

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 457**

51 Int. Cl.:

C25D 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2005 PCT/US2005/013989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2006 WO06073439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2005 E 05856641 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 1749122**

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

30 Prioridad:

23.04.2004 US 565099 P

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

06.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NATAN, MICHAEL, J.;
PENN, SHARRON;
FREEMAN, GRIFFITH, R.;
CHAKAROVA, GABRIELA;
DOERING, WILLIAM, E. y
WALTON, IAN**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 752 457 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas compuestas activas espectroscópicamente potenciadas superficialmente

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a partículas o marcadores de tamaño submicrométrico que pueden fijarse de forma covalente o no covalente a entidades de interés con el fin de cuantificación, localización, identificación o seguimiento. Más particularmente, se refiere a nanopartículas compuestas activas espectroscópicamente potenciadas superficialmente, a métodos de fabricación de las partículas y a usos de las partículas.

Antecedentes de la invención

15 La fluorescencia es un medio primario mediante el que se rastrean y se cuantifican biomoléculas. Los marcadores fluorescentes se usan en la secuenciación del ADN, los análisis de expresión génica en los que se usan micromatrices, citometría de flujo y sus variantes, RT-PCR y muchas otras aplicaciones. Una aplicación de especial interés y de creciente importancia, es la formación de imágenes intracelulares. Las uniones/desunionen bimoleculares se han controlado mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), por lo que los cambios impulsados por eventos en la distancia entre un fluoróforo y un desactivador conducen a cambios en la intensidad de la fluorescencia. La unión covalente de fluoróforos con los marcadores de anticuerpos de superficie en los glóbulos blancos es la base de la citometría; asimismo, la unión covalente de marcadores fluorescentes se ha usado para visualizar cada orgánulo del interior de una célula, y prácticamente todos los procesos que experimentan las células. A pesar de sus numerosas ventajas, los fluoróforos orgánicos tienen varias limitaciones. (i) Son altamente susceptibles al fotoblanqueo y a la fotodescomposición, ya que los estados excitados son tanto mejores oxidantes como mejores reductores que el estado fundamental. (ii) La envoltura de emisión de fluorescencia es amplia, limitando el número de marcadores ortogonales espectralmente. (iii) La fluorescencia se excita normalmente en la región visible, una región en la que las muestras biológicas presentan fluorescencia intrínseca de fondo. (iv) Los diferentes colores de los fluoróforos suelen tener estructuras y propiedades químicas muy diferentes, que requieren diferentes protocolos de unión y manejo.

El desarrollo de semiconductores fluorescentes de nanopartículas (puntos cuánticos) ha ampliado la utilidad de los marcadores de detección óptica basada en la fluorescencia. (Chan, *et al.*, *Science* 1998, 281, 2016-18; Bruchez, *et al.*, *Science* 1998, 281, 2013-16). Los puntos cuánticos presentan un fotoblanqueo mucho menor que los fluoróforos orgánicos, y, en la región visible, tienen anchos de banda de emisión más estrechos. Una consecuencia de la envoltura de emisión más estrecha, no obstante, es la envoltura de excitación más estrecha en la región visible; como resultado de ello, se requiere luz ultravioleta para excitar múltiples marcadores, algo que no es óptimo para los sistemas biológicos. Además, los anchos de banda de los puntos cuánticos aumentan considerablemente a medida que las partículas emiten en la región del rojo y, en especial, en la del IR cercano, y por consiguiente, hay muchos menos colores disponibles. No obstante, los puntos cuánticos se han usado ampliamente para aplicaciones de formación de imágenes intracelulares, con resultados prometedores. Algunos informes recientes han usado puntos cuánticos para rastrear la unión y la endocitosis del factor de crecimiento epidérmico y para la formación de imágenes a largo plazo de los puntos cuánticos que se sometieron a endocitosis o se unieron a proteínas superficiales biotiniladas de células vivas. Sin embargo, la mayor parte de la bibliografía describe enfoques no dirigidos a la administración celular. Se usó un dominio de translocación peptídico para introducir diferentes proporciones de 5 colores de puntos cuánticos en subconjuntos de células para producir 10 códigos únicos. Diferentes informes describen el rastreo de células inyectadas en ratones tras su codificación mediante puntos cuánticos, incluyendo el uso de un reactivo de lipofección y de péptidos de transducción. También se rastreó el desarrollo de embriones de *Xenopus* tras la inyección de puntos cuánticos encapsulados en micelas. Desafortunadamente, los puntos cuánticos sometidos a endocitosis están secuestrados y no pueden participar en un marcaje intracelular adicional, y los puntos cuánticos administrados por transfección y electroporación son propensos a la agregación. La microinyección permite la administración de puntos cuánticos no agregados, pero se trata de un proceso en serie que requiere mucha habilidad. Además, la formación de imágenes a largo plazo con luz UV pueden generar la degradación de los puntos cuánticos, produciendo cambios espectrales y citotoxicidad. Análogamente, se ha descrito la introducción de nanopartículas metálicas en células. La síntesis de nanopartículas metálicas se describe en Sandrock M. L. *et al.* ("Synthesis and Second-Harmonic Generation Studies of Noncentrosymmetric Gold Nanostructures", *J Phys Chem. B.* vol. 103, 1999, páginas 2668-2673), que desvela un método de síntesis de estructuras de nanopartículas de oro a través de un procedimiento de síntesis en molde modificado. En 1990, se demostró con éxito la introducción de nanopartículas metálicas en células vivas, cuando se usó microscopía electrónica para examinar la captación nuclear de oro coloidal microinyectado en el citoplasma. (Feldherr, *et al.*, *J Cell Biol* 1990, 111, 1-8; Feldherr, *et al.*, *J Cell Biol* 1991, 115, 933-39). La técnica se avanzó usando microscopía de color potenciada por vídeo para rastrear la capacidad de dirección hacia el núcleo del oro coloidal modificado con péptidos. Varios informes han aprovechado la potente resonancia de plasmón de las nanopartículas de Ag y Au mediante su modificación con moléculas biológicas para rastrear la dinámica de la proteína transportadora de la membrana en células vivas en tiempo real. La ausencia de fotoblanqueo en ambas técnicas permite la formación de imágenes a largo plazo sin ninguna degradación de las partículas. En teoría, se pueden controlar el tamaño, la forma

y la composición de las partículas para permitir la realización de experimentos de formación de imágenes de resonancia de plasmones multiplexados, pero, en práctica, la anchura de las características, junto con la dificultad de hacer que todas las partículas tengan un tamaño determinado, reduce el número de colores a 2-3.

- 5 La dispersión Raman se excita fácilmente usando luz monocromática del rojo lejano o IR cercano, energías de fotones demasiado bajas para excitar la fluorescencia de fondo inherente en muestras biológicas. Dado que los espectros Raman normalmente cubren las energías vibratorias de 200-3.500 cm^{-1} , y dado que las vibraciones individuales normalmente tienen anchos de banda muy estrechos, es decir, $< 50 \text{ cm}^{-1}$, se podría prever la medición de una docena (o más) de indicadores simultáneamente, todo con una sola fuente de luz; sin embargo, el Raman normal es muy débil, lo que limita su utilidad en el uso en química bioanalítica. En la SERS, las moléculas muy cercanas a las características de rugosidad a nanoescala en superficies de metales nobles (oro, plata, cobre) dan lugar a aumentos de millones a billones de veces [conocidos como factor de potenciación (FP)] de la eficacia de dispersión. También se puede usar la SERS para detectar moléculas adsorbidas en nanopartículas metálicas individuales, y se ha usado para demostrar la detección de una sola molécula. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. US 2002/142480 A1 proporciona la preparación y el uso de partículas que tienen geometría de tipo sándwich para aplicaciones de SERS.

Sumario de la invención

- 20 En el presente documento, se describe un método que comprende: producir la deposición de un metal en un poro de un molde, cuyo diámetro de poro es inferior a 300 nm; producir la deposición de un segundo material en dicho poro de dicho molde, en donde la deposición de al menos uno de dicho primer material y dicho segundo material implica procesos electroquímicos faradaicos para generar una nanopartícula unida al poro, segmentada; repetir la deposición de un metal; y liberar dicho segundo material y dicho molde de dicha nanopartícula unida al poro, segmentada, para generar al menos dos nanopartículas metálicas libres. La presente invención también proporciona un método que comprende producir la deposición de un primer metal en un poro de un molde, cuyo diámetro de poro es inferior a 300 nm; producir la deposición de un segundo metal en dicho poro de dicho molde; producir la deposición de un tercer material en dicho poro de dicho molde, en donde la deposición de al menos uno de dicho primer material y dicho segundo material implica procesos electroquímicos faradaicos para generar una nanopartícula unida al poro, segmentada; repetir las etapas de deposición de un primer metal y de un segundo metal; y liberar dicho tercer material y dicho molde de dicha nanopartícula unida al poro, segmentada, para generar al menos dos nanopartículas metálicas libres, comprendiendo cada una dicho primer metal y dicho segundo metal.

- 35 En el presente documento, se describe un método que comprende, preparar una SACN optimizada, en donde dicha SACN optimizada se prepara mediante un método que comprende eliminar material unido irreversiblemente a la superficie de la partícula en el transcurso de la preparación de la SACN, en donde la señal de fondo de dicho espectro se reduce en comparación con un espectro generado por una SACN correspondiente que no está optimizada.

- 40 En el presente documento, se describe un método que comprende reducir la señal de fondo en un ensayo en el que se utiliza una partícula SACN, en donde dicha reducción comprende eliminar impurezas de un componente seleccionado del grupo que consiste en la muestra que se va a analizar, la partícula SACN y el recipiente de ensayo.

- 45 En el presente documento, se describe un método que comprende preparar una pluralidad de partículas SACN, comprendiendo cada una un marcador Raman diferente; medir la proporción de intensidad de los marcadores Raman; y preparar una segunda pluralidad de partículas SACN que tienen las intensidades de los marcadores normalizadas con respecto a la del marcador que tiene la intensidad más débil, preparándose así una pluralidad de SACN que tienen intensidades máximas esencialmente iguales en un espectro Raman. En algunas realizaciones, los marcadores se normalizan mediante la preparación de SACN con una cantidad reducida de marcador, en donde la cantidad reducida se define mediante la inversa de la proporción de la intensidad de ese marcador con respecto a la del marcador más débil. En otras realizaciones, los marcadores se normalizan mediante la preparación de SACN con una mayor cantidad de silano, en donde la cantidad aumentada se define mediante la inversa de la proporción de la intensidad de ese marcador con respecto a la del marcador más débil.

- 55 La presente invención proporciona una SACN que comprende una nanopartícula metálica anisotrópica, una molécula indicadora con actividad de SERS asociada a dicha nanopartícula metálica anisotrópica, SiO_2 encapsulando la nanopartícula metálica anisotrópica, en donde la molécula indicadora con actividad de SERS se encuentra en la superficie de contacto entre la nanopartícula metálica y el encapsulante. Opcionalmente, el encapsulante de SiO_2 comprende además un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo -SH, un grupo $-\text{NH}_2$ y un grupo $-\text{COO}^-$.

- 60 La presente divulgación también incluye un método que comprende: proporcionar una nanopartícula; asociar una molécula indicadora con actividad Raman con dicha nanopartícula; encapsular la nanopartícula con SiO_2 ; y modificar el SiO_2 para que porte un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo -SH, un grupo $-\text{NH}_2$ y un grupo $-\text{COO}^-$, mediante lo que se prepara una SACN activada.

- 65 En el presente documento, se describe una SACN bioconjugada que comprende: una nanopartícula; una molécula

indicadora con actividad Raman asociada a dicha nanopartícula; un encapsulante de SiO₂; y una biomolécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína y un ácido nucleico.

5 La presente invención también proporciona un método de detección de un analito que comprende: obtener una muestra biológica; y poner en contacto la muestra con una SACN bioconjugada como se reivindica en el presente documento, que comprende una biomolécula que se une al analito; y detectar el analito unido a dicha SACN bioconjugada.

10 La presente invención también proporciona un método que comprende; poner en contacto una muestra sospechosa de contener un analito con al menos una pareja de unión específica del analito en una superficie de ensayo de flujo lateral para unirse al analito en la muestra; anterior, simultánea o posteriormente a la etapa (a), unir al menos una pareja de unión del analito con una SACN como se reivindica en el presente documento; y detectar una señal de SERS mediante la que se determina la presencia del analito en la muestra por la intensidad o presencia de la señal, mediante lo que se determina la presencia de al menos un analito en la muestra.

15 La presente invención también proporciona un método que comprende, proporcionar un microscopio acoplado a una cámara CCD; proporcionar una célula; poner en contacto la célula con al menos una SACN como se define en las reivindicaciones adjuntas y capaz de unirse específicamente a la célula o a una parte de la célula; proporcionar un dispositivo de filtrado del número de onda entre la célula y la cámara; adquirir una pluralidad de conjuntos de datos; y ensamblar los conjuntos de datos; mediante lo que se adquiere un perfil espacial de la SACN.

20 En el presente documento, se describe una nanopartícula, una nanopartícula metálica; más de una molécula indicadora con actividad Raman asociada a dicha nanopartícula; y un encapsulante de SiO₂. En el presente documento, se describe un método que comprende: poner en contacto HAuCl₄ con clorhidrato de hidroxilamina; poner en contacto además la solución resultante de la etapa a) con una mezcla de citrato de sodio deshidratado y NaBH₄, mediante lo que se produce una nanopartícula de oro. En el presente documento, se describe un método que comprende proporcionar una nanopartícula de oro preparada mediante el método descrito anteriormente; asociar una molécula indicadora con actividad Raman con dicha nanopartícula; y encapsular la nanopartícula con SiO₂; mediante lo que se prepara una SACN. En el presente documento, se describe una nanopartícula que comprende: una nanopartícula metálica anisotrópica, una molécula indicadora con actividad de SERS asociada a dicha nanopartícula metálica anisotrópica; SiO₂ encapsulando la nanopartícula metálica anisotrópica.

25 En el presente documento, se describe un método que comprende: administrar un agente de formación de imágenes de nanopartículas SACN a un paciente, explorar al paciente usando un sistema que pueda formar imágenes espectrales; y generar un espectro o una imagen de una región interna del paciente. En el presente documento, se describe un método que comprende: introducir una pluralidad de SACN dirigidas a una molécula implicada en una patología anómala en un paciente con la patología anómala, en donde las SACN se asocian a una molécula asociada con la patología anómala; y obtener una imagen de las SACN asociadas, mediante lo que se puede diagnosticar una patología anómala.

30 En el presente documento, se describe un método para marcar un animal con una SACN, que comprende introducir una SACN en un animal, en donde dicha introducción se selecciona del grupo que consiste en implantación subcutánea, introducción intravenosa. En el presente documento, se describe un método que comprende poner en contacto una muestra de tejido con al menos una partícula SACN conjugada con una biomolécula capaz de unirse específicamente a la muestra de tejido; y (b) adquirir una imagen Raman de la mezcla de tejido y partículas de SACN conjugadas con biomoléculas.

35 En el presente documento, se describe una nanopartícula, que comprende una nanopartícula de núcleo/cubierta, al menos una molécula indicadora con actividad Raman asociada a dicha nanopartícula de núcleo/cubierta y un encapsulante de SiO₂.

40 En el presente documento, se describe un método que comprende producir la deposición de un metal en un poro de un molde, cuyo diámetro de poro es inferior a 300 nm; producir la deposición de un segundo material en dicho poro de dicho molde, en donde la deposición de al menos uno de dicho primer material y dicho segundo material implica procesos electroquímicos faradaicos para generar una nanopartícula unida al poro, segmentada; repetir la etapa de deposición del metal; y liberar dicho segundo material y dicho molde de dicha nanopartícula unida al poro, segmentada, con tratamiento ácido para generar al menos dos nanopartículas metálicas libres porosas.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un espectro Raman típico.

La Figura 2 muestra una comparación de las SACN realizada con cinco moléculas marcadoras diferentes. De arriba a abajo: quinolin-tiol, isotiocianato verde de malaquita, mercaptobenzamidazol, bis(4-piridil)etileno, Bodipy.

La Figura 3 muestra la intensidad de la dispersión frente al desplazamiento Raman para PVDF, nitrocelulosa y una membrana de flujo lateral.

La Figura 4 muestra la intensidad de la dispersión frente al desplazamiento Raman para superficies de vidrio y

cuarzo.

La Figura 5 muestra una imagen de TEM de nanobarras preparadas en un método basado en solución.

La Figura 6 muestra los espectros de SERS de SACN de 4-MP/BPE obtenidos usando excitación de 633 nm (Rastro A) y excitación de 785 nm (Rastro B).

5 La Figura 7 muestra los espectros Raman de SACN de BPE (línea discontinua) y SACN de 4-MP (línea continua).

La Figura 8 muestra el número de moléculas de biotina unidas a nanopartículas conjugadas con proporciones variables de NeutrAvidin™ y albúmina de suero bovino (BSA).

10 La Figura 9 muestra la linealidad de las SACN midiendo la señal tras la exposición de una muestra a diferentes cantidades de potencia de excitación.

La Figura 10 muestra la señal de una muestra en función del tiempo para una SACN expuesta a la luz emitida.

La Figura 11 muestra evidencia de reproducibilidad de lote a lote para la preparación de SACN.

15 La Figura 12A muestra espectros Raman obtenidos a 633 nm de excitación de partículas de Au de 65 x 30 nm y de 90 x 30 nm liberadas en QSH. La Figura 12B muestra espectros Raman obtenidos a 785 nm de excitación de partículas de Au de 65 x 30 nm y 90 x 30 nm liberadas en QSH.

La Figura 13 muestra espectros Raman obtenidos a 633 nm de excitación de partículas de Au de 65 x 30 nm y 90 x 30 nm liberadas en MP.

La Figura 14A muestra una imagen de TEM de nanobarras de Au con 35 nm de diámetro liberadas en ME. La

20 Figura 14B muestra un espectro Raman obtenido a 633 nm de excitación, reemplazando ME por QSH.

Las Figuras 15A y B muestran imágenes de SEM de SACN de Au de 250 nm x 250 nm.

Las Figuras 16A y B muestran imágenes de TEM de una SACN de Au de 250 nm x 250 nm.

Las Figuras 17A y B muestran espectros Raman de SACN de Au de 250 nm x 250 nm a 785 nm y 633 nm de excitación.

25 La Figura 18 muestra los resultados de un experimento de inmunoensayo de tipo sándwich de micromatrices de proteínas en el que se valoró la IL-7.

La Figura 19 muestra los resultados de un inmunoensayo de flujo lateral para la Tox. Bot.

La Figura 20 muestra la intensidad de la dispersión frente al desplazamiento Raman a una excitación de 758 nm para sangre completa sin y con SACN.

30 La Figura 21A muestra imágenes del campo brillante y de SERS de célula marcada con SACN, y la Figura 21B muestra espectros Raman de manchas no tratadas y tratadas en un ensayo de histopatología.

La Figura 22 muestra un espectro adquirido sobre el hígado 45 minutos después de que se inyectaron SACN en la cola del ratón.

La Figura 23 muestra un espectro adquirido tras la inyección de SACN por vía subcutánea.

35 Descripción de la invención

Las nanopartículas compuestas activas espectroscópicamente potenciadas superficialmente se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.514.767, titulada "Surface Enhanced Spectroscopy-Active Composite Nanoparticles", en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/345.821, presentada el 16 de enero de 2003, titulada, "Surface Enhanced Spectroscopy-Active Composite Nanoparticles", y en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 60/557.729, presentada el 29 de marzo de 2004, titulada "Surface Enhanced Spectroscopy-Active Composite Nanoparticles".

45 La presente invención describe nuevos métodos de preparación de nanopartículas compuestas activas espectroscópicamente potenciadas superficialmente (SACN) y métodos de preparación de SACN mejoradas. Cada una de dichas nanopartículas comprende una nanopartícula metálica con actividad de SES, un submonocapa, monocapa o multicapa de especies activas espectroscópicamente muy cerca de la superficie metálica y una cubierta de encapsulación que comprende un polímero, vidrio (SiO₂) o cualquier otro material dieléctrico. Esto coloca la molécula activa espectroscópicamente (denominada en el presente documento "indicador") en la superficie de contacto entre la nanopartícula metálica y el encapsulante. Por ejemplo, una SACN comprende (i) un núcleo de nanopartícula metálica (por ejemplo, Au o Ag), (ii) un indicador con actividad Raman, que proporciona un distintivo vibratorio único, e (iii) un encapsulante de SiO₂ que "bloquea" las moléculas indicadoras en su sitio y, al mismo tiempo, proporciona una superficie altamente compatible para la inmovilización posterior de biomoléculas. El recubrimiento de vidrio, que carece esencialmente de actividad de SERS, también estabiliza las partículas contra la agregación y evita la adsorción competitiva de especies no deseadas. En algunas realizaciones, el indicador y el encapsulante se introducen en el núcleo de la nanopartícula secuencialmente. En algunas realizaciones, el encapsulante comprende la molécula indicadora. En algunas realizaciones, la SACN comprende además recubrimientos poliméricos adyacentes a la nanopartícula.

60 El núcleo de la nanopartícula puede ser cualquier nanopartícula conocida en la técnica. Como se usa en el presente documento, los términos "nanopartícula", "nanoestructura", "nanocristal", "nanomarcador" y "nanocomponente" se usan indistintamente para referirse a una partícula, en general, una partícula metálica, que tiene una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1.000 nm, incluyendo cualquier valor entero entre 1 nm y 1.000 nm. Las nanopartículas anisotrópicas pueden tener una longitud y una anchura. En algunas realizaciones, la longitud de una nanopartícula anisotrópica es la dimensión paralela a la abertura en la que se produjo la nanopartícula. En el caso de las nanopartículas anisotrópicas, en algunas realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro (anchura) de 350 nm o inferior. En otras realizaciones, la nanopartícula tiene un diámetro de 250 nm o

inferior y, en algunas realizaciones, un diámetro de 100 nm o inferior. En algunas realizaciones, la anchura es de entre 15 nm y 300 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula tiene una longitud de aproximadamente 10-350 nm.

- 5 Las nanopartículas incluyen nanobarras metálicas huecas o rellenas coloidales, nanopartículas magnéticas, paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas, hidrogeles (coloides o barras) y similares. Un experto en la materia apreciará que las nanopartículas pueden existir en una variedad de formas, incluyendo, entre otras, esféricas, barras, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanomuelles, nanoanillos, nanopartículas en forma de barra, 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. Otra clase de nanopartículas que se ha descrito incluyen aquellas con área superficial interna. Estas incluyen partículas huecas y partículas porosas o semiporosas. Además, se entiende que los métodos de preparación de partículas de estas formas, y en ciertos casos, de preparación de partículas con actividad de SERS de estas formas, se han descrito en la bibliografía. Si bien se reconoce que la forma y la relación de aspecto de las partículas pueden afectar a las características físicas, ópticas y electrónicas de las nanopartículas, la forma específica, la relación de aspecto o la presencia/ausencia de área superficial interna no influyen en la calificación de una partícula como nanopartícula.

20 Gran parte de la bibliografía relativa a la SERS (tanto experimental como teórica) sugiere que las partículas anisotrópicas (barras, triángulos, prismas) pueden proporcionar una mayor mejora en comparación con las esferas. Por ejemplo, el denominado "efecto de antena" predice que se espera que la potenciación Raman sea mayor en las áreas de mayor curvatura. Recientemente, se han descrito muchos informes de partículas anisotrópicas, incluyendo prismas de Ag y partículas de Au "ramificadas". Dichas partículas anisotrópicas, usadas como componentes básicos para la formación de las SACN, están dentro del alcance de la invención.

25 Se pueden producir nanobarras anisotrópicas de Au y Ag mediante electrodeposición en moldes de alúmina preformados, de manera similar a la producción de partículas Nanobarcodes®. Véase, por ejemplo, Nicewarner-Peña, S. R.; Freeman, R. G.; Reiss, B. D.; He, L.; Peña, D. J.; Walton, I. D.; Cromer, R.; Keating, C. D.; Natan, M. J. "Submicrometer metallic barcodes", *Science* 2001, 294, 137-141.; Walton, I. D.; Norton, S. M.; Balasingham, A.; He, L.; Ovisio, D. F. J.; Gupta, D.; Raju, P. A.; Natan, M. J.; Freeman, R. G. "Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy", *Anal. Chem.* 2002, 74, 2240-2247. Estas partículas Nanobarcodes se preparan mediante la deposición de capas alternas de materiales, normalmente, Au y Ag, en moldes de alúmina preformados. En una realización típica, las partículas Nanobarcodes tienen aproximadamente 250 nm de diámetro y 6 micrómetros de longitud.

35 Para la fabricación de nanopartículas metálicas para su uso en SACN, se puede llevar a cabo la electrodeposición en poros de menor diámetro, como se ha descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 10. En algunas realizaciones, el diámetro del poro es inferior a 100 nm y, en algunas realizaciones, es de entre 10 y 50 nm. Son varios los grupos de investigación que han informado sobre moldes uniformes de alúmina con estas dimensiones. Dichos moldes se encuentran actualmente disponibles en el mercado. Así pues, en una realización, la invención proporciona un método que comprende producir la deposición de un metal en un poro de un molde, cuyo diámetro de poro es inferior a 300 nm; producir la deposición de un segundo material en dicho poro de dicho molde, en donde la deposición de al menos uno de dicho primer material y dicho segundo material implica procesos electroquímicos faradaicos para generar una nanopartícula unida al poro, segmentada; producir nuevamente la deposición de un metal en el poro; y liberar el segundo material y el molde de dicha nanopartícula unida al poro, segmentada, para generar al menos dos nanopartículas metálicas libres. En esta realización, la nanopartícula segmentada unida al poro tiene la composición ABA, y tras la liberación de B y del molde, se producen dos partículas de A. Las deposiciones pueden repetirse para generar segmentos que tengan la composición $(AB)_n$ o $A(BA)_n$, en donde n es cualquier número entero entre 1 y 1.000, y tras liberarse del molde, se producen n o n + 1 partículas de A.

50 En una realización, las SACN preparadas mediante este método tienen aproximadamente 250 nm de diámetro y 250 nm de longitud. En el Ejemplo 10B, se describe un ejemplo de este método. Las Figuras 15A y B muestran una vista de las SACN preparadas mediante este método. Si bien estas partículas parecen tener forma de barra, una vista más cercana, mostrada en las Figuras 16A y B, revela que tienen una forma no geométrica. Se cree que la forma no geométrica se debe a la falta de una superficie de contacto lisa entre el metal (por ejemplo, Au) y el material que se va a liberar (por ejemplo, Ag) en la preparación de las partículas. La falta de una superficie de contacto lisa puede deberse a la interdifusión de los dos metales para formar aleaciones y a la posterior desaleación durante el etapa de liberación. Estas partículas no geométricas son útiles para la SERS, como se muestra en las Figuras 17A y B. La deposición simultánea deliberada de Au y Ag (por ejemplo, Au:Ag a 80:20) conducirá a una aleación significativa, y la posterior disolución de la Ag inducida por el ácido puede conducir a superficies muy picadas que presenten una considerable área superficial interna. En la medida en que las moléculas indicadoras puedan acceder a dichos sitios internos, experimentando así los intensos campos electromagnéticos entre las nanoestructuras con actividad de SERS, dichas superficies pueden presentar un mejor comportamiento de SERS.

65 La invención también describe un método que comprende producir la deposición de un primer metal en un poro de un molde, cuyo diámetro de poro es inferior a 300 nm; producir la deposición de un segundo metal en dicho poro de dicho molde; producir la deposición de un tercer material en dicho poro de dicho molde, en donde la deposición de al

- menos uno de dicho primer material y dicho segundo material implica procesos electroquímicos faradaicos para generar una nanopartícula unida al poro, segmentada; repetir las etapas de producir la deposición del primer y del segundo metal; y liberar dicho tercer material y dicho molde de dicha nanopartícula unida al poro, segmentada, para generar al menos dos nanopartículas metálicas libres, comprendiendo cada una dicho primer metal y dicho segundo metal. En este ejemplo, la nanopartícula segmentada unida al poro tiene la composición ACBAC, y tras la liberación de B y del molde, se producen dos partículas de AC. Se pueden repetir las deposiciones para generar segmentos que tengan la composición (ACB)_n, en donde n es cualquier número entero entre 1 y 1.000, y tras liberarse del molde, se producen n partículas de AC. En algunas realizaciones, uno de los metales es magnético.
- 10 El metal incluye al menos un elemento seleccionado de la Tabla Periódica de los Elementos que comúnmente se conocen como metales. El metal puede incluir principalmente un solo elemento. Como alternativa, el metal puede ser una combinación de al menos dos elementos, tal como una aleación, por ejemplo, una aleación binaria. Los metales incluyen metales del Grupo 11 (Cu, Ag y Au), o cualquier otro metal conocido por los expertos en la materia para soportar la SERS.
- 15 En algunas nanopartículas descritas en el presente documento, el metal incluye un componente adicional, tal como en una partícula de núcleo-cubierta de Au₂S/Au. Se ha informado que las partículas de núcleo-cubierta de Au₂S/Au tienen una resonancia óptica del IR cercano ampliamente sintonizable. (Averitt, *et al.*, octubre de 1999, JOSA B, Volumen 16, Número 10, 1824-1832.) Como alternativa, se pueden usar partículas de núcleo de Ag/cubierta de Au, como las descritas en *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7961, o partículas de núcleo de Au/cubierta de Ag, o cualquier combinación de núcleo-cubierta en la que participen metales con actividad de SERS. En el presente documento, también se describen otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas de núcleo-cubierta, tales como coloides de sílice/alúmina funcionalizados con nanopartículas de Au o Ag, coloides de TiO₂ funcionalizados con Au o Ag, nanopartículas de Au tapadas con nanopartículas de Au (véase, por ejemplo, Mucic, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12674), coloides de TiO₂ tapados con nanopartículas de Au, partículas que tienen un núcleo de Si con una cubierta metálica ("nanocubiertas"), tales como los coloides de SiO₂ tapados con plata o coloides de SiO₂ tapados con oro. (Véase, por ejemplo, Jackson, *et al.*, 2004 *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 101(52):17930-5). También se pueden usar nanopartículas huecas tales como nanoesferas huecas y nanocristales huecos en las SACN. Por consiguiente, la presente invención también describe una nanopartícula para su uso en una SACN que comprende una partícula de núcleo-cubierta con actividad de SERS o una nanopartícula hueca con actividad de SERS. La señal de SERS mejorada de estas partículas puede demostrarse fabricando lotes de estas partículas siguiendo un procedimiento de la bibliografía y comparando la señal de SERS con las partículas metálicas descritas en el presente documento.
- 30 En la patente de EE.UU. n.º 6.514.767, se describen métodos de preparación de SACN. En el presente documento, se describen métodos adicionales, incluidos en el apartado de ejemplos. Las SACN a las que se hace referencia en el presente documento son fotoestables (no presentan el blanqueo de la señal), térmicamente estables, muestran linealidad de la señal y presentan reproducibilidad de lote a lote, como se explica en el Ejemplo 8.
- 40 Los ejemplos de indicadores con actividad Raman adecuados para su uso en la presente invención incluyen 4-mercaptopiridina (4-MP); *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE); quinolin-tiol; 4,4'-dipiridilo, 1,4-fenildiisocianuro; mercaptobenzamidazol; 4-cianopiridina; yoduro de 1',3,3,3',3'-hexametilindotricarbocianina; 3,3'-dietiltiatricarbocianina; isotiocianato de verde malaquita; bis-(piridil)acetilenos; y Bodipy. En la Figura 2, se muestran los datos de 5 indicadores diferentes. Es evidente que los espectros son distintos y que, para cada especie, hay al menos una banda que es única. A continuación, se describen características adicionales de los indicadores con actividad Raman adecuados.
- 45 En una realización, la invención proporciona una SACN que comprende más de un indicador. En el Ejemplo 3, se describe la preparación de una de dichas SACN. En una realización, la SACN comprende un núcleo de nanopartícula metálica, un indicador de *trans*-1,2-bis(4-piridil)etileno y un indicador de 4-mercaptopiridina.
- 50 Hay una señal de fondo asociada a sustratos de SERS que normalmente está ausente en el Raman normal. La presente invención también proporciona métodos de reducción de la señal de fondo de las SACN, así como SACN mejoradas que presentan señales de fondo reducidas. La Figura 1, por ejemplo, la señal de fondo a 1.600 cm⁻¹ es de ~7.000 recuentos, mientras que la señal S es de ~11.000 recuentos por encima del fondo. Si las mediciones están limitadas por el ruido del disparo (N) [N = fondo^{1/2}], la S/N = 130:1, pero los máximos restantes del espectro son significativamente más bajos. La reducción del fondo en un factor de 2,25 conduciría a una mejora del 50 % en la S/N, lo que, a su vez, ayudaría a resolver las señales débiles y, en general, mejoraría la distinción de los diferentes espectros. Por lo tanto, la presente invención describe métodos que comprenden reducir la señal de fondo en un ensayo en el que se utiliza una partícula SACN, en donde dicha reducción comprende eliminar impurezas con una potente actividad de SERS de un componente seleccionado del grupo que consiste en la muestra que se va a analizar, la partícula SACN y otros tampones o materiales relacionados implicados en un ensayo. Se sabe que las impurezas traza (incluso las presentes en los reactivos usados para fabricar Au coloidal) pueden adsorberse irreversiblemente en la superficie de la partícula. Por consiguiente, la purificación rigurosa de todos los materiales, y, en especial, del indicador, usando ultrafiltración, HPLC, destilación, sublimación y/o recristalización pueden reducir la señal de fondo.
- 60
- 65

Por ejemplo, en el caso de un inmunoensayo de flujo lateral, los sustratos comunes son PVDF (difluoruro de polivinilideno) y nitrocelulosa. Se ha encontrado que la nitrocelulosa es deseable en términos de fondo de Raman por dos razones. En primer lugar, el PVDF presenta cierta autofluorescencia, como lo indica la caída en el fondo tras 2 minutos de exposición continua a la fuente de excitación (láser de 785 nm, aproximadamente 200 mW de potencia en la muestra) en la Figura 4. Aunque hay pocas características Raman en el fondo, la variabilidad en la intensidad es más difícil de tratar que los máximos pequeños. Incluso después de esta disminución, el fondo global es mayor que el obtenido de dos fuentes de nitrocelulosa separadas, no mostrando ninguno de ellos cambios fotoinducidos en la emisión Raman sobre iluminaciones prolongadas. En la Figura 4, se ve un fenómeno similar, que muestra que el vidrio tiene un fondo Raman débil, pero medible, cuando se excita con una luz de 785 nm. Los espectros Raman se adquirieron de portaobjetos de vidrio obtenidos de dos proveedores separados. Se usó un tiempo de integración de 1 segundo para cada adquisición, mientras que se usó un tiempo de integración de 5 segundos para obtener el fondo Raman de un portaobjetos de cuarzo. El portaobjetos de cuarzo apenas es reconocible por encima del valor basal, mientras que cada portaobjetos de vidrio tiene niveles medibles de fondo. Aunque el fondo se puede sustraer de los espectros, la presencia de fondo medible limita los tiempos de integración y puede dificultar la detección de trazas de indicadores Raman.

En otra ilustración de este efecto, se puede comparar el fondo de las partículas elaboradas con reactivos altamente purificados con los de una composición idéntica elaborada con reactivos "como se adquirieron". Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de reducción de la señal de fondo en un espectro Raman generado por SACN, que comprende preparar una SACN optimizada, en el que dicha SACN optimizada comprende una molécula indicadora, y en el que dicha molécula indicadora se purifica antes de su incorporación a la SACN optimizada; y generar un espectro Raman con dicha SACN optimizada, en donde la señal de fondo de dicho espectro se reduce en comparación con un espectro generado por una SACN correspondiente que no está optimizada.

En algunas realizaciones, las SACN mejoradas de la presente invención proporcionan una señal de SERS aumentada en comparación con las SACN conocidas. Para ciertos tamaños y formas de partículas, y en ciertas longitudes de onda de excitación, las partículas de Ag suelen proporcionar una señal de SERS mayor que las partículas de Au. Cabría esperar que la mejora de la reproducibilidad de la síntesis de coloides de Au produjera mejores SACN candidatas. Por consiguiente, la presente invención describe métodos de mejora de la síntesis de coloides de Au. En el Ejemplo 2, se describe un ejemplo de dicho método. Este método usa una combinación de NaBH_4 , citrato de Na_3 y NH_2OH para la reducción de metales. El método mejorado es más fácil y produce más partículas monodispersas en comparación con otros métodos (tales como la síntesis tradicional de Au coloidal usando solo citrato como reductor).

En ciertos casos, se prepara una nanopartícula para su uso en una SACN mediante un método que comprende depositar un recubrimiento de submonocapa de Ag sobre la superficie de una nanopartícula de Au, como en Freeman, *et al.*, *Journal of Physical Chemistry* (1996), 100(2), 718-24. Se espera que una SACN que incluya dicha nanopartícula recubierta pueda usarse para aumentar la señal de SERS de las nanopartículas esféricas en aproximadamente el doble.

La invención desvela además métodos de optimización de la carga del indicador y el recubrimiento de SiO_2 en las SACN. Para cada indicador incorporado con éxito a una SACN, es deseable determinar las condiciones en las que la cantidad máxima de indicador está presente en la superficie metálica antes de completarse la cubierta de SiO_2 .

En algunas realizaciones, las SACN se preparan con moléculas precursoras de SiO_2 que también pueden proporcionar la fracción de marcador Raman. Este método debería ayudar a aumentar la señal de SERS de la SACN. Por ejemplo, el 4-propilpiridintrimetoxisilano puede proporcionar el indicador Raman (el grupo piridilo) y actuar como un precursor de SiO_2 a través del trimetoxisilano. Debido a que el precursor de SiO_2 y el marcador no tendrán que competir por el espacio en la partícula de Au, debería lograrse una mayor cobertura superficial del marcador. Los silanos disponibles en el mercado, por ejemplo, son una fuente lista de silanos que pueden ser aplicables como indicadores/precursores unimoleculares. Los ejemplos de silanos incluyen 3-(2,4-dinitrofenilamino)propiltrióxisilano, 2-cianoetiltrimetoxisilano y *p*-aminofeniltrimetoxisilano, *n*-(3-trietoxisililpropil)-4,5-dihidroimidazol.

En otra realización, se recubre una nanopartícula con un polímero con actividad Raman, tal como un copolímero de poliestireno adecuado, un poliacetileno o politiofeno. Dichos polímeros pueden contener convenientemente grupos reactivos, tales como aminos o tioles, para facilitar la bioconjugación (véase más abajo) o para la unión de precursores de SiO_2 .

Para generar SACN de un diámetro mínimo, se puede reducir el espesor del SiO_2 . En realizaciones típicas, el espesor de la cubierta de SiO_2 varía de 1-40 nm. En algunas realizaciones, el encapsulante de SiO_2 tiene un espesor de 5-15 nm. Si bien, en teoría, es posible hacer que la cubierta de SiO_2 tenga cualquier espesor arbitrario, esto puede ser a expensas de mantener la integridad del recubrimiento. En algunas realizaciones, es importante que la cubierta de SiO_2 (i) proteja el núcleo metálico y las moléculas marcadoras Raman del ataque; (ii) evite la adsorción de posibles interferencias espectrales en la superficie del metal; (iii) proporcione una superficie de SiO_2 para la

biofuncionalización; y/o (iv) prevenga la agregación inducida por las fuerzas de Van der Waals entre los núcleos metálicos.

Se pueden preparar SACN con intensidad de señal mejorada en comparación con las SACN basadas en nanopartículas esféricas usando nanobarras de Au o Ag monocristalinas. Las condiciones de electrodeposición (sobrepotencial, temperatura, aditivos, etc.) determinan la estructura de los nanobarras que, a su vez, determina las propiedades físicas y mecánicas de los nanobarras. La señal de SERS de las nanobarras puede aumentarse significativamente si son monocristalinas. En general, se sabe que el mecanismo epitaxial de nucleación/crecimiento bidimensional (2D) requiere la electrodeposición a muy bajo sobrepotencial. Recientemente, se consiguió la electrodeposición de nanoalambres de Cu, Ag y Au monocristalinos con una concentración reducida de iones metálicos, un bajo sobrepotencial, una temperatura elevada y la adición de tensioactivo a la solución de metalizado. Wang, *et al.*, *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 841-845; Tian, *et al.*, *Nano Lett.* 2003, 3, 919-923.

Se pueden usar moldes disponibles en el mercado con diámetros de poro de 18 nm y 35 nm para sintetizar nanobarras metálicas monocristalinas, incluyendo nanobarras de Au, con longitudes de entre 50 y 100 nm. Se puede usar como sustrato Ag evaporada con una orientación del crecimiento (111) y un espesor de 200 nm. La electrodeposición puede realizarse en modo potencioestático usando un electrodo de referencia para controlar con precisión el sobrepotencial durante la deposición. Se pueden evaluar las condiciones significativas tales como la composición y la temperatura de la solución para lograr la nucleación 2D epitaxial, lenta, y el crecimiento de los nanobarras de Au. La TEM de alta resolución revelará la estructura de los nanobarras, y se puede usar la difracción de rayos X para determinar la orientación cristalina. Para hacer un mejor uso de los moldes, se pueden fabricar múltiples partículas por poro mediante el metalizado secuencial de las nanobarras de Au separadas por segmentos de Ag delgados (10-20 nm) con la misma orientación (111). En teoría, sería posible llenar completamente un poro usando este método. Como los moldes normalmente son de 50 a 60 μm de espesor, sería posible preparar más de 400 partículas de 100 nm de longitud por poro. Se puede aplicar la misma técnica de electrodeposición (potencioestática) para la síntesis de nanobarras de Ag mediante el uso de sustrato de Cu (111) como base de metalizado que puede ser atacada químicamente de manera selectiva.

Como método alternativo (y posiblemente menos costoso), se pueden preparar nanobarras de Au usando o adaptando el método basado en solución publicado por Nikoobakht y El-Sayed. Nikoobakht, B. y El-Sayed, M. A. "Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method", *Chem. Mater.* 2003, 15, 1957-1962. En la Figura 5, se muestra una imagen de TEM de nanobarras preparadas en un método basado en solución. En esta muestra, la nanobarra media tiene un tamaño aproximado de 10 nm x 50 nm, pero hay una variación considerable en el tamaño y la forma de las partículas, como se ve por la formación de nanocubos. Los métodos basados en soluciones se escalan fácilmente a volúmenes mayores.

La presente invención también describe un método de reducción de la señal de fondo en un espectro Raman generado por SACN, que comprende preparar una SACN optimizada, en donde dicha SACN optimizada se prepara mediante un método que comprende eliminar material unido irreversiblemente a la superficie de la partícula en el transcurso de la preparación de la SACN, en donde la señal de fondo de dicho espectro se reduce en comparación con un espectro generado por una SACN correspondiente que no está optimizada. En un caso, la eliminación se logra mediante la oxidación vigorosa del producto intermedio de SACN, seguida de una reducción leve. La eliminación puede comprender el tratamiento de la nanopartícula metálica con un oxidante, tal como una combinación de radicales de ozono/oxígeno generados por UV, seguido del tratamiento con un reductor, tal como etanol, para eliminar los compuestos orgánicos exógenos. Un ejemplo de limpieza de una superficie metálica con actividad de SERS se describe en: Ron *et al.*, *Langmuir* 1998, 14, 1116-1121. En un caso, el metal es Au. En el transcurso del método, la superficie de Au se convierte en óxido de oro inestable y, posteriormente, se reduce con etanol. En otro caso, el método comprende el tratamiento del metal con una combinación de radicales de ozono/oxígeno generados por la radiación UV (el oxidante), seguido del tratamiento con una solución de indicador en etanol, para que la adsorción del indicador pueda producirse inmediatamente después de la reducción. En otros casos, el etanol se elimina por centrifugación y el indicador se añade en un etapa adicional.

En algunos casos, se introducen las especies que contribuyen al ruido de fondo en un ensayo. Por ejemplo, se ha encontrado que ciertas membranas usadas para la filtración y preparación de muestras introducen antecedentes en el espectro Raman de ensayos que implican partículas SACN. Por consiguiente, la presente invención también desvela un método de reducción de una señal de fondo en un espectro Raman de una partícula SACN, que comprende preparar una muestra para el análisis, comprendiendo dicha preparación eliminar las especies de la muestra o del sistema de ensayo que contribuyen a una señal de fondo. La presente invención describe además un método de reducción de una señal de fondo en un espectro Raman de una partícula SACN, que comprende eliminar especies de los componentes del ensayo que contribuyen a una señal de fondo.

USOS DE LAS SACNS

El descubrimiento de nuevos fármacos usando sistemas multiplexados de alto rendimiento es un área de investigación activa. La química automatizada y combinatoria puede producir millones de nuevas estructuras. El análisis de estos fármacos requiere una detección de alto rendimiento y altamente multiplexada. El uso de la

tecnología de SACN proporciona un enfoque altamente multiplexado. La espectroscopia Raman es ideal para proporcionar la capacidad de multiplexado de marcadores debido a la nitidez de los máximos Raman, y la SERS ofrece muchas oportunidades únicas de marcaje. En algunas realizaciones, se pueden realizar ensayos multiplexados usando una serie de SACN que incluyen tanto una molécula con actividad Raman como una o más fracciones. Las fracciones pueden ser capaces de unirse selectivamente a una o más sustancias detectables dentro de un fluido de muestra, mientras que las moléculas indicadoras pueden usarse para identificar la SACN dentro del fluido (y, por lo tanto, la fracción asociada). Como las SACN individuales son relativamente pequeñas y el número de dianas que pueden identificarse de forma independiente puede ser bastante grande, se pueden realizar grandes cantidades de ensayos individuales dentro de una sola muestra de fluido incluyendo una gran cantidad de SACN diferentes.

Un espectro típico de Raman abarca más de 3.000 cm^{-1} . Véase la Figura 1. En una realización, se enfoca una región relativamente estrecha del espectro generando una pluralidad de SACN diferentes que comprenden moléculas indicadoras relacionadas estructuralmente. Por ejemplo, un conjunto de moléculas indicadoras relacionadas estructuralmente podría incluir piridina, piridina-d5 (piridina deuterada) y piridina- ^{15}N , 4-(metilamino)piridina, 4-aminopiridina, 4-mercaptopiridina, 4-piridinmetanol, 4-hidroxipiridina y 2,3,5-trimetilpiridina. Debido a que el espectro Raman se basa en modos de vibración, los pequeños cambios en la estructura química pueden proporcionar bandas Raman únicas. Por lo tanto, una sola estructura con actividad de SERS, por ejemplo, una nanopartícula, se modifica con una pluralidad de indicadores relacionados estructuralmente para producir una pluralidad de SACN, teniendo cada una de ellas espectros de SERS únicos, Pero una reactividad química similar. Esta metodología puede requerir una resolución espectral muy alta y, por lo tanto, monocromadores potencialmente grandes o caros.

En otra realización, se usa todo el espectro (en lugar de una pequeña región del mismo). En esta realización, se prepara una pluralidad de SCAN que colectivamente tienen bandas vibratorias ampliamente espaciadas. En algunas realizaciones, se puede usar un programa informático convenientemente para realizar la selección de un grupo dado de SACN o indicadores, teniendo cada uno determinadas características espectrales. En una realización, el programa informático puede diseñarse para seleccionar una pluralidad de SACN o indicadores en función de los criterios de separación espectral especificados por el usuario. Como alternativa, el programa informático puede diseñarse para generar una posible SACN o conjuntos de indicadores de acuerdo con la magnitud de separación espectral. No cabría esperar que una sola clase de moléculas indicadoras presentara bandas vibratorias en toda la ventana espectral y, por lo tanto, en esta realización, se usa una variedad de moléculas como indicadores. La selección de las moléculas puede realizarse guiada por los cuatro siguientes criterios:

1. El indicador tiene modos vibratorios con actividad Raman, es decir, modos que producen un cambio en la polarización durante la vibración.
2. El indicador se adsorbe en cualquier superficie con actividad de SERS, es decir, $\Delta G_{\text{ads}} \ll 0$.
3. El indicador tiene la menor cantidad de bandas posible, para aumentar al máximo el "espacio espectral" libre. Las moléculas no lineales con N átomos presentan $3N-6$ vibraciones permitidas (IR + Raman). De manera clara, las moléculas más pequeñas son útiles, aunque es necesario equilibrar N con ΔG_{ads} , que normalmente es más negativo para moléculas mayores.
4. El indicador es compatible con el entorno acuoso de la síntesis de partículas y los protocolos de cobertura, así como la propia química de formación de vidrio.

Se dispone de una gran cantidad de información tabulada en los espectros Raman de diferentes moléculas. Véase, por ejemplo, Nakamoto, K. "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds"; 4ª Ed., John Wiley & Sons, Inc: Nueva York; 1986; Lin-View, D.; Colthup, N. B.; Feld, M. S.; Grasselli, J. G. "The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules"; Academic Press: San Diego, CA; 1991; Socrates, G. "Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies; Table and Charts"; 3ª Ed., John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; 2001; Workman, J., Jr. "Handbook of Organic Compounds; NIR, IR, Raman, and UV-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfactants"; Academic Press: San Diego, CA; 2001; Vol. 3; Schrader, B. "Raman/Infrared Atlas of Organic Compounds"; 2ª Ed., VCH Publishers: Nueva York, NY; 1989; Hendra, P. J. y Agbenyega, J. K. "The Raman Spectra of Polymers"; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester; 1993. Usando los criterios establecidos anteriormente, se han identificado las siguientes clases de indicadores candidatos como útiles para las moléculas indicadoras para las SACN.

Moléculas orgánicas: El tamaño pequeño, la insaturación, los heteroátomos y los sustituyentes electronegativos conducen a características únicas. Los ejemplos con características Raman conocidas: piridinas, triazinas, pirimidinas, pirroles, oxazoles, imidazoles, furanos, cianuros, cianamidas y sus derivados (es decir, 2-, 3-, 4-funcionalizados). Acetileno, nitro/nitroso, $-\text{CCl}_2$ y $-\text{CCl}_3$ todos dan bandas de identificación únicas. Los isotiocianatos ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{S}$) y los isocianuros ($\text{R}-\text{N}\equiv\text{C}$) son particularmente atractivos, ya que son potentes dispersadores Raman, se adsorben en el Au, tienen vibraciones a energías no compartidas por ningún grupo funcional común, y los espectros vibratorios dependen fuertemente de la electronegatividad del grupo R.

Aniones orgánicos/inorgánicos: Los espectros sumamente sencillos (a menudo un solo máximo) son una gran ventaja. Los ejemplos de indicadores que dan espectros sencillos incluyen cianuro, SCN^- , ClO_3^- , HCO_2^- y otros. Algunos de estos pueden incluirse en el momento de la síntesis de partículas metálicas. Por ejemplo, el Au coloidal

tiene Cl⁻ residual fuertemente unido que surge de H₂UCl₄. Es posible comenzar con otras sales metálicas, en especial, si se usan agentes reductores potentes como NaBH₄.

5 Complejos de coordinación y otros compuestos que contienen metales de transición: El enlace de metal-ligando es una excelente oportunidad para generar características vibratorias en los desplazamientos Raman inferiores, es decir, 200-800 cm⁻¹. Análogamente, las propias vibraciones basadas en ligandos se desplazan en relación con el estado no complejo y, cuando sea posible, el cambio del estado redox del metal mueve las energías de ambas bandas. Los ligandos ambidentados como SCN⁻ son particularmente atractivos, ya que pueden unir un ion metálico y la superficie metálica. En otra realización, se pueden usar complejos que contengan uno o más ligandos con una actividad de SERS potente (por ejemplo, cianuro en [Fe(CN)₆]³⁻ o [Fe(CN)₆]⁴⁻), o 2,2'-bipiridina (bipi) en [Ru(bipi)₃]²⁺). Como alternativa, las especies organometálicas, es decir, aquellas con uno o más enlaces de metal-carbono (por ejemplo, ferroceno) pueden presentar espectros Raman intensos.

15 Especies de valencia mixta: El azul de Prusia y el WO₃ son ejemplos de materiales cuyos espectros vibratorios cambian en función del estado redox de iones metálicos. Esto último es particularmente interesante, ya que la intercalación de H⁺ (es decir, para formar H_xWO₃), D⁺ o Li⁺ permite la sintonización continua.

20 Isótopos: El cambio de la masa reducida de un modo vibratorio es una excelente metodología para cambiar su energía, y esto está fácilmente disponible a través de la sustitución isotópica. Por ejemplo, BPE deuterado, 4,4'-dipiridilo deuterado, y bis-(piridil)acetilenos deuterados; así como piridina, piridina-d₅ (piridina deuterada) y piridina-¹⁵N.

25 La independencia espectral puede evaluarse convenientemente usando un programa informático de desconvolución espectral, que combina la sustracción del fondo y detección de los máximos, junto con métodos tales como los mínimos cuadrados clásicos directos. El uso de dicho programa informático permite la evaluación de moléculas indicadoras candidatas frente a otros indicadores candidatos. Dicho programa informático permite la entrada de espectros indicadores puros y produce una salida que cuantifica cada componente en mezclas.

30 Una vez que se ha seleccionado un conjunto de indicadores, se puede normalizar la intensidad de la señal de las SACN, dando lugar así a SACN con señales iguales por número de partículas. Esta capacidad, que no es posible con fluoróforos moleculares, garantiza el intervalo dinámico máximo posible para una medición dada. En una realización, el proceso de normalización comprende dos etapas. En la primera etapa, se miden las proporciones de intensidad de la característica de identificación para los indicadores. En la segunda etapa, se preparan SACN que comprenden una cantidad reducida de indicador, definida mediante la inversa de la proporción de su intensidad con respecto a la del indicador más débil, a excepción de la SACN que comprende la señal de menor intensidad. Este método supone la adsorción lineal a bajas concentraciones de indicador, que se observa habitualmente para una variedad de indicadores (véase también el Ejemplo 8). En otra realización, se puede lograr la normalización de la adsorción del indicador aumentando la cantidad de precursor de SiO₂ (silano) en la superficie de las nanopartículas durante la síntesis de SACN, reduciendo así la adsorción del indicador. Estos métodos dan lugar a una pluralidad de SACN que tienen intensidades máximas esencialmente iguales. Como se usa en el presente documento, en algunas realizaciones, esencialmente iguales se refiere a intensidades máximas que se diferencian en más/menos un 10 %. En otras realizaciones, esencialmente iguales se refiere a intensidades máximas que se diferencian en más/menos un 5 %, y en otras realizaciones más, esencialmente iguales se refiere a intensidades máximas que se diferencian en más/menos un 1 %.

45 La presente invención comprende SACN que comprenden un grupo reactivo en la parte accesible al disolvente de la partícula, tal como un grupo -SH, un grupo -NH₂ o un grupo -COO⁻. En algunas realizaciones, el grupo reactivo está asociado al encapsulante. La presente invención describe métodos de preparación de SACN bioconjugadas, incluyendo la preparación de SACN que comprenden un grupo reactivo, tales como las SACN con actividad tiol para la bioconjugación. En realizaciones en las que las SACN se encapsulan con SiO₂, pueden derivatizarse grupos de silanol superficiales. La cubierta de sílice de las SACN se puede funcionalizar para portar grupos sulfhidrilo libres, ya sea en el transcurso de la fabricación de la cubierta de SiO₂ ("modificación directa") o tras la completa formación de la cubierta ("modificación posterior"). Los expertos en la materia conocen muchas reacciones para la modificación de grupos silanol. Por ejemplo, la superficie de SiO₂ puede modificarse para presentar aminas, (Mediante la reacción con aminopropil-trimetoxisilano (APTMS)) o etóxidos (3-glicidiloxipropil-trimetoxisilano (GPTMS)). También existen reactivos para incorporar sulfhidrilos, carboxilo y otros posibles sitios para la conjugación. La preparación de las SACN con actividad tiol se describe en el Ejemplo 4.

60 Las SACN con actividad tiol son útiles para la preparación de SACN conjugadas con biomoléculas, por ejemplo, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para la unión de anticuerpos, se puede usar el APTMS para la obtención de grupos amina y la posterior química de carbodiimida para unir anticuerpos. Como alternativa, se puede usar el GPTMS para producir una superficie de etóxido hacia la que reaccionarán directamente las aminas en los anticuerpos. En otras realizaciones, se pueden usar silanos terminados en grupos alquilhaluro, haloacetilo y bencilhaluro para la reacción con grupos cisteína en proteínas. En el Ejemplo 5, se describe la preparación de una SACN bioconjugada. La limpieza y presencia de iones en una superficie de vidrio pueden influir en el éxito de la derivatización.

En algunas realizaciones, las SACN producidas directamente pueden usarse como se describe en el presente documento. Sin embargo, en otras realizaciones, se pueden obtener mejores resultados una vez "limpia" o modificada la superficie de SiO₂, incluyendo reacciones con ácidos o bases.

5 Para cada método desarrollado, los agentes derivatizantes (por ejemplo, silanos) y la biomolécula pueden valorarse para controlar los niveles de derivatización. Se pueden usar anticuerpos marcados con fluorescencia, incluyendo los muchos disponibles en el mercado, para cuantificar la cantidad de material presente en la superficie. Esto puede controlarse a medida que se optimizan las variables. Para determinar si la biomolécula permanece reactiva, las parejas de unión marcadas con colorante fluorescente de la biomolécula pueden mezclarse con partículas, usando partículas no recubiertas como control. Por ejemplo, las SACN recubiertas con estreptavidina se pueden mezclar con biotina marcada con colorante fluorescente. Las partículas resultantes se pueden centrifugar, eliminarse el sobrenadante y medirse la fluorescencia de las partículas.

15 En algunas realizaciones, las biomoléculas se unen a los indicadores activados por tiol usando el reticulante heterobifuncional sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). Esta molécula contiene tanto un grupo maleimida que es reactivo a los sulfhidrilos como un sulfo-NHS-éster que reacciona preferentemente con aminas primarias. En este caso, se puede usar una reacción sencilla en un solo recipiente para unir la estreptavidina, y es fácilmente adaptable a la unión de la mayoría de las proteínas, oligonucleótidos con terminación amina u otras moléculas portadoras de aminas primarias.

25 Las SACN con funcionalidad amina en la superficie se pueden tratar con anhídrido succínico, que reacciona con las aminas primarias para dejar un carboxilato libre. Se puede usar una carbodiimida para enlazarla a las aminas en biomoléculas, tales como la estreptavidina. Las partículas recubiertas de amina también pueden unirse a aminas en la biomolécula usando un enlazador homobifuncional tal como glutaraldehído. Una opción alternativa es convertir primero una parte de las aminas de la proteína en sulfhidrilos usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) y luego unirla a las partículas usando sulfo-SMCC.

30 Las SACN bioconjugadas se pueden purificar, en parte, para reducir la unión no específica. En el caso de una SACN conjugada con anticuerpos, el anticuerpo libre competirá con las SACN por los antígenos, reduciendo la sensibilidad. En una realización, las SACN se purifican por centrifugación, incluyendo más de una centrifugación. La eficacia de la purificación puede determinarse espectroscópicamente mediante dopaje en proteínas marcadas con fluorescencia. Como se sabe que los colorantes fluorescentes pueden interactuar con las superficies de vidrio, puede ser necesario confirmar los resultados con proteínas marcadas radiactivamente. Se puede usar un dispositivo de filtración de flujo tangencial para la purificación de partículas recubiertas de sílice, así como la purificación de SACN conjugadas.

40 Es deseable eliminar o reducir la unión no específica (UNE) de las SACN. Las SACN se pueden probar en portaobjetos de vidrio, placas de micropocillos y superficies celulares fijas. Se puede identificar el nivel al que cada uno de los diferentes protocolos de conjugación y la cobertura de superficie afecta a la UNE. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de los agentes de bloqueo y tampones de lavado convencionales, tales como Tween® y caseína, además de los diferentes pH y tampones. En una realización, se puede reducir la UNE bloqueando las partículas con un agente de bloqueo, incluyendo los agentes descritos en el presente documento. En una realización, el agente de bloqueo es BSA, como se describe en el Ejemplo 6. Como alternativa, se puede reducir o eliminar la UNE mediante derivatización basada en polímero de la cubierta de SiO₂, tal como con poliácido acrílico, polietilenglicol y dextranos, polietilenimina y dendrímeros, todos conocidos por tener una baja UNE. Además, también se pueden usar reactivos de cubierta de vidrio de micromatrices disponibles en el mercado.

50 En una realización, una SACN conjugada comprende una molécula espaciadora entre la SACN y la biomolécula conjugada. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que ciertas moléculas espaciadoras, tales como polietilenglicol o dextrano, reducirán al mínimo la UNE. Las moléculas espaciadoras pueden introducirse en la SACN bioconjugada mediante los métodos descritos en el presente documento y otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar agentes reticulantes disponibles en el mercado que incorporan una subunidad de PEG diferenciada a un sulfo-SMCC. Se puede unir una biomolécula a este enlazador basado en PEG. Asimismo, las moléculas de PEG funcionales se pueden conjugar conjuntamente con las SACN junto con el anticuerpo. En este sentido, el PEG actúa como un espaciador para reducir al mínimo la exposición de la superficie de sílice desnuda a especies no deseadas en el ensayo. Como alternativa, es posible conjugar primero moléculas de PEG bifuncionales con las SACN. El grupo funcional disponible del PEG puede usarse luego para una conjugación adicional con un anticuerpo u otra biomolécula.

60 En una realización, en la presente invención, se proporcionan ensayos y kits para la detección de un analito diana. Un analito puede ser cualquier sustancia o componente específico que se desee detectar y/o medir. Los analitos de interés incluyen, por ejemplo, antígenos (tales como antígenos específicos de organismos bacterianos, víricos o protozoarios); anticuerpos, incluyendo los inducidos en respuesta a una infección, reacción alérgica o vacuna; hormonas, proteínas y otras sustancias fisiológicas (por ejemplo, gonadotropina coriónica humana, estrógenos, progestinas, testosteronas, corticoesteroides, factores de crecimiento humano, hemoglobina y colesterol); ácidos nucleicos; una variedad de enzimas; compuestos terapéuticos y fármacos ilícitos; contaminantes y contaminantes

ambientales; o cualquier cantidad de sustancias naturales o sintéticas.

La invención describe además un inmunoensayo de tipo sándwich que usa SACN, que puede usarse para reemplazar un ensayo de tipo ELISA. La técnica analítica del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y las técnicas relacionadas son ahora los inmunoensayos más conocidos. Las etapas de un procedimiento ELISA convencional incluyen, en general, adsorber inicialmente un anticuerpo de captura sobre un soporte sólido. Tras la incubación con una muestra, se forma un complejo de proteína diana y anticuerpo. El complejo del inmunoensayo de tipo sándwich final normalmente incluye una enzima indicadora que permite mediciones ópticas de la concentración de antígeno. En un inmunoensayo de tipo sándwich con SACN, sin embargo, en lugar de una enzima indicadora, se usa una SACN para permitir la detección óptica. En este caso, las SACN bioconjugadas pueden prepararse con concentraciones conocidas de especies de anticuerpos activos específicos unidos a sus superficies, y pueden cuantificarse usando un ensayo de unión con un ensayo de cuantificación de proteínas, tales como el ensayo BCA. Dicho ensayo puede ser multiplexado, como se describe en el Ejemplo 11.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para la detección de analitos en muestras de origen biológico. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, sangre o suero; saliva, esputo, lágrimas, sudor u otros fluidos secretados; orina o materia fecal; así como fluidos derivados biológicamente tales como líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, extractos celulares y similares. La sangre completa es un medio adecuado para las mediciones de SERS a partir de SACN. Véase la Figura 20.

Se usa un volumen mínimo de muestra para el ensayo, incluyendo volúmenes de muestra que varían de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 500 μ l en algunas realizaciones, de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 100 μ l en otras realizaciones, de aproximadamente 5 μ l a aproximadamente 50 μ l en otras realizaciones, y entre aproximadamente 10 μ l y aproximadamente 30 μ l en otras realizaciones más. Se pueden usar volúmenes de muestra mayores si la situación lo garantiza, tal como en el caso del control de sangre a granel en un banco de sangre, donde los volúmenes de muestra pueden estar en el orden de los mililitros. También se pueden usar volúmenes menores si la situación lo garantiza; por ejemplo, en el caso de un ensayo para una célula, se puede usar el volumen de la célula. En el caso de un ensayo que se dirige a un componente intracelular, se puede usar el volumen del componente intracelular. En dichos ensayos celulares o subcelulares, el volumen puede ser tan bajo como de 1 pl.

Los ensayos de la presente invención se basan en ensayos de unión tales como, pero sin limitación, inmunoensayos. Las parejas de unión que participan en dichos ensayos de unión incluyen, aunque sin limitación, los siguientes pares de unión: anticuerpo y antígeno o hapteno; hormona y receptor; biotina y avidina; carbohidrato y lectina; moléculas efectora y receptora; enzimas y cofactores, sustratos o inhibidores; aptámeros y sus dianas, y secuencias de nucleótidos complementarias. Así pues, las descripciones y los ejemplos incluidos a continuación son para fines demostrativos, y no deben considerarse limitantes de las aplicaciones abordadas en particular.

En una realización, la presente invención comprende un método de detección de la presencia de al menos un analito que comprende las siguientes etapas: (a) poner en contacto la muestra sospechosa de contener el analito con al menos una pareja de unión específica del analito en una superficie de ensayo de flujo lateral para unirse al analito en la muestra; (b) previa, simultánea o posteriormente a la etapa (a), unir al menos una pareja de unión del analito con una SACN como se reivindica en el presente documento para formar una SACN conjugada; y (c) detectar una señal de SERS mediante la que se determina la presencia del analito en la muestra según la intensidad o presencia de la señal.

En una realización, la muestra se coloca en una zona de muestra. La muestra se filtra a través de la zona de muestra y luego a través de una zona de marcador que contiene un marcador, por ejemplo, una SACN conjugada. La SACN se une al analito de muestra para formar complejos, y los complejos luego migran a lo largo de la membrana o la tira de detección. Los complejos de SACN y analito, si están presentes, se unen a la al menos una pareja de unión específica que está inmovilizada en una zona de detección en la membrana. La formación de este complejo marcado con SACN con su pareja de unión específica produce una señal de SERS detectable, indicando un resultado positivo de la presencia del analito en la muestra. En caso de que el analito sea IL-5, por ejemplo, la SACN puede conjugarse con un anticuerpo IL-5, y puede estar presente un anticuerpo de captura correspondiente para IL-5 en la zona de detección. En el Ejemplo 12, se describe un ensayo de flujo lateral.

En una realización, la muestra biológica es una célula. La célula puede estar viva o muerta. Las imágenes de las células que contienen información espectral Raman se pueden obtener mediante una serie de métodos. Se puede acoplar un microscopio a una cámara CCD de modo que se puedan obtener imágenes completas del objeto. A continuación, entre la muestra y la cámara, se inserta un dispositivo de filtrado de número de onda tal como un monocromador o un filtro sintonizable de cristal líquido. El dispositivo de filtrado solo permite que un ancho de banda estrecho de la radiación dispersa llegue a la cámara en cualquier momento. Se captan varias imágenes, cubriendo cada una un pequeño intervalo espectral de la radiación dispersa. Los espectros de cada punto de la imagen se ensamblan en el programa informático. En el otro extremo, la luz de un solo punto de una imagen puede dispersarse a través de un monocromador y el espectro completo de ese punto puede adquirirse en un detector de matriz. El objeto luego se explora de manera que cada punto de la imagen se adquiera por separado. La imagen Raman se

ensambla luego en un programa informático. En otra metodología, se puede construir un instrumento de exploración lineal que excite la muestra con una línea de radiación. La línea se visualiza espacialmente a lo largo de un eje de una cámara CCD mientras se dispersa espectralmente de manera simultánea a lo largo del eje ortogonal. Cada lectura de la cámara adquiere el espectro completo de cada píxel espacial de la línea. Para completar la imagen, se explora la línea a través de la muestra.

Así pues, de acuerdo con la presente invención, se pueden identificar células o poblaciones de células usando una SACN conjugada con anticuerpo preparada con un anticuerpo que se une a un receptor antigénico de la superficie celular que se expresa en una subpoblación de células. La identificación de células y de poblaciones de células también se puede realizar a través de una metodología de tipo sándwich. Por ejemplo, el Ejemplo 13 describe un ensayo en el que se aplicaron SACN conjugadas con neutrAvidin a células SK-BR-3 teñidas para el receptor Her2 y el anticuerpo anti-ratón biotinilado. Se necesitan nuevas tecnologías de cribado de alto rendimiento basadas en células para mantener el ritmo de los crecientes bancos de compuestos y el descubrimiento casi diario de nuevas dianas terapéuticas. Por ejemplo, la tarjeta Vitra Biosciences CellPlex™ permite la multiplexación de ensayos celulares. Otra metodología, que permitiría la versatilidad en los formatos de ensayo, es codificar células con identificadores únicos. Esto permitiría estudiar poblaciones de células simultáneamente, aumentando así el rendimiento. Por ejemplo, la célula de tipo A se puede codificar con SACN de tipo 1, la célula de tipo B se puede codificar con SACN de tipo 2, y así sucesivamente. Estas células se pueden mezclar antes de realizarse el ensayo celular. El ensayo celular se realizaría usando métodos tradicionales de fluorescencia, tales como GFP. El análisis final se completaría leyendo la fluorescencia para determinar el resultado del experimento, y la SERS para descodificar el tipo de célula, usando un microscopio Raman o una célula clasificada con detección Raman. Esta estrategia permitiría el estudio de fenotipos en poblaciones de células mixtas.

Las SACN también se pueden usar para detectar dianas intracelulares. Las SACN pueden introducirse en las células mediante microinyección, electroporación, metodologías mediadas por endocitosis, incluyendo el uso de péptidos anfipáticos tales como PEP-1, el uso de reactivos catiónicos a base de lípidos, como Lipofectamine (Invitrogen), 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 dendrímero SuperFect (Qiagen). A nivel intracelular, se pueden usar métodos indirectos para demostrar que las partículas están unidas a las dianas deseadas. El método más sencillo para demostrar la especificidad de las sondas consiste en usar inmunofluorescencia para verificar la ubicación de las SACN. Hay una serie de sondas fluorescentes disponibles en el mercado que son útiles para marcar estructuras celulares (tales como las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático) en las células vivas. Mediante la conjugación de un anticuerpo que se dirige a la misma estructura, se puede determinar qué fracción de partículas está marcando activamente su diana; y qué porcentaje no están unidas específicamente. Otra metodología para verificar la ubicación de las SACN consiste en usar fusiones de proteínas fluorescentes, tales como GFP y sus análogos.

La presente invención se dirige a agentes de formación de imágenes que muestran propiedades importantes en el diagnóstico médico. Más particularmente, la presente invención se dirige a agentes de formación de imágenes que comprenden SACN. Los agentes de formación de imágenes de la presente invención son útiles para obtener imágenes de un paciente en general y/o para diagnosticar específicamente la presencia de tejido enfermo en un paciente. Mediante la elección de composición, se puede ajustar la excitación y emisión de las SACN para que se produzca entre 633 nm y 1000 nm, en la región mínima para la absorción y la dispersión por los tejidos. El proceso de formación de imágenes se puede llevar a cabo mediante la administración de un agente de formación de imágenes de la invención a un paciente, y luego la exploración del paciente usando cualquier sistema que pueda realizar la formación de imágenes espectrales, tales como microscopios confocales de barrido puntual, sistemas de barrido en línea y sistemas tomográficos de coherencia óptica. Las SACN de la presente invención también pueden verse mediante cualquier sistema de imágenes que realice la detección únicamente a través de una sola banda de longitud de onda, la lista anterior, así como cualquier sistema de formación de imágenes de fluorescencia que tenga una fuente de luz de excitación y detección de imagen filtrada. Otros sistemas y métodos de formación de imágenes adecuados se describen en "HANDBOOK OF OPTICAL AND BIOMEDICAL DIAGNOSTICS", Editor Valery Tuchin (2004) Springer. También se incluyen métodos de dominio temporal, tales como la espectroscopia de dispersión dinámica de la luz y la tomografía, formación de imágenes de tiempo de vuelo, espectroscopia de dispersión de luz cuasielástica, espectroscopia de correlación de fotones, espectroscopia Doppler y espectroscopia de ondas de difusión. Todas estas técnicas permiten la diferenciación entre fotones y dónde se han basado en sus tiempos. Dado que las SACN tendrán diferentes tiempos que las sustancias fluorescentes, etc., pueden diferenciarse frente a tejidos y otros marcadores con estos métodos. Los parámetros instrumentales útiles son una fuente de luz modulada y un detector sensible al tiempo. La modulación puede ser pulsada o continua.

La exploración da lugar a espectros o imágenes de una región interna de un paciente y/o de cualquier tejido enfermo de esa región. Por región de un paciente, se refiere a todo el paciente o a un determinado área o parte del paciente. El agente de formación de imágenes puede emplearse para proporcionar imágenes de la vasculatura, del corazón, del hígado y del bazo, y en la formación de imágenes de la región gastrointestinal u otras cavidades corporales, o de otras maneras que serán muy evidentes para los expertos en la materia, tales como en la caracterización de tejidos, formación de imágenes de una combinación sanguínea, etc.

También se describe en el presente documento un método de diagnóstico de una patología anómala *in vivo* que comprende introducir una pluralidad de SACN dirigidas hacia una molécula implicada en la patología anómala en un fluido corporal que está en contacto con la patología anómala, en donde las SACN se asocian a una molécula implicada en la patología anómala, y la formación de imágenes de las SACN asociadas *in vivo*. El método se puede aplicar, en general, a cualquier órgano accesible por las sondas: tracto gastrointestinal, corazón, pulmón, hígado, cuello uterino, mama, etc. En algunos casos, las SACN se pueden introducir a través de un endoscopio, como en el caso de una colonoscopia, o una aguja, o usarse con una punta o funda desechable. En otros casos, las SACN se pueden introducir directamente mediante la propia sonda de formación de imágenes. Por ejemplo, se pueden introducir fibras ópticas individuales o haces de fibras ópticas, en organismos vivos para la formación de imágenes, y se ha demostrado su utilidad para la formación de imágenes de nervios, cerebro, microvasos, células, así como para caracterizar la biodistribución. Las fibras ópticas recubiertas de gel son muy conocidas en la bibliografía de los sensores. Las SACN pueden unirse de manera no covalente al gel, difundiendo en el tejido relevante tras la introducción. Se puede prever una variedad de otros métodos para inmovilizar las SACN en la superficie externa de las fibras de modo que se difundan en fases líquidas con las que se ponen en contacto.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se describe una síntesis típica de coloide de Au de ~45 nm de diámetro usando una combinación de borohidruro de sodio, citrato de sodio y clorhidrato de hidroxilamina. Se lava toda la cristalería con agua regia y se aclara rigurosamente con agua de 18 MΩ. Las reacciones se llevan a cabo en una sala fría. Se preparan soluciones de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 0,01 % (p/p) en agua, citrato de sodio dihidratado al 8 % (p/p) en NaOH 0,01 N, borohidruro de sodio al 10^{-4} % en NaOH 0,01 N y clorhidrato de hidroxilamina 400 mM en agua. Luego se prepara una mezcla de soluciones de citrato y borohidruro combinando 1 ml de la solución de citrato de sodio con 100 μl de la solución de borohidruro de sodio y 500 μl de NaOH 0,01 N. Después de preparar esta mezcla, se inyectan 200 μl de la solución de hidroxilamina en 100 ml de la solución de HAuCl_4 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agita brevemente. Tras 20 minutos, se inyecta la mezcla de borohidruro/citrato en la solución de HAuCl_4 e hidroxilamina que se agita rápidamente. Los mejores resultados se obtienen cuando la mezcla se inyecta a medio camino entre el centro del vórtice de agitación y la pared del matraz.

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas de oro. Se preparan soluciones madre de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a una concentración del 1 % o del 2 % (p/v) en H_2O . Se filtran estas soluciones a través de membranas de 0,2 μm antes de colocarlas en la sala fría. Los botes que contienen las soluciones madre también ser recubren normalmente con papel de aluminio para reducir la exposición a la luz. Se preparan las siguientes soluciones normalmente:

1. 1,0 l de HAuCl_4 al 0,02 % en H_2O .
2. 5 ml de citrato de sodio deshidratado al 32 % (p/v) en NaOH 0,01 N.
3. 10 ml de clorhidrato de hidroxilamina 1,6 M en H_2O .
4. 10 ml de NaBH_4 al 4 % (p/v) en NaOH 1,0 N que se prepara mediante la dilución de la solución madre.

Todas las reacciones se llevan a cabo en una sala fría después de permitir que las soluciones alcancen la temperatura de la sala. La solución de HAuCl_4 se coloca en un matraz de fondo redondo de 2 l, y se introduce una barra de agitación de vidrio con paleta de teflón en el matraz para proporcionar agitación. Se añade 1,0 ml de la solución de hidroxilamina al matraz y se agita. Inmediatamente después de la adición de la hidroxilamina, se prepara una solución x4 de NaBH_4 al 10^{-4} % mediante dilución en serie de la solución madre al 4 %. Estas diluciones se realizan en NaOH 0,01 N. A continuación, se mezcla 1 ml de citrato de sodio al 32 % con 525 μl de NaOH 0,01 N y 75 μl de NaBH_4 al 10^{-4} % x4. A los 20 minutos de la adición de la hidroxilamina, se añade 1,0 ml de la mezcla de citrato/borohidruro al matraz de reacción mientras se agita rápidamente.

Ejemplo 3

Espectros de SERS de SACN marcadas con 4-mercaptopiridina (4-MP) y *trans*-4,4'-bis(piridil)etileno (BPE).

Materiales: El agua usada para todas las preparaciones fue de 18,2 MΩ, destilada a través de un sistema nanopuro Barnstead. El 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, citrato trisódico dihidrato, hidróxido sódico, borohidruro sódico, clorhidrato de hidroxilamina, *trans*-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE), 4-mercaptopiridina, silicato sódico, ortosilicato de tetraetilo (TEOS), alcohol etílico y amoníaco 2,0 M en etanol se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El BPE se recrystalizó antes de su uso.

Preparación del coloide: Se preparó Au coloidal de 35 nm a partir de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Se prepararon soluciones acuosas de citrato de sodio al 4 % y clorhidrato de hidroxilamina 400 mM inmediatamente antes de la síntesis, así como una solución de borohidruro de sodio al 10^{-2} % en NaOH 0,001 N. Se mezcló una alícuota de 300 μl de esta solución de borohidruro con 500 μl del citrato y 350 μl de la hidroxilamina, y se inyectó inmediatamente en 200 ml de

HAuCl_4 al 0,01 % con agitación vigorosa. Se determinó el tamaño de las partículas resultantes por microscopía electrónica de transmisión usando el programa informático ImageJ.

Preparación de las SACN: Todas las reacciones se realizaron en matraces de plástico. Un experimento típico usó 30 ml de coloide de 35 nm. Se volvió el coloide vitreoófilo con la adición de 40 μl de APTMS 1,0 mM y se dejó agitar durante 15 minutos. Se añadió a la solución la mezcla de marcador Raman (600 μl de 4-mercaptopiridina 10^{-5} M y 50 μl de BPE 10^{-5} M), que luego se agitó durante 15 minutos más. Por último, se añadieron 1,2 ml de silicato de sodio al 0,54 % y se dejó reaccionar durante 42 horas. Después de este tiempo, se añadieron 120 ml de EtOH a la solución, seguidos de 1 ml de amoníaco 2 M (en etanol) y 20 μl de tetraetilortosilicato (TEOS). Se permitió que esta reacción continuara durante 1 día antes de la purificación por centrifugación. Esta cantidad de TEOS se puede variar, si se desea una cubierta más delgada o más gruesa.

Las SACN resultantes tenían una mezcla de dos especies diferentes de moléculas con actividad Raman, 4-MP y BPE, en una proporción de 12:1. Los espectros de SERS de estas SACN de 4-MP/BPE obtenidas usando excitación de 633 nm (Rastro A) y excitación de 785 nm (Rastro B) se representan en la Figura 6. A modo comparativo, los espectros Raman característicos de las SACN de BPE (línea discontinua) y de las SACN de 4-MP (línea continua) se representan en la Figura 7. Se puede ver que las características de la señal Raman de 4-MP dominan el espectro de las SACN de 4-MP/BPE obtenidas usando una excitación de 785 nm, mientras que las características de las señales Raman de BPE y 4-MP son evidentes en el espectro obtenido usando excitación de 633 nm. Así pues, mediante la elección cuidadosa de dos o más especies diferentes de moléculas con actividad Raman, y sus proporciones relativas, es posible preparar SACN que proporcionen diferentes espectros de dispersión Raman dependiendo de la longitud de onda de excitación. Esto permite un nivel adicional de capacidad de multiplexación.

Ejemplo 4

Preparación de SACN con actividad tiol

A. Modificación de sílice: La cubierta de sílice de las SACN se puede funcionalizar para portar grupos sulfhidrilo libres, ya sea en el transcurso de la fabricación de la cubierta de SiO_2 ("modificación directa") o tras la completa formación de la cubierta ("modificación posterior").

B. Modificación posterior: Se prepara un lote de 50 ml de SACN de acuerdo con los protocolos convencionales. Se procede a través de todas las etapas de crecimiento de sílice, excepto que se deben volver a suspender las SACN hasta solo 10 ml en agua después de la centrifugación final. Suponiendo pérdidas despreciables, esto deja a las SACN a una concentración x5 del coloide original. Se añaden 40 ml de etanol a las SACN. Bajo agitación magnética moderada, se añade 1 ml de NH_4OH concentrado (30 %, J. T. Baker n.º 9733-01). Mientras esto se agita, se prepara una solución que sea de 900 μl de etanol, 95 μl de tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma n.º 333859) y 5 μl de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS, Fluka n.º 63800). Se añaden 100 μl de esta mezcla (eficazmente 9,5 μl de TEOS y 0,5 μl de MPTMS) a las SACN en agitación y se deja que la reacción continúe durante la noche. Se purifica mediante centrifugación repetida. Se centrifuga en sentido descendente y se vuelve a suspender el sedimento en agua un mínimo de 3 veces para garantizar la eliminación completa del etanol y el exceso de reactivos. Se vuelve a suspender hasta 5 ml (x10) después de la centrifugación final.

C. Modificación directa: De nuevo, se comienza a preparar un lote de 50 ml de SACN usando condiciones típicas. El único cambio se realiza durante el etapa de crecimiento de Stöber. Como antes, se añade 1 ml de NH_4OH concentrado y se agita durante 5 minutos. A continuación, se mezclan 47,5 μl de TEOS con 2,5 μl de MPTMS, y se añaden a los marcadores. Se agita durante la noche y se purifica mediante centrifugación, se vuelven a suspender los marcadores purificados hasta 5 ml (x10).

Ejemplo 5

Bioconjugación de SACN

Con SACN activadas por tiol, se unen las biomoléculas usando el sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato reticulante heterobifuncional (sulfo-SMCC, Pierce Biotechnology, Inc). Esta molécula contiene tanto un grupo maleimida que es reactivo a los sulfhidrilos como un sulfo-NHS-éster que reacciona preferentemente con aminas primarias. En este caso, se puede usar una reacción sencilla en un solo recipiente para unir estreptavidina, y debe ser fácilmente adaptable a la unión de la mayoría de las proteínas u otras moléculas portadoras de aminas primarias.

Los marcadores pueden concentrarse antes de la conjugación. Para la conjugación con marcadores activados por tiol como se ha descrito anteriormente, primero se añaden 0,25 mg de estreptavidina a 5 ml de tampón PBS 2 mM (KCl 0,54 mM, NaCl 27,6 mM, $\text{pH} = 7,4$). Se añaden los marcadores activados por tiol (5 ml a una concentración de x10) y se mezclan bien. A continuación, se pesa 1 mg de sulfo-SMCC y se añade a los marcadores y SAV. Se mezcla inmediatamente agitando con formación de vórtice y se deja reaccionar durante 1 hora mientras gira a temperatura ambiente. Tras 1 hora, se purifican los marcadores por centrifugación y resuspensión en tampón PBS 2 mM. Se puede añadir una pequeña cantidad (0,1 % de concentración final) de BSA para reducir al mínimo la

adherencia de las partículas a las paredes de la centrífuga. Si bien esta reacción usa estreptavidina, otras proteínas (incluyendo anticuerpos) se han conjugado usando métodos similares. Si es necesario un mayor control sobre la reacción, la proteína se puede "preactivar" para añadirla a los marcadores. Debido a que el grupo maleimida de sulfo-SMCC es bastante estable en soluciones acuosas (~60 horas), las biomoléculas pueden activarse mediante la reacción con sulfo-SMCC durante 30-120 minutos seguida de la purificación en una columna de desalación. Esto crea esencialmente una biomolécula activada por maleimida que se puede añadir directamente a SACB que contienen sulfhidrilo.

Para la avidina, se pueden usar análogos (incluyendo estreptavidina y NeutrAvidin™) y la biocitina fluorescente Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes n.º A12922; "biocitina-594") para cuantificar el número de biomoléculas unidas a las SACN. La fuerte absorción visible de las SACN sugiere el uso de esta detección fluorescente altamente sensible en lugar de usar métodos colorimétricos comunes (incluyendo la peroxidasa de rábano picante biotinilada) para la cuantificación de la estreptavidina. Este colorante rojo excitado es útil en una región en la que las partículas coloidales tienen poca absorción, lo que podría interferir con las mediciones. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un Fluorolog-3 de Jobin Yvon-Spex.

Para paliar el problema de que las SACN altamente absorbentes pueden influir en las mediciones de la fluorescencia, el experimento se ha llevado a cabo de dos formas diferentes. La primera forma es la más sencilla; se incubaron las partículas biofuncionalizadas con la biocitina-594 durante un período de tiempo determinado (nominalmente 2 horas, protegidas de la luz para evitar el fotoblanqueo). Los marcadores se purifican luego por centrifugación repetida (basta con 2 veces si se controla la cantidad de colorante cuidadosamente), y se mide su fluorescencia.

Lo contrario a tomar mediciones directas de la fluorescencia de los marcadores es medir la cantidad de moléculas fluorescentes que no se unen a los marcadores. De nuevo, se incuban los marcadores en una cantidad de colorante cuidadosamente seleccionada y se centrifugan solo una vez. Se recoge el sobrenadante cuidadosamente y se mide la fluorescencia. Se puede determinar la cantidad de colorante que se ha unido a las partículas sustrayendo este valor de la concentración original de colorante conocida. Un elemento importante que se ha de tener en cuenta es que se usaron tubos de microcentrifuga antiadherentes (Corning Costar), ya que la biocitina Alexa Fluor® 594 se adsorbe rápidamente a las paredes de los tubos regulares. Se pueden usar protocolos similares con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia si se conjugan las partículas con anticuerpos en lugar de con análogos de avidina.

Estos métodos de cuantificación se han usado para mostrar que la cantidad de una biomolécula dada conjugada con los marcadores puede controlarse mediante la adición de otra molécula reactiva. En la Figura 8, se muestra el número de moléculas de biotina que se unieron a nanopartículas conjugadas con proporciones variables de NeutrAvidin™ y albúmina de suero bovino (BSA). Las condiciones de conjugación fueron equivalentes para todas las reacciones, siendo la proporción de biomoléculas la única variable.

Como cabía esperar, las cantidades más altas de BSA conducen a niveles más bajos de biotina unida. Suponiendo que cada NeutrAvidin™ (NAv) es capaz de unir 2 biotinas (es probable que la conjugación con la partícula bloquee alguna cantidad de los 4 sitios de unión), habiendo hasta 300-400 moléculas de NeutrAvidin™ unidas a cada marcador. Pero, con la medición de las partículas puras conjugadas con BSA, los cálculos muestran menos de 10 moléculas de biocitina-594 unidas en cada nanopartícula. Esto coincide con niveles muy bajos de unión no específica que cabría esperar por la conjugación de BSA (un reactivo de bloqueo común) con las partículas.

Ejemplo 6

Características de unión no específica

Como primera etapa de la caracterización, se diseñó un experimento sencillo para determinar si las SACN recubiertas con estreptavidina podían unirse específicamente a BSA biotinilada. Se recubrieron ocho pocillos de una placa de micropocillos de poliestireno con BSA biotinilada o BSA incubando con una solución al 0,5 % en PBS durante treinta minutos. Todos los pocillos se lavaron 4 veces con PBS durante 1 minuto y luego se bloquearon durante 30 minutos con un tampón PBS que contenía EDTA 1 mM, BSA al 0,1 % y Zwittergent 3-08 al 0,01 %. Después de aspirar la solución de bloqueo de cada pocillo, se añadieron 20 µl de muestra y 20 µl de PBS, y se incubaron durante 2 horas. Las muestras comprendían SACN recubiertas con neutravidina (NAv), SACN recubiertas con estreptavidina (SAv), SACN que habían sido modificadas con tiol (pero no conjugadas) y marcadores de control sin funcionalización del recubrimiento de sílice. Se lavaron los pocillos con tampón de bloqueo durante 15 minutos, seguido de PBS (3 x 5 min) y agua (3 x 1 min). Se dejaron secar, y se cuantificó la cantidad de marcador unido midiendo la absorbancia a 490 nm usando un lector de placa de micropocillos (datos no mostrados). Se sustrajeron los valores del fondo en función de la absorbancia media de los pocillos que no habían sido tratados. Los marcadores NAv y SAv se unieron con alta especificidad a los pocillos recubiertos con biotina y presentaron poca unión no específica con los pocillos recubiertos con BSA. Sin embargo, los marcadores recubiertos con tiol y los marcadores recubiertos con sílice convencionales mostraron bajos niveles de unión a todos los pocillos. Experimentos posteriores han demostrado que se puede evitar este fenómeno bloqueando las partículas mediante la

adición de una pequeña cantidad de BSA a las partículas, la centrifugación y la repetición de la suspensión en PBS. Tras determinar que los marcadores conjugados con SA_v y NA_v eran específicos de la biotina, se midió el número de sitios de unión a la biotina que estaban presentes en cada marcador mediante dos métodos. Un análogo fluorescente de biotina, la biocitina Alexa Fluor® 594, se hizo reaccionar con las SACN. Tras las etapas de lavado apropiadas, se determinó el número de fluoróforos unidos mediante la medición directa y por el agotamiento de la fluorescencia. Los valores obtenidos por los dos métodos fueron coherentes (Figura 12), aunque las mediciones directas de la fluorescencia siempre produjeron un número inferior. El número medio de biotinas unidas fue de aproximadamente 700 por nanopartícula en condiciones de reacción óptimas.

10 Ejemplo 7

Conjugación de oligonucleótidos

Se usó la misma química de sulfo-SMCC descrita anteriormente para unir oligonucleótidos con terminación amina a SACN modificadas con tiol. Tras la unión y la purificación, Se incubó una cadena complementaria marcada con colorante con las partículas modificadas. La cuantificación de la sonda fluorescente (tras la centrifugación para eliminar la sonda no unida) indicó que aproximadamente 15 oligonucleótidos estaban unidos a cada nanopartícula. Los oligonucleótidos se unieron directamente a los marcadores de NA_v, en los que los oligonucleótidos tenían un grupo de biotina en un extremo para la unión al marcador y un fluoróforo en el otro, para permitir una medición directa de la eficacia de la conjugación. Esto también produjo aproximadamente 15 oligonucleótidos conjugados por nanopartícula. Las SACN modificadas con amina se acoplaron a oligonucleótidos fluorescentes con terminación tiol usando la misma química de sulfo-SMCC descrita anteriormente, de nuevo con resultados similares.

25 Ejemplo 8

Dos características que se desean de los marcadores ópticos cuantitativos son que respondan linealmente a la fuente de excitación y que no se vean relativamente afectados por la exposición a la excitación a largo plazo. La primera cualidad se ha demostrado con las SACN mediante la exposición de una muestra a distintas cantidades de potencia de excitación y la medición de la señal resultante. Estos resultados se muestran en la Figura 9.

Para demostrar la fotoestabilidad, se depositó una muestra de SACN en un portaobjetos de cuarzo y se colocó en el soporte de muestras de un espectrómetro Raman. Para este experimento, el espectrómetro suministró 60 mW de potencia a 647,1 nm. La luz emitida se recogió a través de un objetivo de microscopio de 50 x 0,8 NA, se pasó a través de un filtro de muesca holográfica para rechazar la dispersión de Rayleigh, se enfocó en un monocromador de 0,5 m, y se detectó con un CCD enfriada con nitrógeno líquido. Los espectros se recogieron aproximadamente cada hora durante 6 horas, tiempo durante el que la muestra se iluminó de manera continua. En la Figura 10, se representa la señal de la muestra en función del tiempo. Estos datos muestran que estas partículas son bastante estables, con solo un 20 % de pérdida de señal a lo largo de 6 horas.

También es deseable la estabilidad térmica de las SACN. Para demostrar esto, se hirvieron dos lotes de SACN de BPE x1,5 (en 35 ml) durante una hora. (Los marcadores se concentraron a partir de 50 ml hasta 35 ml, hasta aproximadamente una concentración de 1,5 veces). Se registraron los espectros UV-Vis y de SERS antes y después de la ebullición. Las pequeñas diferencias en la absorbancia y la SERS antes y después de la ebullición son atribuibles principalmente a una ligera diferencia en la concentración. Las SACN no se ven sustancialmente afectadas por la ebullición.

50 Ejemplo 9

Evidencia de reproducibilidad de lote a lote

Para determinar la reproducibilidad de la preparación de marcadores de principio a fin del proceso, se preparó un total de 6 coloides y se marcaron como B-G. Estos coloides se usaron para preparar un total de 13 lotes diferentes de marcadores, usando protocolos idénticos para cada lote. Los espectros de absorción (normalizados) de estos coloides se muestran en la Figura 11 encontrada, y es evidente que son bastante similares una vez completadas todas las etapas.

Tras la normalización de la concentración equilibrando la densidad óptica de cada solución a 1,0, se midió la respuesta de SERS usando una excitación de 785 nm. Las señales de SERS se controlaron en el máximo principal (~1.200 cm⁻¹) (no mostrado). Usando todas las muestras, la desviación típica relativa del grupo es del 12,5 %. Si se elimina un valor atípico significativo, las doce muestras restantes presentan una desviación típica relativa del 7,5 %.

65 Ejemplo 10

A. Preparación de nanobarras anisotrópicas con diámetro de 18-90 nm

Se usaron moldes disponibles en el mercado con diferentes tamaños de poro (de 18 nm a 90 nm) para la

electrodeposición de nanobarras de Au anisotrópicas. La Ag evaporada, de aproximadamente 1 μm de espesor, sirvió como sustrato de metalizado. Inmediatamente antes de la electrodeposición, se ensambló el molde en la celda electroquímica y se empapó en una solución de recubrimiento de Ag al vacío doméstico durante 1 hora para garantizar la humectación adecuada de los poros, seguido de la electrodeposición en los poros de 1 μm de espesor de Ag nueva. Seguidamente, se produjo la electrodeposición de nanoalambres que consistían en tiras alternas de Au y Ag. Se usaron soluciones de metalizado comerciales: Cyless Silver (Technic, Inc.) y Microfab Au 100 (solución de Au a base de sulfito de Enthone-OMI, Inc.). Se determinó la longitud de los segmentos de Au según la relación de aspecto deseada de las nanobarras de Au; pudiendo estar la longitud de los segmentos de Ag en el intervalo de 10-200 nm; el número total de tiras por poro se determinó mediante la concentración final deseada (tras la liberación del molde) de nanobarras de Au/ml de solución.

Se usaron diferentes técnicas de recubrimiento dependiendo del diámetro de poro del molde. Para el diámetro de poro de 65 nm y 90 nm, se usó un sintetizador semiautomático para partículas de nanocódigos de barras en modo de corriente constante. Se ha demostrado el metalizado de nanoalambres de Au-Ag con 59 tiras (cada tira de 30 nm de longitud) metalizadas secuencialmente en un molde que conduce, tras la eliminación de la Ag, a 3×10^{11} nanobarras de Au/molde.

Se desarrolló un protocolo de liberación comenzando con la disolución de la Ag (sustrato y tiras de Ag) en ácido nítrico, seguida de la disolución del molde en NaOH. Para evitar la aglomeración de las nanobarras de Au liberadas, se añadió una molécula de SAM corta (monocapa autoensamblada) al NaOH durante la disolución del molde. Los ejemplos de moléculas cortas que contienen tiol son mercaptoetanol (ME), ácido mercaptopropiónico (MPA) y ácido mercaptoetanosulfónico (MESA). Estas moléculas cortas se reemplazaron luego por la molécula indicadora Raman. Un método alternativo que produjo mejores resultados fue introducir la molécula indicadora Raman directamente en el NaOH durante la disolución del molde. Se usaron satisfactoriamente 4-mercaptofenol (MP) y 2-quinolinetiol (QSH), y demostraron la señal Raman con nanobarras de Au. La Figura 12 muestra los espectros Raman de 65 x 30 nm y de 90 x 30 nm de partículas de Au liberadas en QSH. La Figura 13 ilustra los espectros Raman de 65 x 30 nm y de 90 x 30 nm de partículas de Au liberadas en MP.

El modo de electrodeposición de corriente constante no fue eficaz para los moldes con un diámetro de poro de 35 nm e inferior. Se pueden usar diferentes técnicas de metalizado por pulsos (corriente de pulsos, corriente de pulsos inversos y pulso doble). Usando moldes de policarbonato con diámetro del orificio en el intervalo submicrométrico, se ha aplicado con éxito la electrodeposición de corriente inversa con agitación ultrasónica para hacer crecer monocristales de Au a partir de soluciones de cianuro. Sin embargo, se depositó Au policristalino a partir de soluciones de sulfito de Au usando una variedad de condiciones de pulso inverso: Dobrev, D.; Vetter, J.; Angert, N.; Neumann, R.; *Electrochimica Acta* 2000, 45, 3117-3125. Ya se ha demostrado con anterioridad que la deposición potenciales pulsada a partir de la solución de sulfito de Au mejora la distribución del metal sobre las estructuras con patrón fotorresistente, pero no influye mucho en las propiedades (tensión, pureza, resistencia) de las películas de Au, lo que se explicó por la irreversibilidad del par de Au/Au (I) en soluciones de sulfito: Horkans, J.; Romankiw, L. T.; *J. Electrochem. Soc.* 1977, 124, 1499-1505.

Los parámetros de los pulsos (corriente del pulsos, frecuencia y ciclo de trabajo) se variaron de manera que la corriente media de metalizado fue algo baja (0,25-1 mA/cm²) para garantizar un crecimiento lento de las tiras de Au y Ag. El metalizado satisfactorio se logró en las siguientes condiciones de los pulsos del metalizado: corriente de pulsos de 2 mA/cm²; intervalo de frecuencia de 0,025-2,5 Hz y ciclo de trabajo de 0,1-0,3. Se usaron las mismas condiciones de los pulsos para las tiras de Au y Ag en un experimento. Se usó un potencióstato/galvanostato multicanal (Princeton Applied Research); tras el metalizado de cada tira, se cambió la solución, tras lo que se aclaró y se volvió a rellenar con la siguiente solución manualmente. Se ha demostrado el metalizado de 19 tiras alternas de Au/Ag que producen, tras la eliminación de la Ag, 3×10^{11} (3×10^{11}) nanobarras de Au/molde (35 nm de diámetro de poro) y 1×10^{12} (1×10^{12}) nanobarras de Au/molde (18 nm de diámetro de poro). La automatización del metalizado por pulsos puede aumentar aún más el número de partículas en otro orden de magnitud, porque el espesor del molde es de 50 μm . La Figura 14 muestra una imagen de TEM de nanobarras de Au con 35 nm de diámetro, liberadas en ME y el espectro Raman de las nanobarras tras el reemplazo del ME por QSH.

B. Preparación de partículas de Au anisotrópicas de 250 nm x 250 nm.

Se prepararon partículas de Au de 250 nm x 250 nm similares a las partículas de la parte A. Se usaron moldes de alúmina con un tamaño de poro de 250 nm para la electrodeposición de las nanopartículas de Au. La Ag evaporada, de aproximadamente 1 μm de espesor, sirvió como sustrato de metalizado. Se electrodepositó nueva Ag, de 5 μm de espesor, en los orificios para un sellado adicional del molde, seguido de la electrodeposición secuencial de nanoalambres que consistían en tiras alternas de Au y Ag, cada una de 250 nm de longitud. Se usaron soluciones de metalizado comerciales: Cyless Silver (Technic, Inc.) y Microfab Au 100 (Enthone-OMI, Inc.). Se usó un sintetizador semiautomático para partículas de nanocódigos de barras para el metalizado de 9 tiras de Au y Ag, cada una a una corriente constante de 1 mA. Se desarrolló un protocolo de liberación comenzando con la disolución de la Ag (sustrato y tiras de Ag) en ácido nítrico, seguida de la disolución del molde en hidróxido de sodio. Para evitar la aglomeración de las nanopartículas de Au liberadas, se introdujo una molécula indicadora Raman de tiol, 4-mercaptofenol (MP), previamente disuelta en etanol (EtOH), en el hidróxido de sodio durante la liberación. las etapas

de liberación fueron las siguientes:

1. 12 ml de HNO₃ al 40 %, 60 min
2. 2 ml de MP/EtOH 28 mM + 8 ml de NaOH 3 M/EtOH al 20 %/H₂O al 80 %, 30 min
- 5 3. 200 µl de MP/EtOH 28 mM + 800 µl de NaOH 3 M/EtOH al 20 %/H₂O al 80 %, 30 min
4. Centrifugación: 4200 rpm, 2 min
5. 3 aclarados con 200 µl de MP/EtOH + 800 µl de EtOH/H₂O (1: 4)
6. Centrifugación: 4200 rpm, 1 min después de cada muestra de SEM/TEM, 10 µl de cada
- 10 7. Muestra de 0,1 ml: se diluye 1 ml con H₂O para UV-vis
8. 2 aclarados con H₂O, centrifugación a 6.200 rpm, 10 min de cada
9. Adquisición de Raman

La concentración de partículas de Au tras la liberación fue de 5×10^9 /ml. Se volvieron a suspender las partículas de oro en etanol y se tomó una alícuota de 300 µl para el recubrimiento del vidrio. Se añadieron 490 µl de etanol, 160 µl de agua 18 MΩ, 10 µl de hidróxido de amonio al 30 % y 40 µl de tetraetilortosilicato (TEOS) puro a la alícuota de partículas de oro. Se sometió la muestra a ultrasonidos y se dispuso en un agitador vorticial en el ajuste más bajo para mezclar durante 45 minutos. Se aclaró la muestra tres veces en agua de 18 MΩ. La Figuras 15A y B muestran imágenes de SEM para las partículas anisotrópicas resultantes. Las Figuras 16A y B muestran una vista más de cerca de una sola partícula. En las Figuras 17A y B, se muestran los espectros Raman de las partículas.

Ejemplo 11

Inmunoensayo de tipo sándwich de IL7

25 Se simuló un experimento de micromatrices de proteínas imprimiendo anticuerpos de captura de IL-7 sobre un portaobjetos de micromatrices. Cada mancha tenía aproximadamente 500 µm por un lado y se repetía seis veces en cada sustrato de vidrio (impreso por Telechem, Inc., Sunnyvale, CA). Se usó una pluma hidrófoba para proporcionar una barrera de líquido en el portaobjetos de vidrio para que cada una de las seis manchas se pudiera tratar de forma independiente. Una vez seca la pluma, se bloqueó el portaobjetos durante al menos 60 minutos con albúmina de suero bovino al 5 % (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM. Todas las etapas de incubación y de lavado se llevaron a cabo en un balancín o agitador orbital, y se aspiraron las soluciones con una pipeta antes de añadir nuevas soluciones. Tras el bloqueo, se lavaron los portaobjetos 3 veces durante 5 minutos cada vez (3 x 5) con BSA/PBS al 0,5 %. Se prepararon antígenos en una solución de BSA/PBS al 0,5 % y se incubaron en las matrices durante de 45 minutos a 2 horas, tras lo que se lavaron una vez más las matrices (3 x 5) en BSA/PBS al 0,5 %. A continuación, se incubaron SACN modificadas con IL7 (usando anticuerpos biotinilados sobre SACN recubiertas con neutravidina) en las matrices durante 90 minutos. A esto, le siguió un lavado (3 x 5) en BSA/PBS al 0,5 % y aclarados rápidos en PBS y agua. Los portaobjetos se secaron por soplado con un chorro de gas nitrógeno inmediatamente después del aclarado con agua. Los espectros Raman de estas matrices se adquirieron usando un láser de diodo (785 nm, 200 mW) y un espectrómetro y el programa informático Ocean Optics USB-2000. El tiempo de integración típico para los espectros adquiridos en matrices de vidrio fue de dos segundos. Se usó la sustracción del fondo para eliminar el amplio fondo de vidrio de todos los espectros. Sin optimización, se logró un límite de detección de entre 10-100 pg/ml, Figura 18, que es comparable a muchos inmunoensayos enzimáticos comerciales. Luego, se demostró el potencial de los ensayos multiplexados, probando tres analitos diferentes (ovoalbúmina, bacilo *globigii* y proteína C reactiva) en manchas adyacentes de un chip de proteína. Los anticuerpos para cada antígeno se conjugaron con las SACN con diferentes moléculas indicadoras, dando partículas de Bg anti-BPE, Ova anti-QSH y CRP anti-Bodipy. Se expuso una matriz de manchas que contenían anticuerpos de captura contra los antígenos a una mezcla de los tres antígenos. Tras el aclarado apropiado, las manchas se expusieron a las tres SACN de detección. Después, se recogieron espectros Raman de cada una de las manchas. Los datos muestran una señal limpia en cada mancha, dando la mancha que fue diseñada para capturar CRP una fuerte señal de marcador Bodipy, por ejemplo.

Ejemplo 12

55 Se realizó un inmunoensayo de flujo lateral para la Tox. Bot., usando Tetracore, el cartucho de flujo lateral de Inc. (Gaithersburg, MD). En este experimento, se abrió el dispositivo, se retiró el lecho corto que contenía su reactivo de detección colorimétrico (que comprendía Au coloidal conjugado con un anticuerpo de detección) y se reemplazó por un conjugado que comprendía SACN conjugadas con el mismo anticuerpo (proporcionado por Tetracore). Los espectros Raman se recogieron usando el instrumento descrito anteriormente. Los datos muestran una unión no específica mínima y una captura exitosa del conjugado en presencia de antígeno, con un límite de detección no optimizado similar a su producto comercial. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Ejemplo 13

Tinción de células SK-BR3 con SACN

65 Se cultivaron células en un portaobjetos de cámara. Las células se lavaron con PBS tres veces, 1 min cada vez. Se

fijaron las células con formaldehído/PBS al 3,7 % durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron como anteriormente. Se bloquearon las células con BSA/PBS al 1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron las células con 1 µg/ml de anticuerpos anti-her2 de ratón (diluidos con tampón de bloqueo) durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron como anteriormente. Después, se incubaron las células con 1 µg/ml de IgG anti-ratón biotinilada durante 30 minutos, y se lavaron como anteriormente. Se incubaron las células con 50 µl de SACN conjugadas con estreptavidina x2 a temperatura ambiente durante 1 h, y se lavaron como anteriormente. Se añadió colorante Hoechst (diluido 1:500) y las células se incubaron durante 5 minutos. Se lavaron las células como anteriormente. Se montaron las células con un cubreobjetos usando glicerol al 90 % en PBS, y se sellaron los bordes con esmalte de uñas. La Figura 21A muestra imágenes de campo brillante y de SERS de la muestra resultante, y demuestran la unión de las SACN a ubicaciones específicas de la superficie celular y del interior de la célula.

Ejemplo 14

15 Detección de las SACN en muestras de tejido.

Las partículas de SACN también se pueden detectar en presencia de muestras de tejido teñidas con colorantes orgánicos muy coloreados. Por ejemplo, la hematoxilina y la eosina (H&E) son los colorantes convencionales usados para visualizar el tamaño y la forma de las células. Ambas moléculas presentan fluorescencia en la región visible, dificultando o imposibilitando el uso de métodos inmunohistoquímicos convencionales en la misma muestra. Sin embargo, con la excitación a 785 nm, se obtiene un fondo mínimo, haciendo que las SACN sean fácilmente visibles. Así pues, se trató una matriz de tejido de ratón de Zymed con H&E de acuerdo con protocolos de histopatología convencionales, dando lugar a manchas muy coloreadas. Se trataron varias manchas con polilisina y luego con SACN de BPE. La Figura 21B muestra los espectros Raman de manchas no tratadas y tratadas, que indican la facilidad con la que se pueden ver las SACN sobre un fondo de manchas de H&E. Por consiguiente, la presente invención proporciona 1. Un método que comprende poner en contacto una muestra de tejido con al menos una partícula SACN conjugada con una biomolécula capaz de unirse específicamente a la muestra de tejido; y adquirir una imagen Raman de la mezcla de tejido y partículas de SACN conjugadas con biomoléculas. El tejido se pone en contacto con uno o más reactivos no SACN adicionales, tales como la eosina, hemotoxilina, y una combinación de hemotoxilina y eosina. Se puede obtener la imagen Raman de fondo de una muestra de tejido y sustraerse de la imagen Raman de la mezcla de tejido y partículas SACN conjugadas con biomoléculas. Además, también se puede comparar la imagen Raman con una imagen de una muestra de tejido que se ha teñido con colorantes orgánicos muy coloreados para visualizar el tamaño y la forma de la célula, tal como una mancha de H&E.

35 Ejemplo 15

Marcaje *in vivo* de animales con SACN.

Se inyectaron SACN en ratones atímicos de 2 maneras: a) mediante la inyección en la cola para que circule en el torrente sanguíneo; y b) mediante la inyección subcutánea para su ubicación bajo la piel. En ambos casos, la sonda óptica se mantuvo sobre la piel y se detectó la señal Raman emitida desde debajo de la piel. Los máximos de las SACN se pudieron ver sobre el fondo. El sistema de detección portátil tenía un láser de excitación de 785 nm fabricado por Ahura Corp. Se suministraron 106 mW de luz a la muestra a través de una fibra óptica y la fabricación del cabezal óptico por InPhotonics Inc. La luz dispersada Raman se detectó con el mismo cabezal óptico. Un filtro dicróico envía la luz recogida a una segunda fibra óptica, conectada a un espectrómetro, Ocean Optics USB2000, con una hendidura de 50 micrómetros y 1.200 ranuras/mm de grátula marcada a 750 nm. Los datos del espectrómetro fueron recogidos por un ordenador portátil.

En el caso de a), la señal se detectó aproximadamente a los 45 minutos. En este momento, se detectó una señal cuando la sonda se mantuvo sobre el hígado del ratón, Figura 22. El espectro del marcador de SERS aparece sobre un fondo que es una mezcla de fluorescencia tisular y retrodispersión de Rayleigh. El fondo real medido depende de la posición de la sonda sobre la piel. Si la sonda está en contacto con la piel, entonces los espectros pueden contener una mayor fluorescencia tisular. Si la sonda está desplazada de la piel, los espectros pueden contener más retrodispersión de Rayleigh. Por ejemplo, en el caso de un espectro adquirido en el hígado y un espectro adquirido en el costado del ratón, los fondos son diferentes. Dado que el fondo puede variar, las SACN tienen una ventaja, ya que los marcadores se pueden cuantificar por la altura del máximo sobre el fondo.

En el caso de b), la señal se detectó inmediatamente después de la inyección, como se muestra en la Figura 23. La Figura 23 también contiene un espectro tomado de un ratón sin SACN, adquirido en el costado. La señal disminuiría con el tiempo a medida que el marcador se difundiera en el cuerpo del ratón. El espectro subcutáneo también contiene algo de fluorescencia de fondo y dispersión de Rayleigh, sin embargo, la señal de las SACN es mucho más potente sobre el fondo.

65 Ejemplo 16

Experimentos de formación de imágenes celulares multiplexados.

5 Se usará la estirpe celular LNCaP, una estirpe celular adherente, sensible a los andrógenos, derivada de un carcinoma de próstata humano. Las células LNCaP están disponibles en ATCC (Rockville, MD). Las células LNCaP son excelentes modelos para el cáncer de próstata. Hay varios anticuerpos disponibles en el mercado contra biomarcadores que se sabe que son importantes en el cáncer de próstata, tales como la alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR) y el antígeno prostático específico (PSA). Otros anticuerpos útiles como marcadores o controles incluyen anticuerpos contra CDH1, CTNNB1, CCND1, HPN, TP53, CDKN1B e BCL2.

10 Los anticuerpos contra estos marcadores se conjugarán con las SACN. Se realizarán experimentos de marcaje celular y de formación de imágenes en los que las células LNCaP se tratan con diversos compuestos y condiciones. Se controlará el efecto sobre la viabilidad celular y la localización espacial de las SACN conjugadas con anticuerpos.

15 Se usarán SACN conjugadas con los anticuerpos AMACR y los anticuerpos PSA para comparar la expresión de proteínas de AMACR y PSA en las estirpes celulares LNCaP, DU-145 and PC-3 según lo detallado por Kuefer, *et al.*, *Am J Pathol* 2002, 161, 841-48. Las células se tratarán con bicalutamida, un medicamento oral de la clase de los anti-andrógenos de tratamientos con fármacos recetados para el cáncer de próstata. LNCaP, una estirpe celular tumoral sensible a las hormonas, demuestra una expresión de AMACR más potente mediante análisis de transferencia Western que las estirpes celulares DU-145 y PC-3. Tras el tratamiento de las células LNCaP con bicalutamida, la expresión de la proteína AMACR en las células permanece invariable, mientras que el antígeno prostático específico, que se sabe que está regulado por andrógenos, demuestra una disminución de la expresión de la proteína. Se realizará la localización espacial de las SACN. En la formación de imágenes intracelulares, a diferencia de los experimentos de marcaje en la superficie, no es posible eliminar mediante lavado los marcadores que no se han unido. Por lo tanto, estos experimentos permitirán comprender qué sucede con el exceso de SACN que no se han unido a una diana específica dentro de la célula (por ejemplo, si esa diana está regulada negativamente, tal como el PSA en este ensayo).

30 Arnold, *et al.*, *Am.J.Physiol.Endocrinol Metab.* 2004, 288, E573-E584, publicaron recientemente un estudio sobre el efecto de la deshidroepiandrosterona (DHEA), un complemento dietético de venta libre, sobre la expresión génica y proteica de las células LNCaP. Descubrieron que la DHEA afectaba a la proliferación celular y aumentaba la expresión proteica del PSA, así como una serie de receptores de IGF. Usando SACN conjugadas con anticuerpos PSA y anticuerpos indicativos del crecimiento celular en células cancerosas, tales como CCND1 (ciclina D1), se investigará este sistema biológico. Las células se tratarán con DHEA, testosterona, ácido retinoico y 17-beta-estradiol (E2), y se compararán los resultados de las imágenes celulares con los publicados por Arnold *et al.*

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula compuesta activa espectroscópicamente potenciada superficialmente (SACN) que comprende:

- 5 a) una nanopartícula metálica anisotrópica;
 b) una molécula indicadora con actividad de SERS asociada a dicha nanopartícula metálica anisotrópica;
 c) SiO₂ encapsulando la nanopartícula metálica anisotrópica;

10 en donde la molécula indicadora con actividad de SERS se encuentra en la superficie de contacto entre la nanopartícula metálica y el encapsulante;
 opcionalmente, en donde el encapsulante de SiO₂ comprende además un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo -SH, un grupo -NH₂ y un grupo -COO⁻.

15 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula metálica anisotrópica tiene una forma seleccionada entre un esferoide, una barra, un disco, una pirámide, un cubo, un cilindro, una nanohélice, un nanomuelle, un nanoanillo, una nanopartícula en forma de barra, una nanopartícula en forma de flecha, una nanopartícula en forma de lágrima, una nanopartícula en forma de tetrápodo, una nanopartícula en forma de prisma, porosa y en forma no geométrica.

20 3. La nanopartícula de la reivindicación 2, en donde la nanopartícula tiene forma no geométrica y se aproxima a una nanobarra.

4. La nanopartícula de la reivindicación 3, en donde la nanopartícula tiene un diámetro de 250 nm y una longitud de 250 nm.

25 5. Un método que comprende:
 a) proporcionar un microscopio acoplado a una cámara CCD;
 b) proporcionar una célula;
 30 c) poner en contacto la célula con al menos una SACN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y capaz de unirse específicamente a la célula o a una parte de la célula;
 d) proporcionar un dispositivo de filtrado del número de onda entre la célula y la cámara;
 e) adquirir una pluralidad de conjuntos de datos; y
 f) ensamblar los conjuntos de datos;

35 mediante lo que se adquiere un perfil espacial de la SACN.

40 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho dispositivo de filtrado del número de onda se selecciona entre un monocromador, un filtro de muesca, una rueda de filtro, filtro sintonizable acústico-óptico, filtro de interferencia de transformada de Fourier, un filtro sintonizable de cristal líquido y combinaciones de los anteriores; opcionalmente, en donde dicho dispositivo de filtrado del número de onda comprende un filtro sintonizable de cristal líquido, y dicha adquisición comprende:

- 45 a) adquirir datos a una primera frecuencia; y
 b) opcionalmente, adquirir datos a una segunda frecuencia y frecuencias posteriores.

7. El método de la reivindicación 5, en donde dicha adquisición comprende:

- 50 a) dispersar la luz desde un solo punto de una ubicación a través de un monocromador;
 b) adquirir el espectro Raman completo de ese punto en un detector de matriz; y
 c) repetir a) y b) en múltiples ubicaciones.

8. El método de la reivindicación 5, en donde dicha adquisición comprende:

- 55 a) excitar la muestra con una línea de radiación;
 b) adquirir el espectro completo de cada píxel espacial de la línea; y
 c) explorar la línea a través de la muestra.

9. Un método que comprende:

- 60 a) poner en contacto una muestra de tejido con al menos una partícula SACN conjugada con una biomolécula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y capaz de unirse específicamente a la muestra de tejido; y
 b) adquirir una imagen Raman de la mezcla de tejido y partículas SACN conjugadas con biomoléculas.

65 10. El método de la reivindicación 9, que comprende además:

c) adquirir una imagen Raman de fondo de una muestra de tejido antes de la etapa a) de la reivindicación 9; y
d) sustraer el espectro de fondo de la imagen Raman de la mezcla de tejido y partículas SACN conjugadas con biomoléculas adquirida en la etapa b).

5 11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el tejido se pone en contacto con uno o más reactivos no SACN adicionales.

10 12. El método de la reivindicación 11, donde dicho reactivo adicional se selecciona entre eosina, hemotixilina, y una combinación de hemotixilina y eosina.

15 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende además comparar la imagen Raman con una imagen de una muestra de tejido que se ha teñido con colorantes orgánicos fuertemente coloreados para visualizar el tamaño y la forma de la célula.

14. Un método que comprende:

20 a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un analito con al menos una pareja de unión específica del analito en una superficie de ensayo de flujo lateral para unirse al analito en la muestra;
b) previa, simultánea o posteriormente a la etapa a), unir al menos una pareja de unión del analito con una SACN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
c) detectar una señal de SERS mediante la que se determina la presencia del analito en la muestra según la intensidad o presencia de la señal, mediante lo que se determina la presencia de al menos un analito en la muestra.

25 15. Un método de detección de un analito que comprende:

30 a) obtener una muestra biológica; y
b) poner en contacto la muestra con una SACN bioconjugada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y que comprende una biomolécula que se une al analito (SACN bioconjugada); y
c) detectar el analito unido a dicha SACN bioconjugada.

35 16. El método de la reivindicación 15, en donde la biomolécula y el analito son secuencias de nucleótidos complementarias.

17. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde la muestra se selecciona entre sangre, suero, saliva, esputo, lágrimas, sudor, otro fluido secretado, orina, materia fecal, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, un extracto celular y una célula.

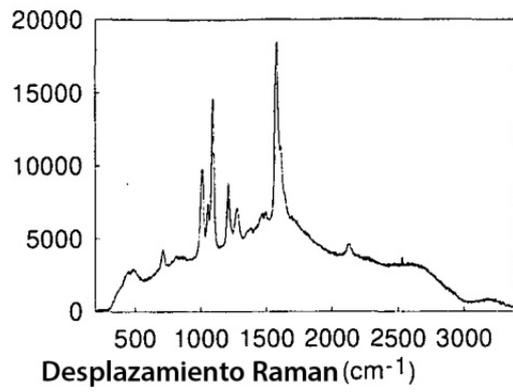


Figura 1

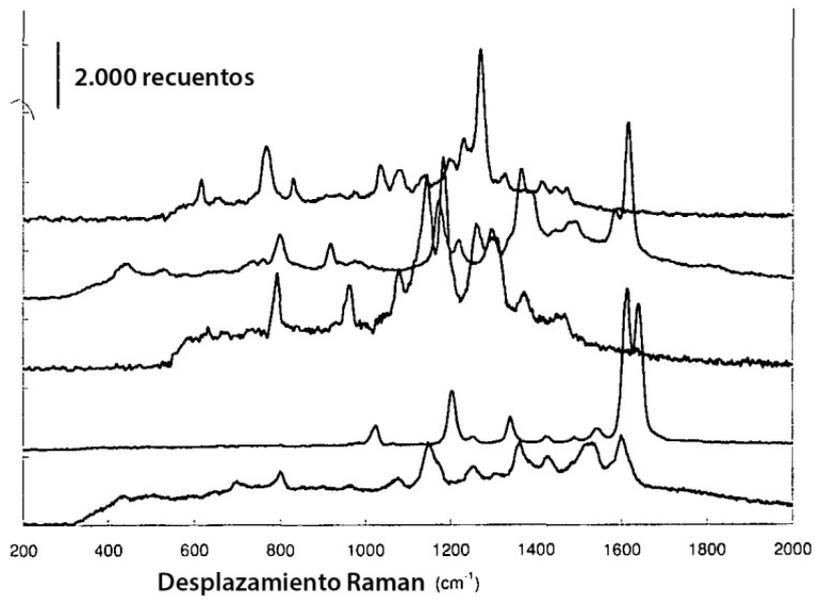


Figura 2

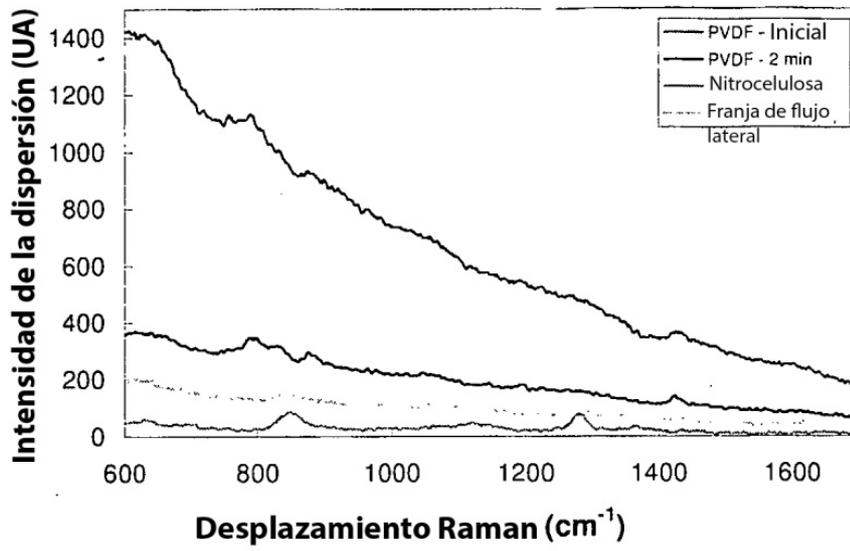


Figura 3

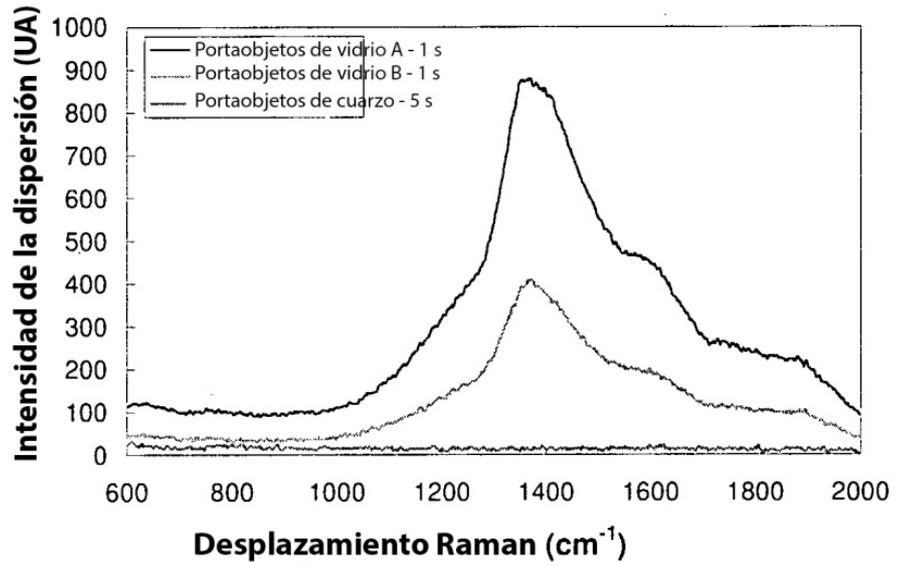


Figura 4

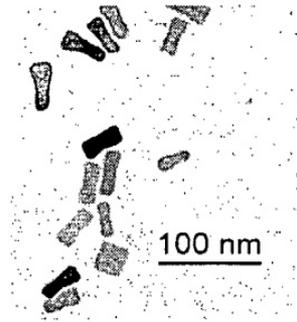


Figura 5

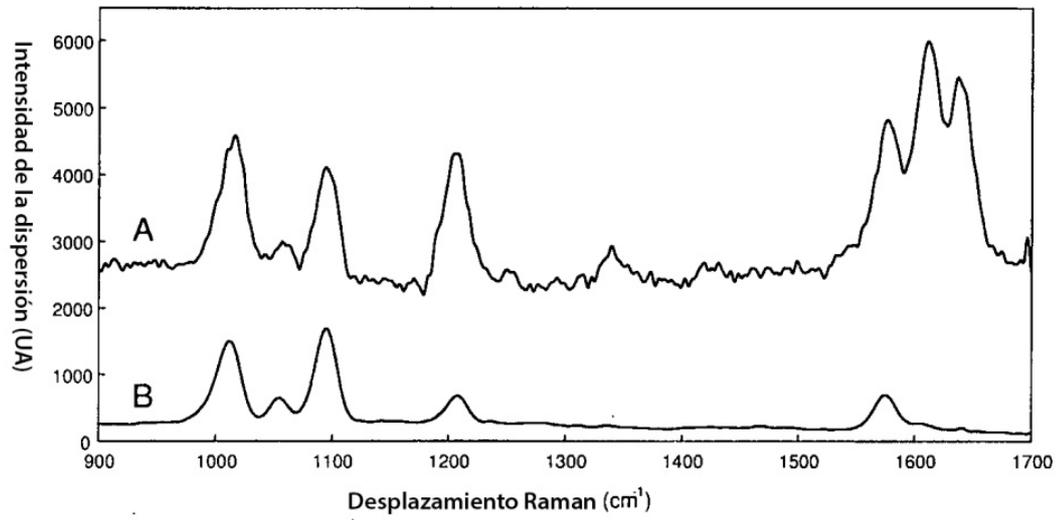


Figura 6

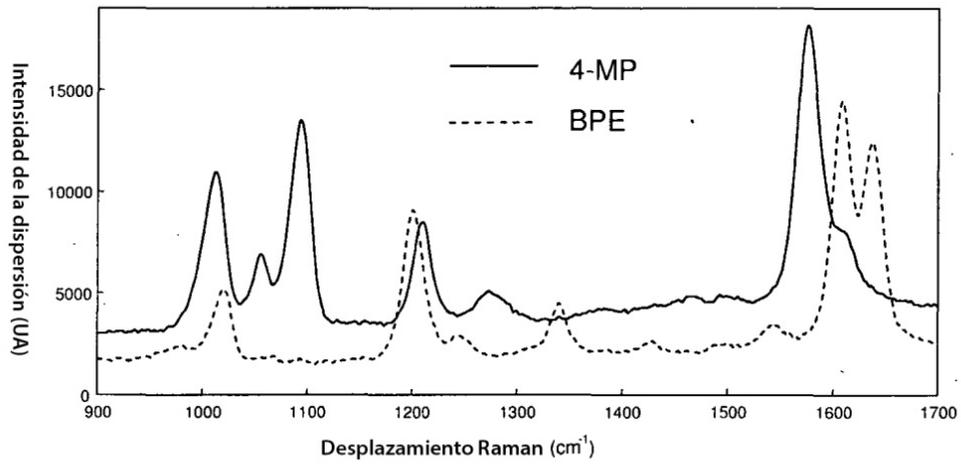


Figura 7

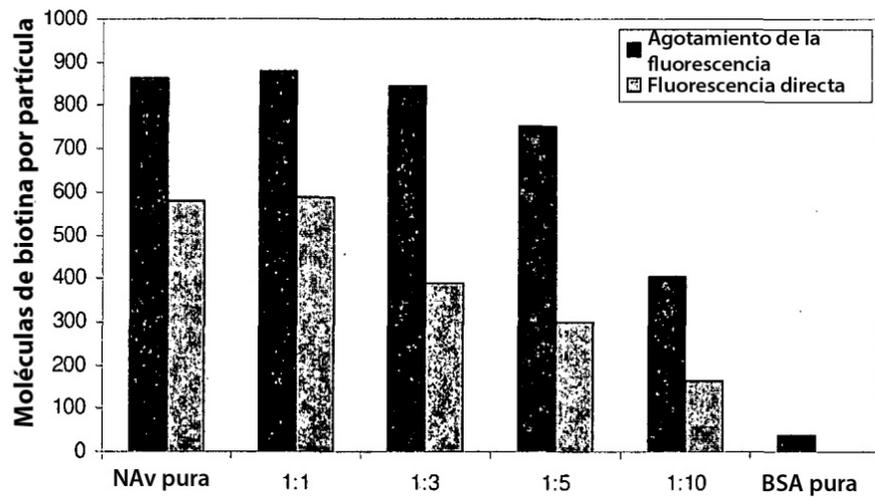


Figura 8

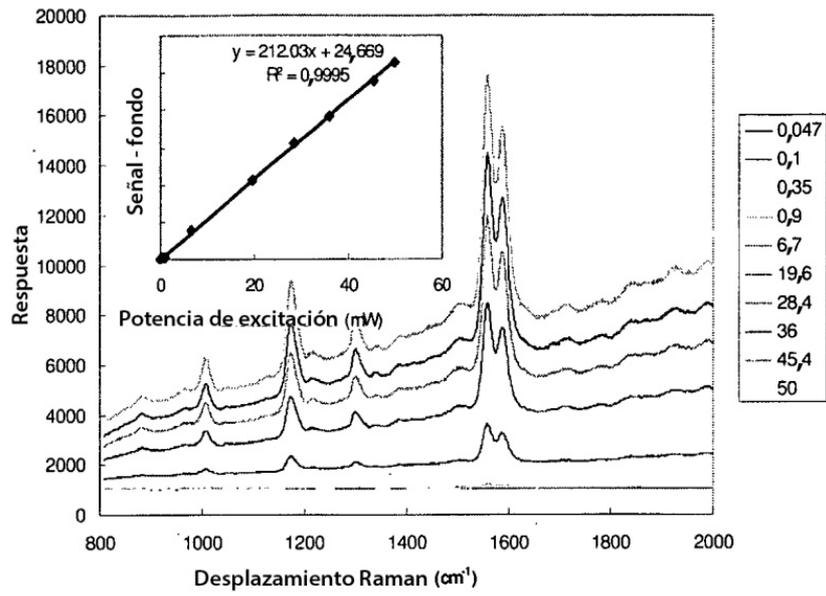


Figura 9

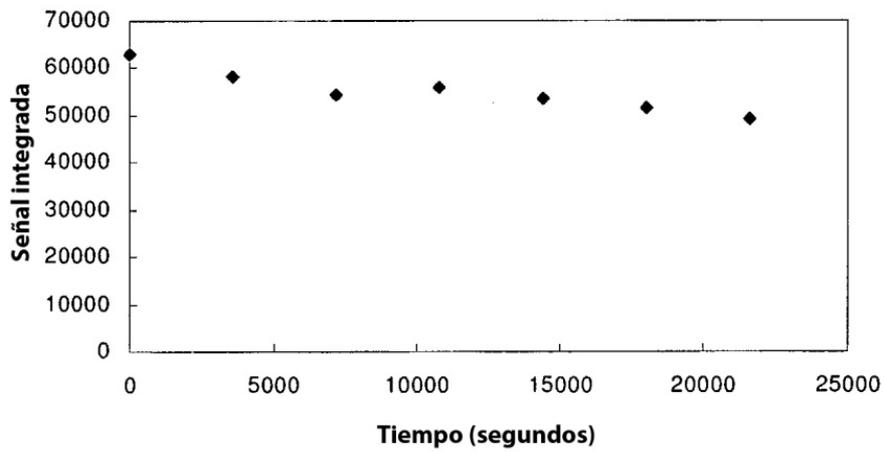


Figura 10

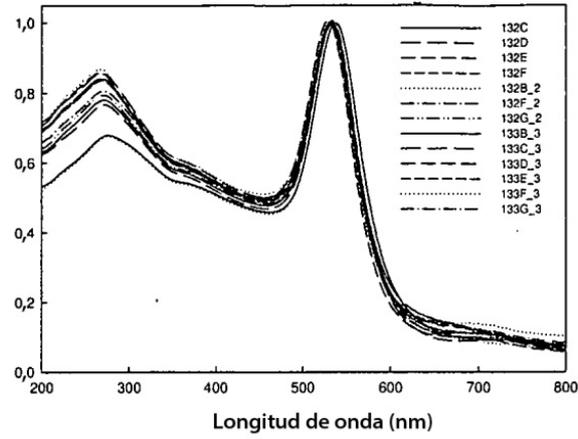


Figura 11

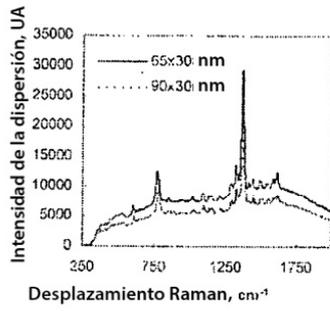


Figura 12A

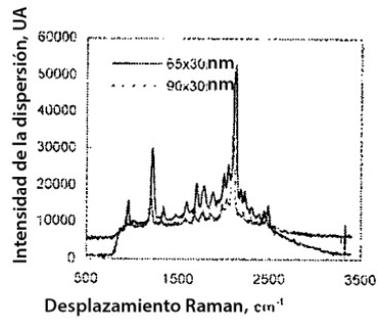


Figura 12B

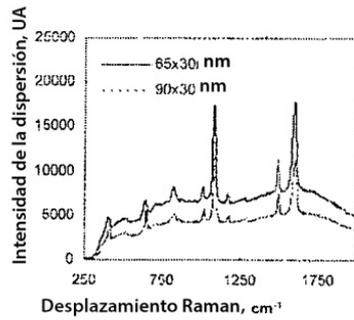


Figura 13

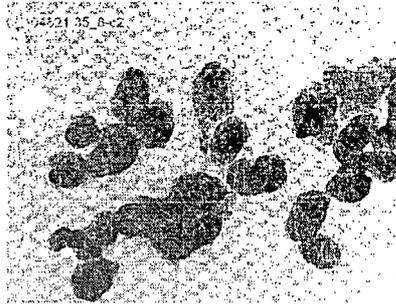


Figura 14A

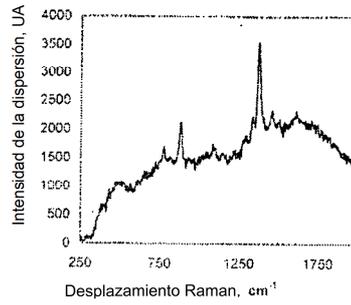


Figura 14B

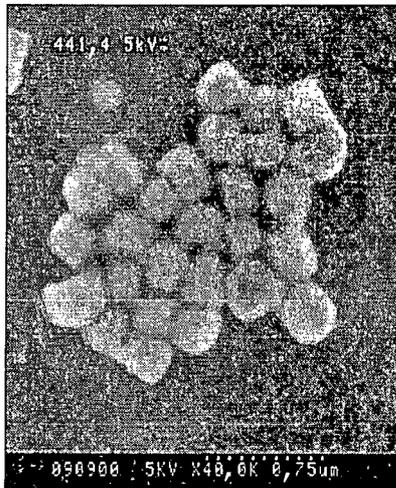


Figura 15A

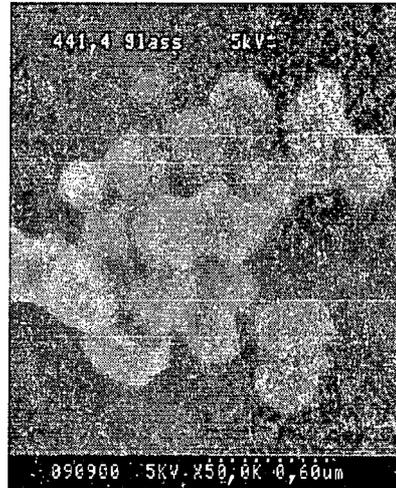


Figura 15B

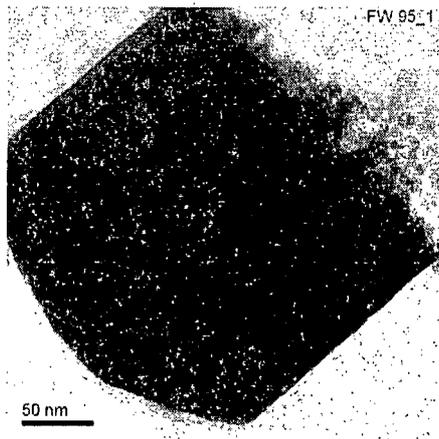


Figura 16A

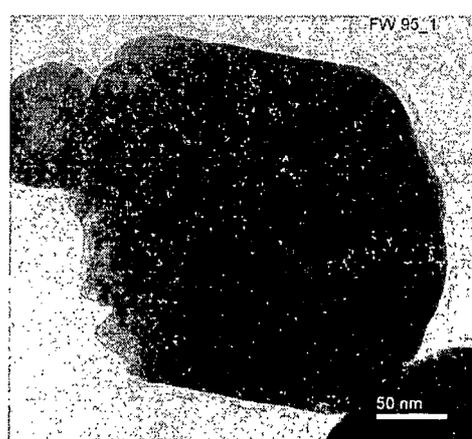


Figura 16B

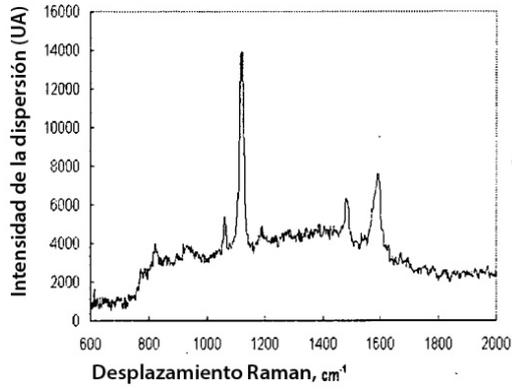


Figura 17A

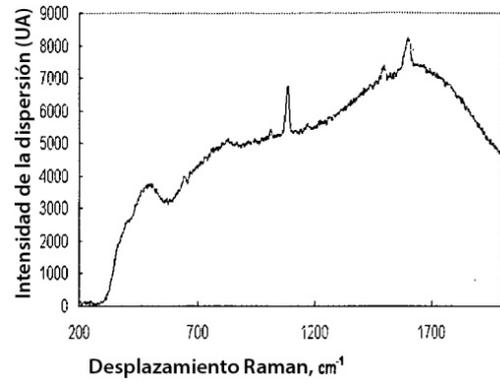


Figura 17B

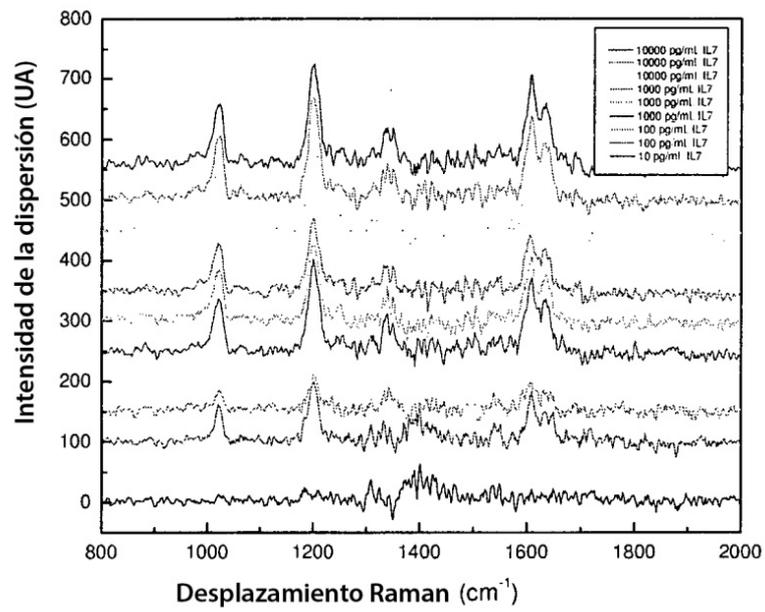


Figura 18

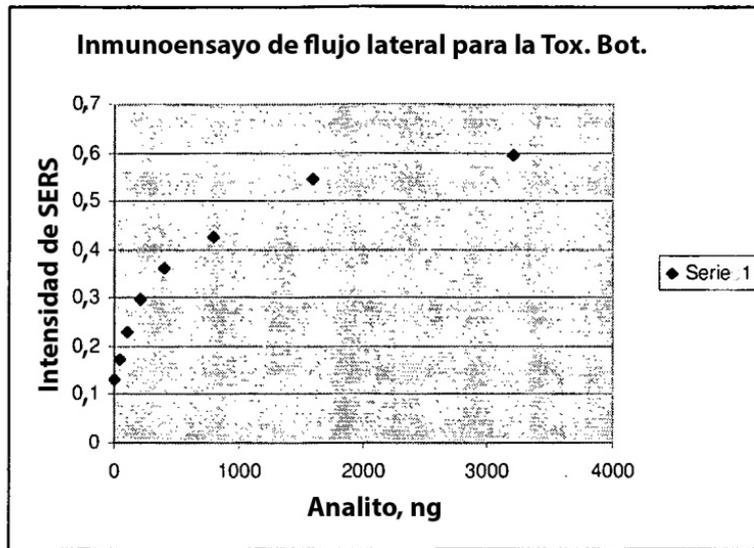


Figura 19

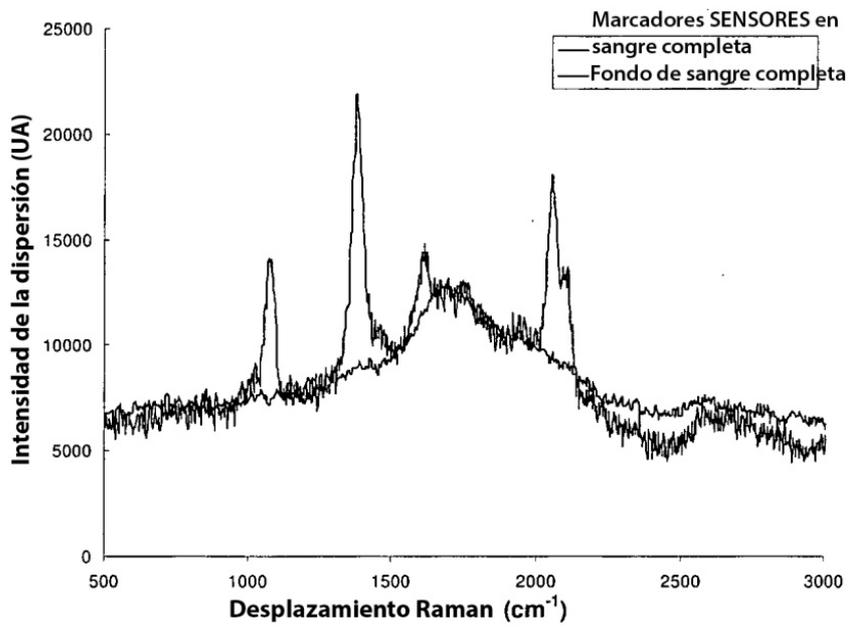


Figura 20

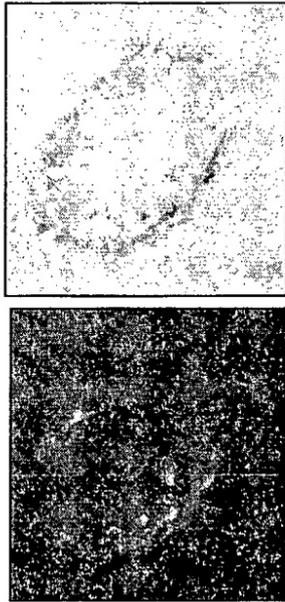


Figura 21A

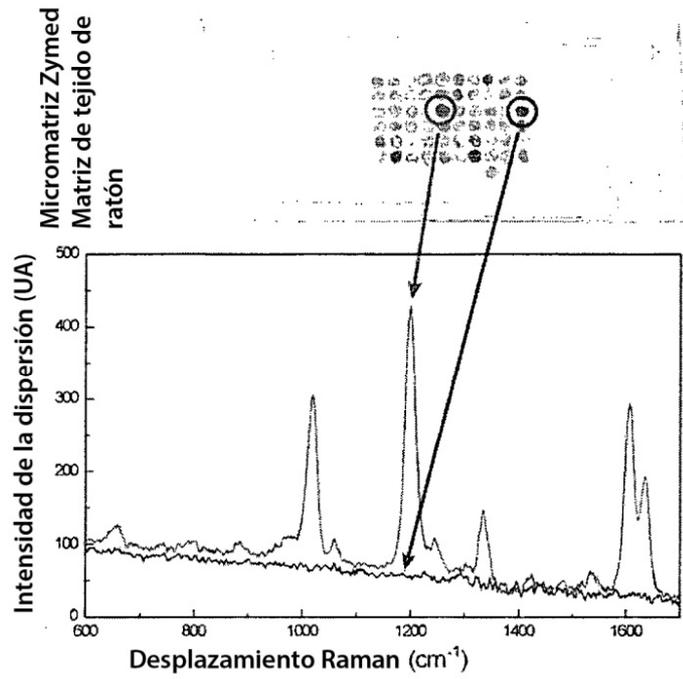


Figura 21B

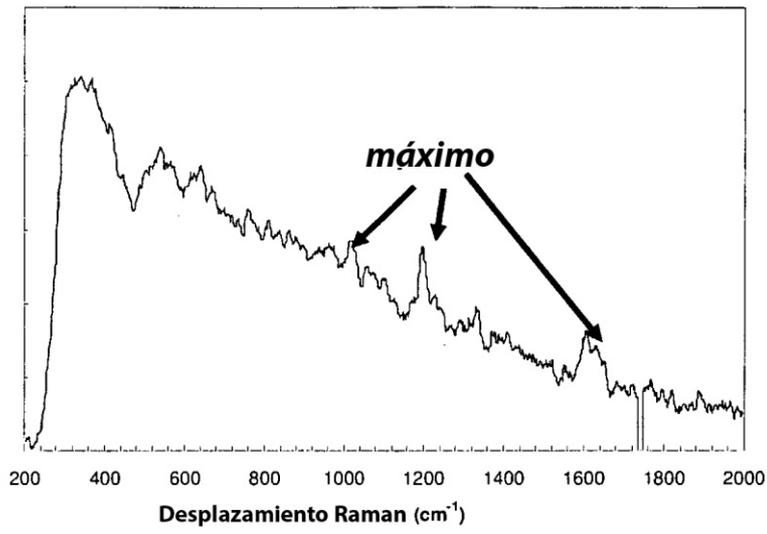


Figura 22

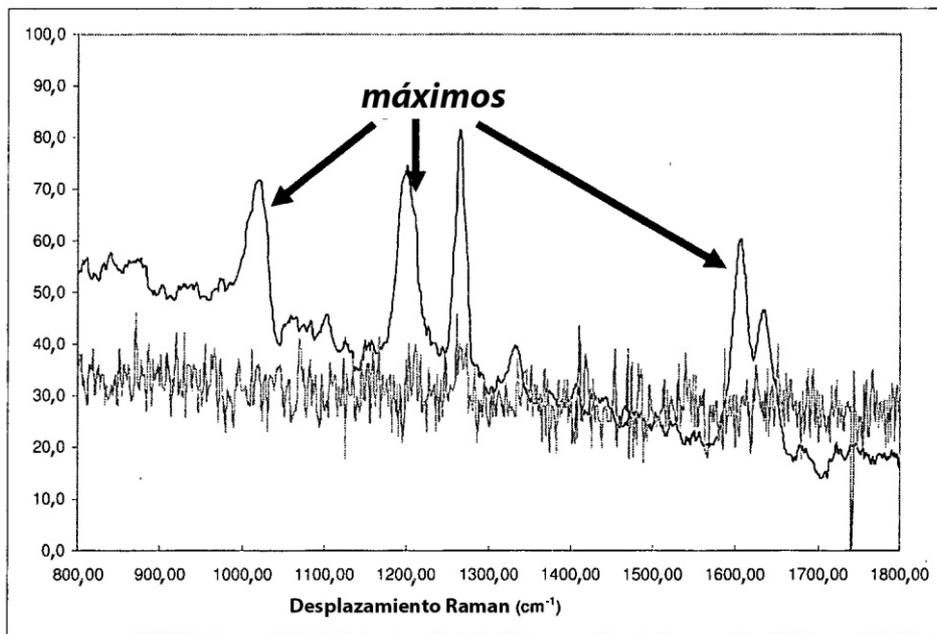


Figura 23