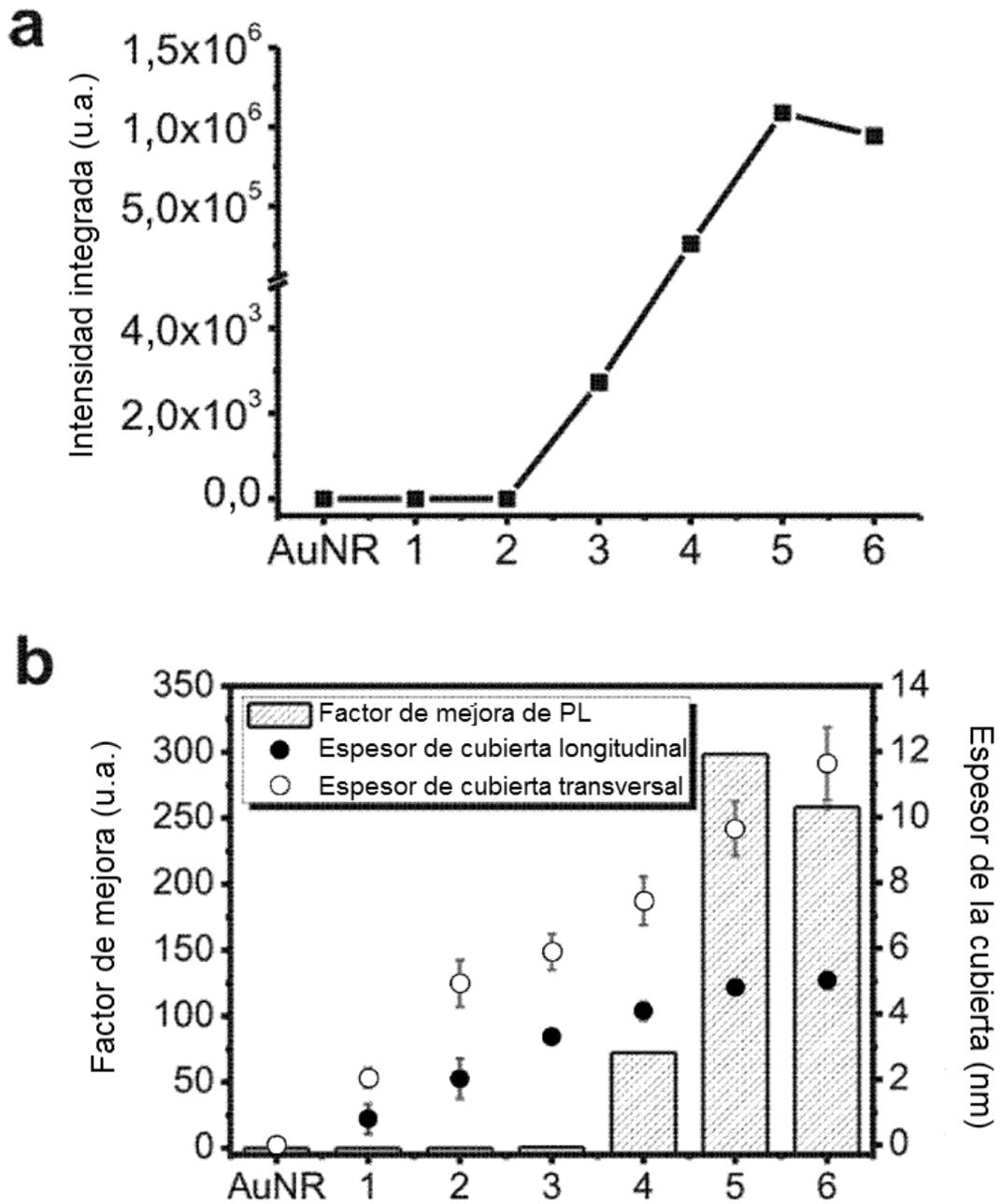
[Fig. 4d]



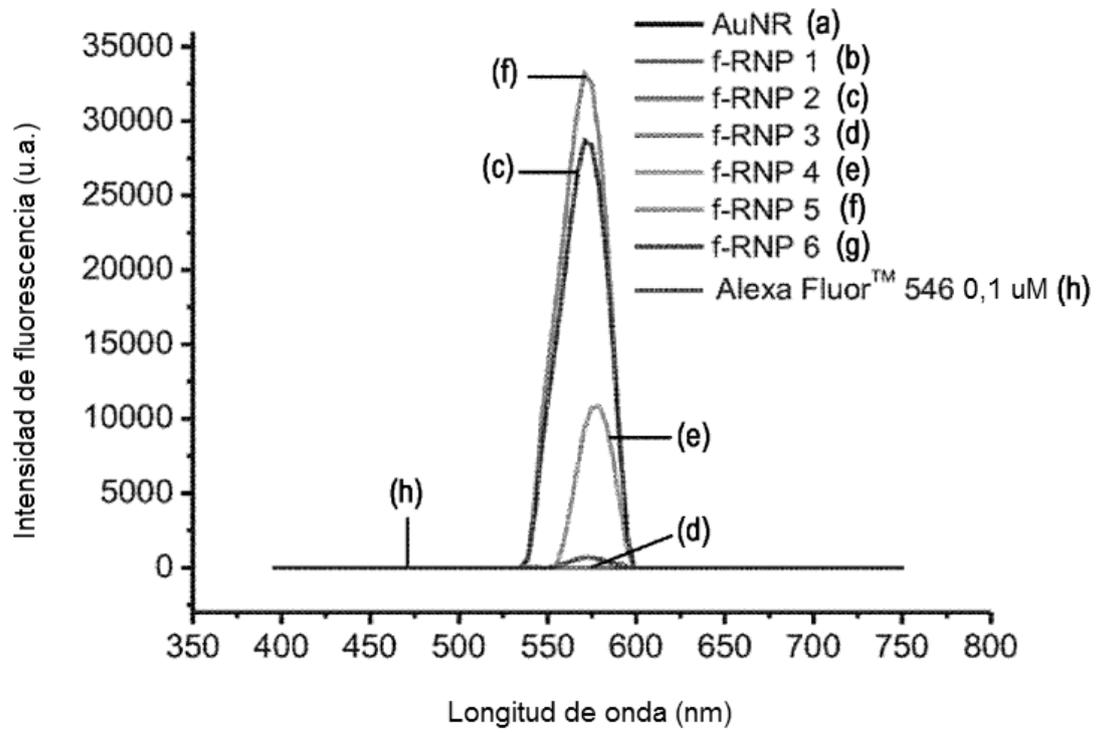
[Fig. 5]



[Fig. 6]

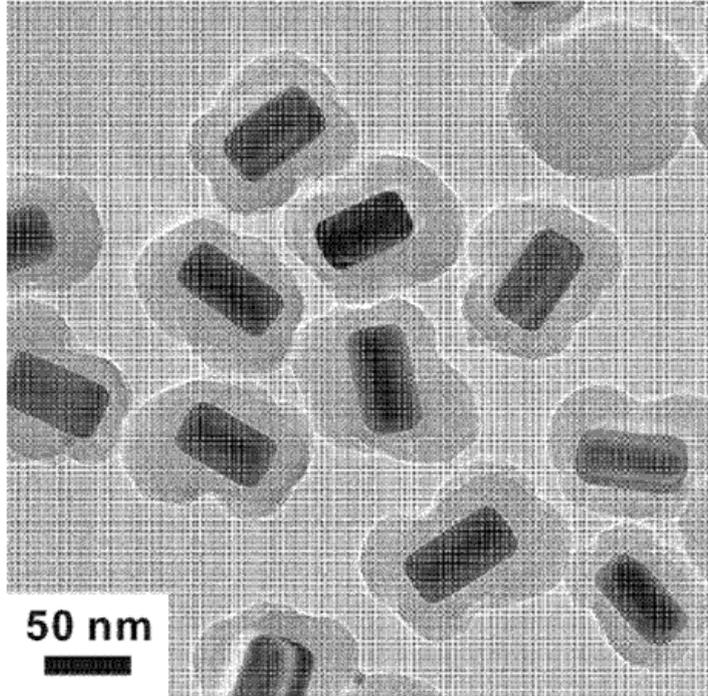


[Fig. 7]

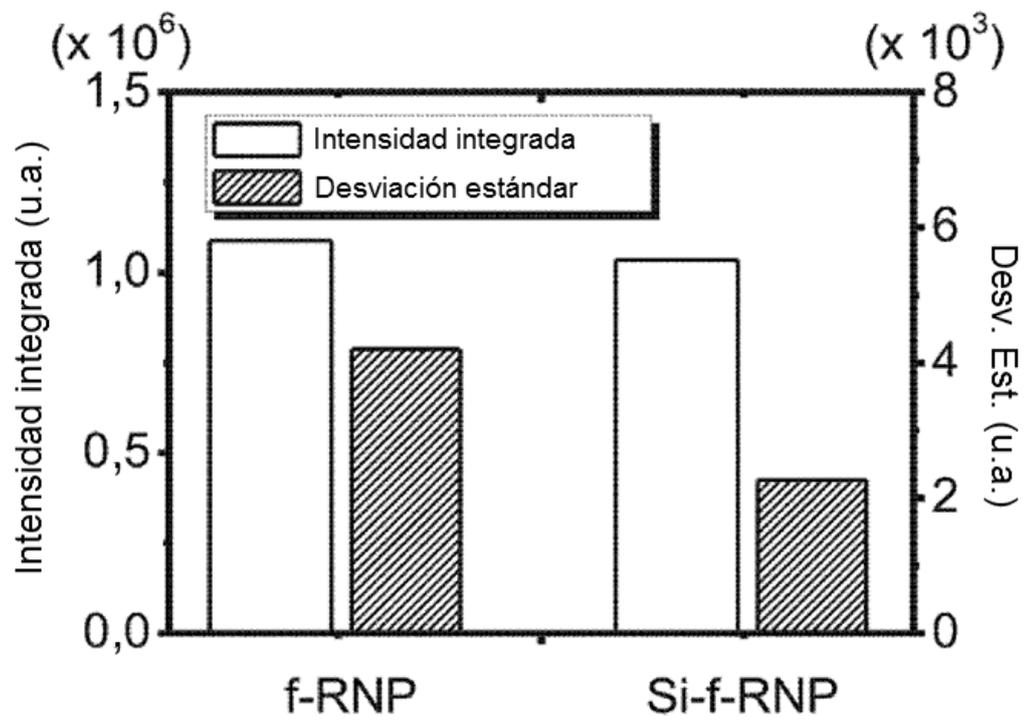


[Fig. 8]

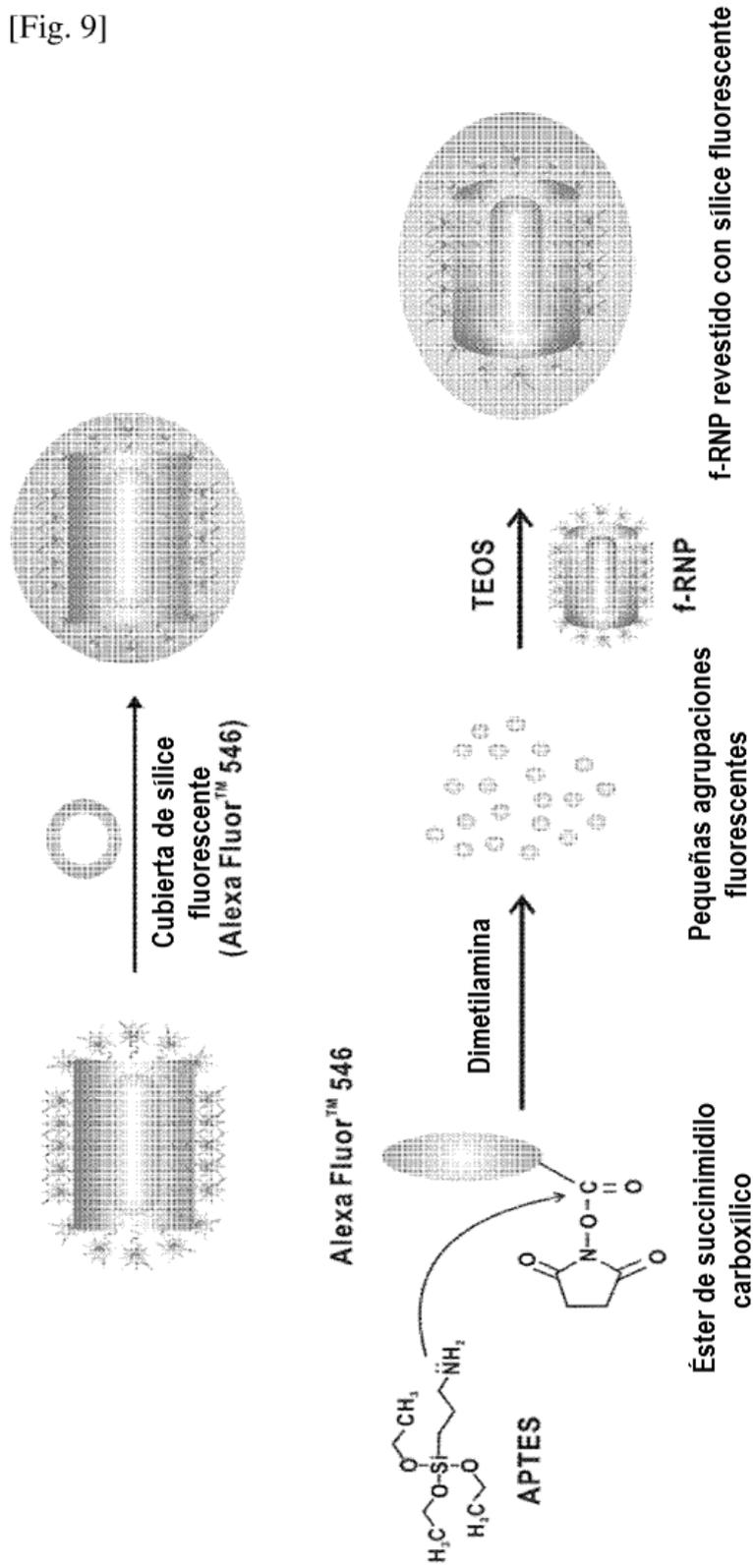
**a**



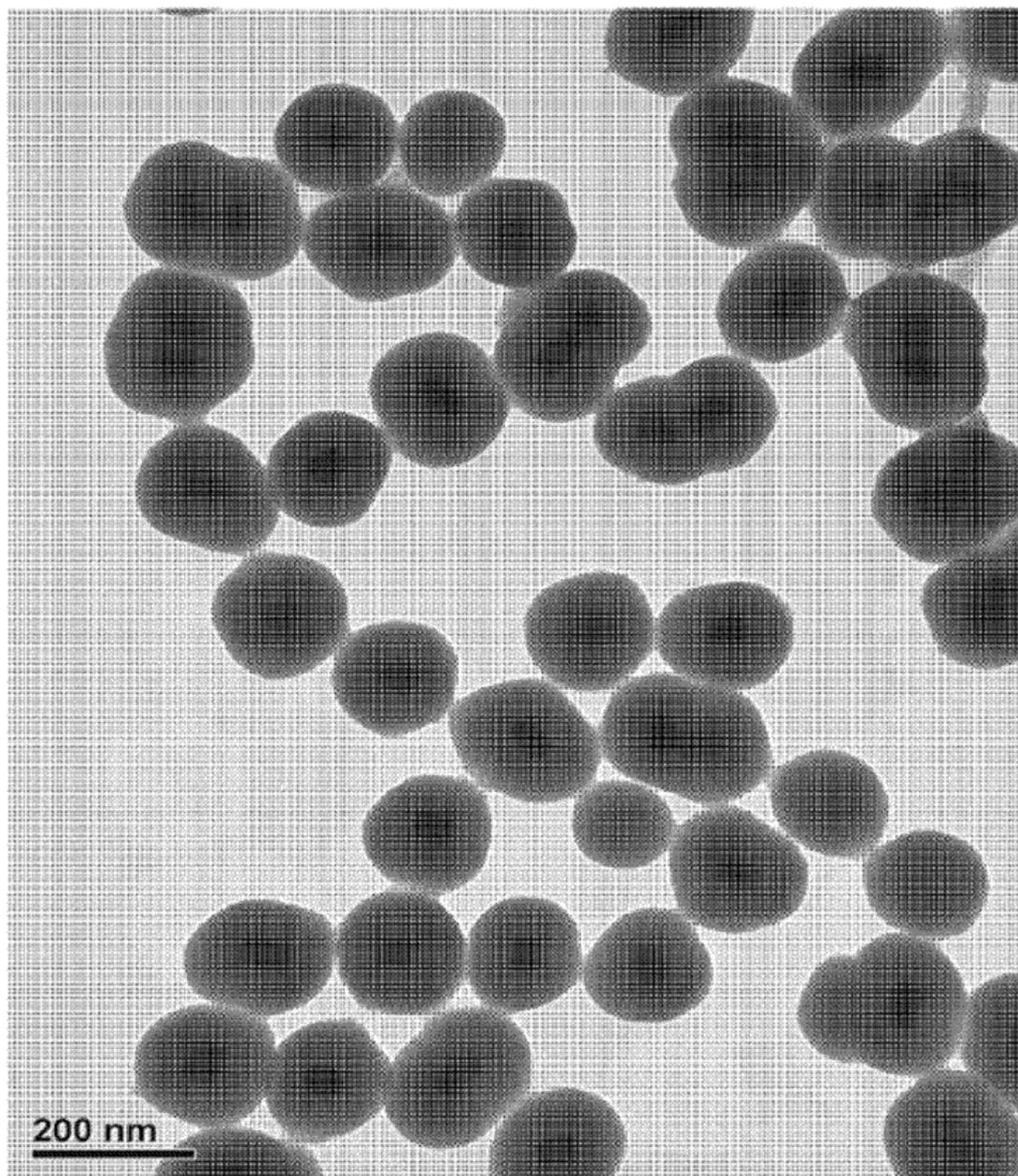
**b**



[Fig. 9]



[Fig. 10]



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- US 2013029360 A1 [0004]

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- HUI LI ; MIN WANG ; WEIBING QIANG ; HONGTING HU ; WEI LI ; DANKE XU. Metal-enhanced fluorescent detection for protein microarrays based on a silver plasmonic substrate. *Analyst*, 2014, vol. 139, 1653 [0004]