

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 543**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/552** (2014.01)

**G01N 21/27** (2006.01)

**B82Y 15/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/US2013/062189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13841044 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2901136**

54 Título: **Calibración de nanoestructuras plasmónicas individuales para la biodetección cuantitativa**

30 Prioridad:

**28.09.2012 US 201261706867 P**

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

**26.06.2020**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY (100.0%)  
Office of Naval Research, 875 North Randolph Street, Suite 1425  
Arlington, VA 22203, US**

72 Inventor/es:

**RAPHAEL, MARC P.;  
CHRISTODOULIDES, JOSEF A. y  
BYERS, JEFF M.**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**ES 2 769 543 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

Calibración de nanoestructuras plasmónicas individuales para la biodetección cuantitativa

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la biodetección cuantitativa y a la formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizada (RPSL).

10 **Técnica antecedente**

La utilización de la resonancia de plasmón superficial localizada (RPSL) observada en nanoestructuras metálicas para la biodetección sin marcadores es relativamente reciente, pero su aplicabilidad ya ha demostrado ser de largo alcance. Los primeros estudios fueron principalmente una prueba de hipótesis, demostrando técnicas que tenían la sensibilidad para detectar la unión de pares receptores-ligandos bien caracterizados, tales como estreptavidina y biotina. (A. B. Dahlin et al., *Anal. Chem.*, 78, (13), 4416-4423 (2006); A. J. Haes et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (35), 10596-10604 (2002); A. J. Haes et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, (7-8), 920-930 (2004); N. Nath et al., *Anal. Chem.*, 74, (3), 504-509 (2002); J. C. Riboh et al., *J. Phys. Chem. B*, 107, (3), 1772-1780 (2003); y P. Englebienne, *Analyst*, 123, (7), 1599-1603 (1998)). Les siguieron más estudios aplicados, tales como la detección de liposomas y anticuerpos relacionados con el Alzheimer. (A. B. Dahlin et al., *Adv. Mat.*, 20 (8), 1436-+ (2008); A. J. Haes et al., *Nano Letters*, 4, (6), 1029-1034 (2004); A. J. Haes et al., *Laser Focus World*, 41, (6), 105-+ (2005)). Las aplicaciones han crecido en sofisticación de manera que la RPSL ahora se ha aplicado a ELISA potenciado con plasma (S. Chen et al., *Nano Letters*, 11, (4), 1826-1830 (2011)), biodetección basada en interferometría (J. Feng et al., *Nano Letters*, 12, (2), 602-609 (2012)), ensayos basados en células (T. Endo et al., *Analytica Chimica Acta*, 614, (2), 182-189 (2008)) y la medición de cambios conformacionales de proteínas (W. P. Hall et al., *Nano Letters*, 11, (3), 1098-1105 (2011)) por nombrar algunos. (A. Abbas et al., *Biosens. Bioelectron.*, 26, (5), 1815-1824 (2011); A. J. Haes et al., *MRS Bulletin*, 30, (5), 368-375 (2005); J. Zhao et al., *Nanomedicine*, 1, (2), 219-228 (2006); C. Yu et al., "Quantitative evaluation of sensitivity and selectivity of multiplex nanoSPR biosensor assays", *Biophys. J.*, 93, (10), 3684-92).

Los avances en instrumentación y análisis ahora permiten realizar muchas de estas mediciones en nanoestructuras individuales, abriendo la puerta a aplicaciones de formación de imágenes en las que cientos o miles de nanoestructuras se miden en paralelo. (S. Chen et al., *Nano Letters*, 11, (4), 1826-1830 (2011); M. P. Raphael et al., *Anal. Chem.*, 84, (3), 1367-1373 (2012); N. C. Lindquist et al., *Lab on a Chip*, 9, (3), 382-387 (2009)). Por tanto, la formación de imágenes por RPSL tiene el potencial de aprovechar las dimensiones a nanoescala de cada sensor para cartografiar variaciones espacio-temporales complejas en la concentración de analito, tales como las que se encuentran en las aplicaciones de células vivas (Y. X. Huang et al., *Anal. Chem.*, 83, (12), 4394-4406 (2011)) y J. M. Kita et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, (5), 491-496 (2008)) y para habilitar matrices proteómicas altamente compactas y multiplexadas que requieren volúmenes de muestra de solo microlitros. (T. S. Gujral et al., *Sci. Signal*, 2, (94) (2009)). Debido a que las mediciones son sin marcadores, la formación de imágenes por RPSL evita la tarea de marcar el analito, que lleva mucho tiempo, y elimina las complicaciones basadas en la fluorescencia, tales como el fotoblanqueo y la inactivación.

Un obstáculo para la realización de estas aplicaciones es que cada nanoestructura debe calibrarse individualmente, de manera que su respuesta al analito pueda analizarse cuantitativamente. Es decir, la nanoestructura individual debe ir más allá de ser un detector de analito, que es la norma actual, hasta el punto en que pueda usarse como instrumento para la cuantificación de parámetros bioquímicos importantes, tales como las constantes de velocidad cinética y la concentración de analito. La calibración secuencial de cientos o miles de nanoestructuras individuales, sin embargo, lleva mucho tiempo y es poco práctica. Por tanto, la calibración debe realizarse en una formación de imágenes, o modo discontinuo, que permita la recopilación y el análisis simultáneo de datos en una colección de nanoestructuras. Para el análisis cuantitativo, un parámetro clave que ha de determinarse para cada nanoestructura es la ocupación fraccionaria dependiente del tiempo de receptores unidos a la superficie,  $f(t)$ . Una vez conocida, pueden usarse ajustes a  $f(t)$  para determinar las constantes de velocidad cinética si se conoce la concentración de analito o, por el contrario, para determinar la concentración si se conocen las constantes de velocidad.

55 **Divulgación de la invención**

La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Proporciona un procedimiento para calibrar múltiples nanoestructuras en paralelo para la biodetección cuantitativa usando un chip para la biodetección y la formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizada (RPSL). El chip es un cubreobjetos de vidrio compatible para su uso en un microscopio convencional con al menos una matriz de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas perfiladas sobre el mismo mediante nanolitografía de haz de electrones. El chip se usa para recopilar datos de imágenes de RPSL basados en dispositivos acoplados a carga (basados en DAC) de cada nanoestructura individual y datos espectrales de RPSL de la matriz. Los datos espectrales se usan para determinar la ocupación fraccionaria de receptores unidos a la superficie en nanoestructuras de la matriz. Los datos de las imágenes se modelan en función de la ocupación fraccionaria de la matriz para determinar la ocupación fraccionaria

de los receptores unidos a la superficie en cada nanoestructura individual. Esta calibración, que supone una concentración uniforme de analito, permite el cartografiado de la ocupación fraccionaria de receptores unidos a la superficie en nanoestructuras individuales con sensibilidad nanomolar y una resolución temporal de 225 ms.

5 Algunas características y ventajas de la presente invención incluyen:

- La fabricación de las matrices mediante litografía con haz de electrones permite la producción de nanoestructuras altamente uniformes, como se confirma mediante el tamaño y las caracterizaciones espectrales.
- Pueden calibrarse cientos de nanoestructuras individuales en paralelo.
- 10 • Está integrada en una configuración convencional de microscopía de campo amplio que incorpora una serie de otras técnicas de formación de imágenes, tales como fluorescencia, contraste de interferencia diferencial y formación de imágenes de campo claro.
- El modo de formación de imágenes del microscopio RPSL permite resoluciones espaciales limitadas solo por el tamaño de las nanoestructuras. El tamaño de las nanoestructuras perfiladas puede estar en un intervalo de 15 50 nm a 150 nm. Puede seleccionarse la forma de las nanoestructuras entre rectángulos, cuadrados, discos, óvalos o cualquier combinación de los mismos.
- La resolución temporal del modo de formación de imágenes es de cientos de milisegundos, lo que permite medir procesos biocinéticos rápidos.
- 20 • Los entornos complejos pueden controlarse sin biodeposición de suciedad en el detector, tales como los que se encuentran en la microscopía de células vivas.

Estas y otras características y ventajas de la invención, así como la propia invención, se comprenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones y los dibujos adjuntos.

## 25 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1(a) es un diagrama de la configuración de formación de imágenes y espectroscopia en la que P1 y P2 son polarizadores cruzados, DH es un divisor de haz 50/50 y PL es un filtro de paso largo con un límite de 30 593 nm. El recuadro muestra un barrido por MFA de una matriz testigo fabricada sobre el mismo chip. La FIG. 1(b) muestra dos espectros de un estudio de unión específica en el que se introdujeron 200 nM de anti-c-myc sobre la matriz funcionalizada con c-myc (10  $\mu$ l/min). El espectro de  $f_{inicial}$  (negro) se tomó antes de que se introdujese el anti-c-myc y el espectro de  $f_{final}$  (gris) después de una hora de exposición. La FIG. 1(c) muestra espectros normalizados de 18 nanoestructuras individuales tomados al aire. Los espectros individuales se superponen (curvas de color gris) y se comparan con el promedio del conjunto (curva de color negro).

La FIG. 2 muestra la medición del curso de tiempo de la formación de imágenes por RPSL de un estudio de unión específica de anti-c-myc 200 nM. La FIG. 2(a) muestra la intensidad media para toda la matriz (RDI cuadrada de color gris claro, 84 x 84 píxeles). La FIG. 2(b) muestra la intensidad media de una nanoestructura individual (RDI cuadrada de color negro, 4 x 4 píxeles). La FIG. 2(c) muestra una comparación de las respuestas normalizadas de toda la matriz y la nanoestructura individual. En las FIG. 2(a) y (b) también se representan los resultados de un estudio de deriva que precedió a la introducción del analito (cuadrados de color negro). Las imágenes de recuadros en las FIG. 2(a) y (b) muestran una imagen de DAC potenciada por contraste de la matriz que destaca las variaciones en las intensidades de las nanoestructuras. Todos los estudios se realizaron en medio sin suero a una caudal de 10  $\mu$ l/min.

La FIG. 3(a) muestra un mapa de respuestas de fondo,  $B(r_i)$  y la FIG. 3(b) muestra un mapa de respuestas lineales,  $A(r_i)$ , de la matriz para el estudio de anticuerpos anti-c-myc recogidos, calculado para cada píxel de la imagen (RDI: 1 x 1 píxel). La calibración se realizó inmediatamente después del estudio de anticuerpos recogidos inyectando 250 nM de anti-c-myc comercial en medio sin suero. Se superpuso una cuadrícula de cuadrados de 4 x 4 píxeles para demarcar la ubicación de las nanoestructuras en las imágenes.

La FIG. 4(a) muestra un mapa de estimación de error de  $\sigma_i$  para el estudio de anticuerpos recogidos anti-c-myc, calculado mediante una ventana de la RDI deslizante de 4 x 4 píxeles (410 x 410 nm), representada para las desviaciones entre  $f$  y  $f_s$  que varían de 0 a 0,1. Se muestran cuatro representaciones de RDI seleccionadas en las FIG. 4(b)-(e) para ilustrar las desviaciones asociadas a un  $\sigma_i$  dado. El color de los puntos de datos de la RDI se corresponde con el de la etiqueta cuadrada de la RDI en el mapa de respuesta con (b)  $\sigma_i = 0,03$  (c)  $\sigma_i = 0,05$  (d)  $\sigma_i = 0,10$  y (e)  $\sigma_i = 0,42$ . La línea discontinua vertical indica cuándo se inyectaron los 250 nM de anti-c-myc comercial.

## 60 Mejor modo de realizar la invención

La presente invención proporciona una técnica de formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizada (RPSL) y de análisis que permite la calibración de cientos de nanoestructuras de oro individuales en paralelo. La calibración permite el cartografiado de la ocupación fraccionaria de receptores unidos a la superficie en nanoestructuras individuales con una resolución temporal de 225 ms. Algunas características de la presente invención son (1) la fabricación de las matrices mediante litografía de haz de electrones para la producción de

nanoestructuras altamente uniformes, como se confirma mediante caracterizaciones espectrales y de tamaño (2) la medición simultánea de espectros e imágenes y (3) la combinación de los datos espectrales y de imágenes en un formalismo de análisis que permite la determinación de la ocupación fraccionaria de receptores unidos a la superficie en nanoestructuras individuales,  $f(r,t)$ , donde  $r$  indica la ubicación sobre el sustrato y  $t$  indica el tiempo. Además, la técnica es totalmente compatible con las técnicas de microscopía de fluorescencia y de CID y puede usarse en entornos de fluidos complejos como medio sin suero sin degradación de los detectores.

Usando la presente invención, las *imágenes* de nanoestructuras individuales pueden codificar la misma información que la medición conjunta de toda la matriz medida *espectroscópicamente*. En otras palabras, si la matriz se somete a una distribución espacial uniforme de analito, la respuesta óptica de las regiones de interés (RDI) de tamaño de nanoestructura puede calibrarse con la de la ocupación fraccionaria conjunta encontrada mediante espectroscopía. No es obvio que esto sea posible puesto que la imagen resume toda la información espectral y las nanoestructuras individuales pueden someterse a procedimientos estocásticos que se promedian cuando se usa toda la matriz. Usando una matriz de cuatrocientas nanoestructuras, se demostró que esta técnica permite la detección cualitativa de anticuerpos anti-c-myc disponibles en el mercado con resolución de nanoestructura individual usando solamente una cámara de DAC. Usando la misma matriz de nanoestructuras, se detalla la metodología de calibración que permite la cuantificación de las mediciones basadas en DAC para la determinación de  $f(r,t)$ . Como demostración de la aplicabilidad de esta técnica a la biología molecular y celular, la matriz calibrada se usó para la formación de imágenes por RPSL cuantitativa de anticuerpos anti-c-myc que se recogieron de la estirpe celular de hibridoma 9E10 sin la necesidad de su posterior purificación o procesamiento. Todos los experimentos se realizaron en el mismo medio sin suero (MSS) utilizado para aplicaciones de cultivo celular.

#### Fabricación y funcionalización de las nanoestructuras

Las nanoestructuras se fabricaron en cubreobjetos N.º 1,5 de vidrio de borosilicato de 25,4 mm de diámetro mediante litografía con haz de electrones (LHE). Las estructuras eran circulares en sección transversal con un diámetro de  $70 \pm 5$  nm,  $75 \pm 2$  nm de altura, y se perfilaron en matrices de 20 x 20 con una separación de 400 nm. El paso entre las matrices puede estar en un intervalo de 150 nm a 1000 nm. El chip se limpió mediante calcinación con plasma en una mezcla de un 5 % de hidrógeno y un 95 % de argón y después se funcionalizó mediante inmersión en una solución de tiol de dos componentes (0,5 mM), que consiste en una relación 3:1 de SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-EG<sub>3</sub>-OH (SPO) con respecto a SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (SPN), durante 18 horas (Prochimia, Polonia). El componente SPN de la capa de SAM se hizo reaccionar en primer lugar con una solución 10 mg/ml del agente reticulador heterobifuncional sulfo-N-succinimidil-4-formilbenzamida (Sulfo-S-4FB, Solulink) en solución salina tamponada con fosfato 100 mM (PBS 100 mM, Thermo Scientific) y después se conjugó con el péptido c-myc (HyNic-c-myc-tag, Solulink) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adaptaron células de hibridoma que secretan anti-c-myc (MYC1-9E10.2, ATCC) al crecimiento en medio sin suero que contiene un 1 % de antibiótico/antimicótico mediante la reducción secuencial y gradual del contenido de suero fetal bovino durante un período de cultivo de un mes. La secreción de los anticuerpos monoclonales 9E10.2(anti-c-myc) se confirmó y se cuantificó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un conjugado de péptido BSA-c-myc (~7 péptidos c-myc por BSA) como antígeno inmovilizado (recubierto durante la noche a 5 µg/ml en PBS 100 mM a 4 °C). Los detalles de la fabricación de nanoestructuras mediante LHE, procedimiento de calcinación con plasma y aplicación de la capa de SAM se describen en M. P. Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84 (3), 1367-73 (2012). Las matrices de nanoestructuras pueden regenerarse, por ejemplo, mediante calcinación con plasma.

#### Configuración óptica

Las imágenes de RPSL basada en DAC, así como los espectros de RPSL, se recogieron en una geometría de luz reflejada con un microscopio invertido (Zeiss Axio Observer) usando iluminación Koehler, un objetivo de inmersión en aceite 63X, de apertura numérica (AN) 1,4 y polarizadores cruzados para reducir la contribución de fondo de la luz dispersada por sustrato. Se obtuvieron imágenes y espectros simultáneamente colocando un divisor de haz en el puerto de salida del microscopio (FIG. 1a) y se colocó un filtro de paso largo con una longitud de onda límite de 593 nm antes de la cámara de DAC. Para las mediciones espectrales, la imagen enfocada de toda la matriz de nanoestructuras se proyectó en el extremo de una fibra óptica de 600 µm de diámetro y los espectros se midieron posteriormente con un espectrofotómetro enfriado termoeléctricamente basado en DAC (Ocean Optics QE65000). El tiempo de integración del espectrofotómetro fue de 4 segundos. Para la obtención de imágenes, la imagen enfocada de la matriz se proyectó en una cámara de DAC enfriada termoeléctricamente con píxeles de 6,45 x 6,45 µm de tamaño (Hamamatsu ORCA R<sup>2</sup>) y un tiempo de integración de marco de 225 ms. Se describen detalles de cómo se optimizó la configuración anterior para la formación de imágenes de alto contraste de las nanoestructuras de oro en M. P. Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84 (3), 1367-73 (2012). El analito se introdujo en condiciones de flujo continuo usando una célula microfluídica a medida con un caudal de 10 µl/min. La platina del microscopio estaba equipada con un inserto controlado por temperatura que mantenía la temperatura de la platina y el tren de luz óptica a  $28,0 \pm 0,04$  °C (PeCon GmbH). En estas condiciones, las desviaciones en las direcciones x, y y z fueron inferiores a 3 nm/min. Para el análisis de datos, todos los cuadros se alinearon en x e y usando un algoritmo de alineación de procesamiento de imágenes disponible en el mercado (Zeiss Axiovision).

### Biodetectores cualitativos con nanoestructuras individuales

Las imágenes, así como los espectros de RPSL se obtuvieron simultáneamente haciendo pasar la luz reflejada a través de un divisor de haz (DH) 50/50 como se muestra en la FIG. 1(a). La FIG. 1(b) muestra dos espectros de un estudio de unión específica en el que se introdujeron 200 nM de anti-c-myc sobre una matriz funcionalizada de c-myc a una caudal de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . El espectro de  $f_{\text{inicial}}$  (negro) se tomó antes de que se introdujera el anti-c-myc y el espectro de  $f_{\text{final}}$  (gris) se tomó después de una hora de exposición. El desplazamiento de color gris característico de la posición máxima y el aumento correspondiente en los recuentos de 605 nm a 750 nm son indicativos de un cambio local en la constante dieléctrica del medio provocado por la unión específica del anticuerpo anti-c-myc. (A. B. Dahlin et al., "Improving the instrumental resolution of sensors based on localized surface plasmon resonance", *Anal. Chem.*, 78, (13), 4416-23 (2006) y W. P. Hall et al., "A Conformation-and Ion-Sensitive Plasmonic Biosensor", *Nano Lett.*, 11, (3), 1098-1105 (2011)). Aunque el control del desplazamiento máximo es actualmente el procedimiento más común para detectar la unión de analito, se ha demostrado que es el aumento de la intensidad dispersa en una porción grande de este tipo del espectro de resonancia lo que permite determinar espectroscópicamente la ocupación fraccionaria de la matriz, mientras se habilita simultáneamente la formación de imágenes por RPSL a través de la cámara de DAC. (M. P. Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84 (3), 1367-73 (2012)).

La calibración de cientos de nanoestructuras en modo discontinuo requiere que las propiedades espectrales de las nanoestructuras individuales se parezcan mucho a las del promedio del conjunto de matrices. Los estudios topológicos de las nanoestructuras mediante AFM revelaron pequeñas variaciones en la forma de la nanoestructura debido al procedimiento de fabricación (FIG. 1(a) recuadro). Para investigar las variaciones espectrales correspondientes entre nanoestructuras individuales, se realizó una espectroscopía de nanoestructura individual usando microespectroscopía de campo oscuro al aire en una fila testigo de 18 nanoestructuras fabricadas sobre el mismo chip que la matriz utilizada para la biodetección. Los resultados, resumidos en la FIG. 1(c), muestran que aunque podrían discernirse pequeñas variaciones en la forma, la amplitud y la longitud de onda resonante, el espectro de casi todas las nanoestructuras fue similar al promedio del conjunto. En las imágenes de DAC, estas distribuciones pueden manifestarse como una distribución de intensidades, como se muestra en los recuadros de la FIG. 2, que han sido potenciado por contraste para destacar las variaciones de intensidad.

La FIG. 2 detalla el curso de tiempo de un estudio de unión específica de anti-c-myc 200 nM medida mediante imágenes de RPSL y muestra una técnica de análisis de imágenes directa para controlar cualitativamente la cinética hasta la nanoestructura individual. La FIG. 2(a) muestra los recuentos potenciados de la unión para toda la matriz (84 x 84 píxeles) calculados a partir de la intensidad media de los píxeles unidos dentro del cuadrado de la región de interés (RDI) de color gris claro:

$$I(r_i, t_n) = \frac{1}{m_i} \sum_{\vec{x} \in r_i} I_{\text{imagen}}(\vec{x}, t_n) \quad (1)$$

en la que  $m_i$  es el número de píxeles en la RDI indicada como  $r_i$  y  $t_n$  es el punto temporal. También se muestra un estudio de deriva que precedió a la introducción del analito (cuadrados de color negro) en el que el MSS fluyó sobre la matriz durante 30 minutos a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . A diferencia de los tampones simples, el MSS normalmente contiene cualquier cantidad entre 50 mg/l a 1000 mg/l de proteínas adicionales tales como albúmina, transferrina e insulina, que potencialmente pueden bio-ensuciar los detectores. A pesar de esta presencia, las mediciones demostraron una deriva mínima y se mantuvo la sensibilidad al analito. Se realizaron estudios adicionales que mostraron estudios de unión no específica mínima entre el anticuerpo y la superficie funcionalizada con SAM usando un instrumento de resonancia de plasmón superficial Bio-Rad XPR36.

La FIG. 2(b) representa los mismos dos experimentos, pero ahora la RDI comprende solamente una nanoestructura individual, seleccionada por una RDI cuadrada de 4 x 4 píxeles (410 x 410 nm) que se muestra en negro cerca del centro de la matriz. La respuesta relativa de la nanoestructura se compara directamente con la de toda la matriz en la FIG. 2(c) representando los recuentos normalizados:  $[I(r_i, t_n) - I(r_i, t_0)] / [I(r_i, t) - I(r, t_0)]$  donde  $I(r_i, t_0)$  es el promedio de los primeros veinte puntos temporales y  $I(r_i, t)$  es el promedio de los últimos veinte puntos temporales. Este mismo enfoque directo de la RDI puede aplicarse a cualquier nanoestructura en la matriz, proporcionando cuatrocientos nanodetectores independientes y sin marcadores dentro del área de 8  $\mu\text{m}$  x 8  $\mu\text{m}$ .

La FIG. 2(c) destaca que la respuesta dentro de las ROI a nanoescala normalmente está en consonancia excelente con la de toda la matriz. Por tanto, si puede calibrarse toda la matriz para la determinación de la ocupación fraccionaria,  $f(t)$ , esta respuesta homogénea en principio puede utilizarse para calibrar simultáneamente las nanoestructuras individuales. Al principio, esto puede parecer sorprendente dada la probabilidad de que los receptores unidos a la superficie sobre cualquier nanoestructura dada tengan una distribución espacial no homogénea y respuesta al analito. (K. M. Mayer et al., "A single molecule immunoassay by localized surface

plasmon resonance", *Nanotechnology*, 21, (25) (2010) y G. J. Nusz et al., "Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod", *Anal. Chem.*, 80, (4), 984-989 (2008)). Es razonable, sin embargo, dado que tanto la teoría de la adsorción de secuencia aleatoria (E. L. Hinrichsen et al., "Geometry of random sequential adsorption", *J. Stat. Phys.*, 44, (5-6), 793-827 (1986)) como las estimaciones experimentales usando superficies de oro funcionalizadas de forma similar (S. Chen et al., "Plasmon-Enhanced Colorimetric ELISA with Single Molecule Sensitivity", *Nano Lett.*, 11, (4) 1826-1830 (2011) y I S Jung et al "Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers", *Langmuir*, 16, (24), 9421-9432) (2000)) están de acuerdo en que las nanoestructuras de este tamaño pueden acomodar cientos de proteínas, promediando de este modo el efecto de dichas inhomogeneidades. A continuación se presenta el análisis sobre cómo esta observación cualitativa puede prolongarse en un formalismo de análisis de datos que permita la determinación cuantitativa de la ocupación fraccionaria dentro de las imágenes.

**Biodetectores cuantitativos con nanoestructuras individuales**

Los inventores han publicado anteriormente una metodología que permite la determinación de la ocupación fraccionaria de toda la matriz a partir de los datos espectrales, indicada en el presente documento como  $f_s(t)$ . (M. P. Raphael et al., "A New Methodology for Quantitative LSPR Biosensing and Imaging", *Anal. Chem.*, 84 (3), 1367-73 (2012)). En resumen, el número de recuentos a la longitud de onda,  $\lambda$ , acumulado por el espectrómetro durante el intervalo de tiempo  $t_n$  puede escribirse como un modelo de respuesta lineal con ruido de recuento de Poisson,  $\eta_{poisson}$ , en términos de  $f_s$  para una monocapa unida específicamente que altera la resonancia de plasmón superficial localizada:

$$N\lambda(t_n) = g(t_n) \cdot [a_{\lambda f_s(t_n)+b_{\lambda}}] + \eta_{poisson} \tag{2}$$

Los parámetros del modelo  $a_{\lambda}$  y  $b_{\lambda}$  representan la respuesta dieléctrica dependiente de la longitud de onda provocada por el analito unido y el fondo inicial de la matriz de RPSL, respectivamente. El coeficiente global dependiente del tiempo,  $g(t_n)$ , se establece inicialmente en uno al comienzo del experimento, pero puede explicar los procesos de deriva y salto que provocan variaciones en la intensidad de la luz dispersa sin dependencia de la longitud de onda. Generalmente,  $g(t_n)$  es 1 y puede ignorarse en la mayoría de las situaciones. Para una matriz de nanoestructura y condiciones experimentales dadas,  $b_{\lambda}$  se determina cuando no hay analito presente al comienzo del experimento y  $a_{\lambda}$  se determina mediante la inyección de una inyección saturante de concentración conocida al final del experimento. Las funciones dependientes del tiempo  $g(t_n)$  y  $f_s(t_n)$  pueden determinarse mediante regresión no lineal en un modelo de ruido de Poisson para los recuentos en cada intervalo de tiempo,  $t_n$ .

Para evaluar si las imágenes de nanoestructuras individuales pueden capturar la información de ocupación fraccionaria encontrada en la espectroscopía de matriz completa, se propone un modelo generativo simple para determinar cómo se forman los datos de las imágenes, similar al utilizado en el análisis de los datos de espectroscopía:

$$I(r_i, t_n) = A(r_i) \cdot f_i(r_i t_n) + B(r_i) + \eta_{poisson} \tag{3}$$

En este caso los parámetros del modelo  $a_{\lambda}$  y  $b_{\lambda}$  se representan análogamente mediante los parámetros espacialmente dependientes  $A(r_i)$  y  $B(r_i)$  para la determinación de la ocupación fraccionaria a partir de los datos de las imágenes,  $f(r_i, t_n)$ . Puesto que el tamaño de la matriz es pequeño en comparación con la longitud de difusión del analito durante el tiempo de exposición de la cámara de DAC, la concentración es eficazmente uniforme. Esto permite determinar  $A(r_i)$  y  $B(r_i)$  a través de una regresión lineal multivariante configurando  $f_i(r_i, t_n) = f_s(t_n)$ , por tanto, calibrando toda la matriz a través de imágenes. Una vez que se calibra la matriz, la ocupación fraccionaria no homogénea puede estimarse como:

$$\hat{f}_i(r_i, t_n) = \frac{I(r_i, t_n) - B(r_i)}{A(r_i)} \tag{4}$$

Con el fin de determinar si este tratamiento relativamente simple de los datos de las imágenes es eficaz, la varianza en la respuesta local,  $\hat{f}_i(r_i, t_n)$ , de la matriz de nanoestructuras de  $f_s(t_n)$  sobre las RDI puede calcularse:

$$\sigma^2(r_i) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |\hat{f}_i(r_i, t_n) - f_s(t_n)|^2 \tag{5}$$

El mapa de imágenes resultante mostrará qué partes de la matriz son susceptibles de calibrarse para la determinación de la ocupación fraccionaria local.

Como ejemplo de la aplicabilidad de este enfoque a la biología molecular y celular, se demostró la determinación de

la ocupación fraccionaria frente al tiempo a la nanoescala con respecto a los anticuerpos secretados contenidos en el sobrenadante de las células de hibridoma MYC1-9E10.2 cultivadas. El experimento de anticuerpos recogidos se realizó simplemente centrifugando las células a 3000 rpm durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante y aplicando esa solución a las nanoestructuras a través de la configuración microfluidica a una caudal de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La concentración de anticuerpos anti-c-myc secretados en el sobrenadante se determinó independientemente mediante ELISA y era de 9 nM. La calibración de nanoestructura se realizó como se ha descrito anteriormente mediante la introducción de una concentración conocida de anti-c-myc comercial (250 nM) sobre las nanoestructuras inmediatamente después del experimento de anticuerpos recogidos.

La FIG. 3 muestra los mapas de respuesta de  $B(r_i)$  y  $A(r_i)$  de un área de 12,4 x 12,4  $\mu\text{m}$  centrada alrededor de la matriz para cada píxel de la imagen (RDI: 1 x 1 píxel). Se superpuso una cuadrícula de cuadrados de 4 x 4 píxeles (410 x 410 nm) sobre cada mapa para demarcar la ubicación de cada nanoestructura de las imágenes. En la FIG. 3(a), las regiones oscuras del mapa de coeficientes para el término de fondo,  $B(r_i)$ , están altamente correlacionadas con las nanoestructuras más brillantes en la imagen de DAC (recuadro de la FIG. 2), como cabe esperar para la contribución de fondo al ajuste. El mapa de coeficientes para el término de respuesta lineal,  $A(r_i)$ , se muestra en la FIG. 3(b). De nuevo, las respuestas positivas más fuertes se encuentran dentro de los cuadrados de la cuadrícula y, por tanto, se correlacionan con las ubicaciones de las nanoestructuras. La optimización se repitió usando una ventana de RDI deslizando del mismo tamaño que la cuadrícula (4 x 4 píxeles), lo que tenía la ventaja de aproximar estrechamente el tamaño de la imagen limitada por difracción de las nanoestructuras. Además, esta RDI más grande promedió la presencia de una ligera deriva de  $\sim 2$  píxeles (1,7 nm/min) que se produjo en el curso de la ejecución de 2 horas.

Los resultados de la calibración y análisis de la RDI deslizando de 4 x 4 píxeles se resumen en la FIG. 4. La FIG. 4(a) muestra el mapa de estimación de error de  $\sigma_i$ , que presenta las desviaciones entre  $f_i$  y  $f_s$  en forma de un mapa en escala de grises. La forma de la matriz se reproduce claramente en el mapa debido al hecho de que solo dentro del área de la matriz  $f_i$  y  $f_s$  están dentro de una consonancia razonable. De hecho, estableciendo la escala de  $\sigma_i$  en el mapa entre 0 y 0,1, los inventores demuestran que más del 75 % del área abarcada por la matriz puede calibrarse bien con la ocupación fraccionaria determinada espectroscópicamente. Para ilustrar las desviaciones entre  $f$  y  $f_s$  asociadas a un  $\sigma_i$ , dado, los datos de las RDI específicas se representan en las FIG. 4(b)-(e) con,  $\sigma_i = 0,03$ ,  $\sigma_i = 0,05$ ,  $\sigma_i = 0,10$  y  $\sigma_i = 0,42$ , respectivamente. El color de los puntos de datos de la RDI se corresponde con el de la etiqueta cuadrada de la RDI en el mapa de respuesta y la línea discontinua vertical indica el final de la ejecución del anticuerpo anti-c-myc recogido, en cuyo punto se inyectaron 250 nM de anti-c-myc comercial. Existe una consonancia excelente entre los dos para  $\sigma_i \leq 0,05$ , que se deteriora un poco a  $\sigma_i = 0,1$ , mientras que no hay correlaciones estadísticamente significativas para la RDI ubicada fuera de la matriz.

Los resultados en la FIG. 4 demuestran que para la mayor parte (más del 75 %) de la matriz,  $f_i$  puede determinarse dentro del 10 % de  $f_s$  usando las RDI de un tamaño similar al de la imagen limitada por difracción de cada nanoestructura. Incluso con la reproducibilidad de fabricación mediante LHE, sin embargo, no fue posible calibrar toda el área de la matriz dentro de este intervalo de error. Sin embargo, esto no es un impedimento, puesto que una gran ventaja de este enfoque es que aquellas RDI que no se calibran dentro de una especificación establecida simplemente pueden ignorarse, mientras que las que sí, pueden usarse para el análisis cuantitativo. Por tanto, esta técnica de formación de imágenes por RPSL permite la caracterización cuantitativa y sin marcadores de sobrenadante celular con una preparación mínima y sensibilidad nanomolar, utilizando cientos de nanoestructuras calibradas independientemente dentro de las especificaciones del usuario. En su forma actual, esta tecnología prepara el escenario para futuras aplicaciones en matrices de proteómica de alta densidad, así como para la formación de imágenes de gradientes de concentración de analito en entornos complejos de células vivas.

Las descripciones anteriores son las de las realizaciones preferidas de la invención. Son posibles diversas modificaciones y variaciones a la luz del contenido anterior sin apartarse del espíritu y los aspectos más amplios de la invención. Por tanto, ha de comprenderse que la invención reivindicada puede ponerse en práctica de forma distinta a la descrita específicamente. No debe interpretarse ninguna referencia a elementos reivindicados en singular, por ejemplo, usando los artículos "un", "una", "el", "la", o "dicho" y "dicha", como una limitación del elemento al singular.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de calibración de múltiples nanoestructuras en paralelo para la biodetección cuantitativa, que comprende las etapas de:

5           usar un chip para la biodetección y la formación de imágenes por resonancia de plasmón superficial localizada, que comprende un cubreobjetos de vidrio compatible para su uso en un microscopio convencional, en el que al menos una matriz de nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas se ha perfilado sobre el cubreobjetos de vidrio usando nanolitografía de haz de electrones;

10          introducir analito en condiciones de flujo continuo;

          recopilar datos de imágenes de resonancia de plasmón superficial localizada basados en dispositivos acoplados a carga de cada nanoestructura individual;

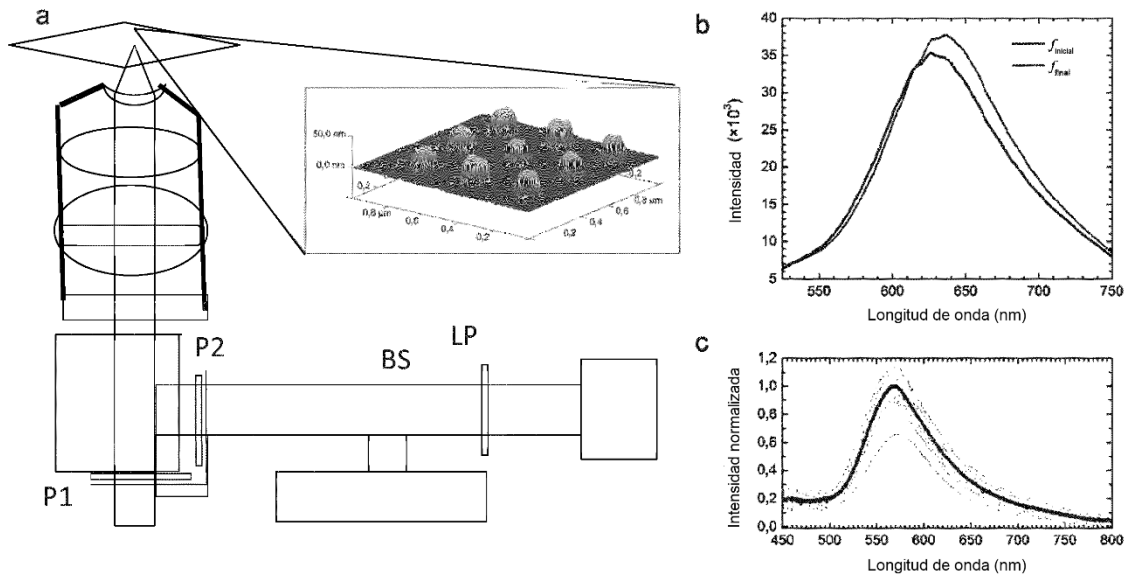
          y simultáneamente recopilar datos espectrales de resonancia de plasmón superficial localizada de la matriz y usar estos datos espectrales para determinar una ocupación fraccionaria de receptores unidos a la superficie en nanoestructuras de la matriz; modelar los datos de imágenes en función de la ocupación fraccionaria de la matriz; y

15          determinar la ocupación fraccionaria de los receptores unidos a la superficie en cada nanoestructura sobre la base de modelar los datos de imágenes, en el que el procedimiento para calibrar supone una concentración uniforme de analito.

20

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las nanoestructuras plasmónicas funcionalizadas comprenden nanoestructuras plasmónicas de oro funcionalizadas.





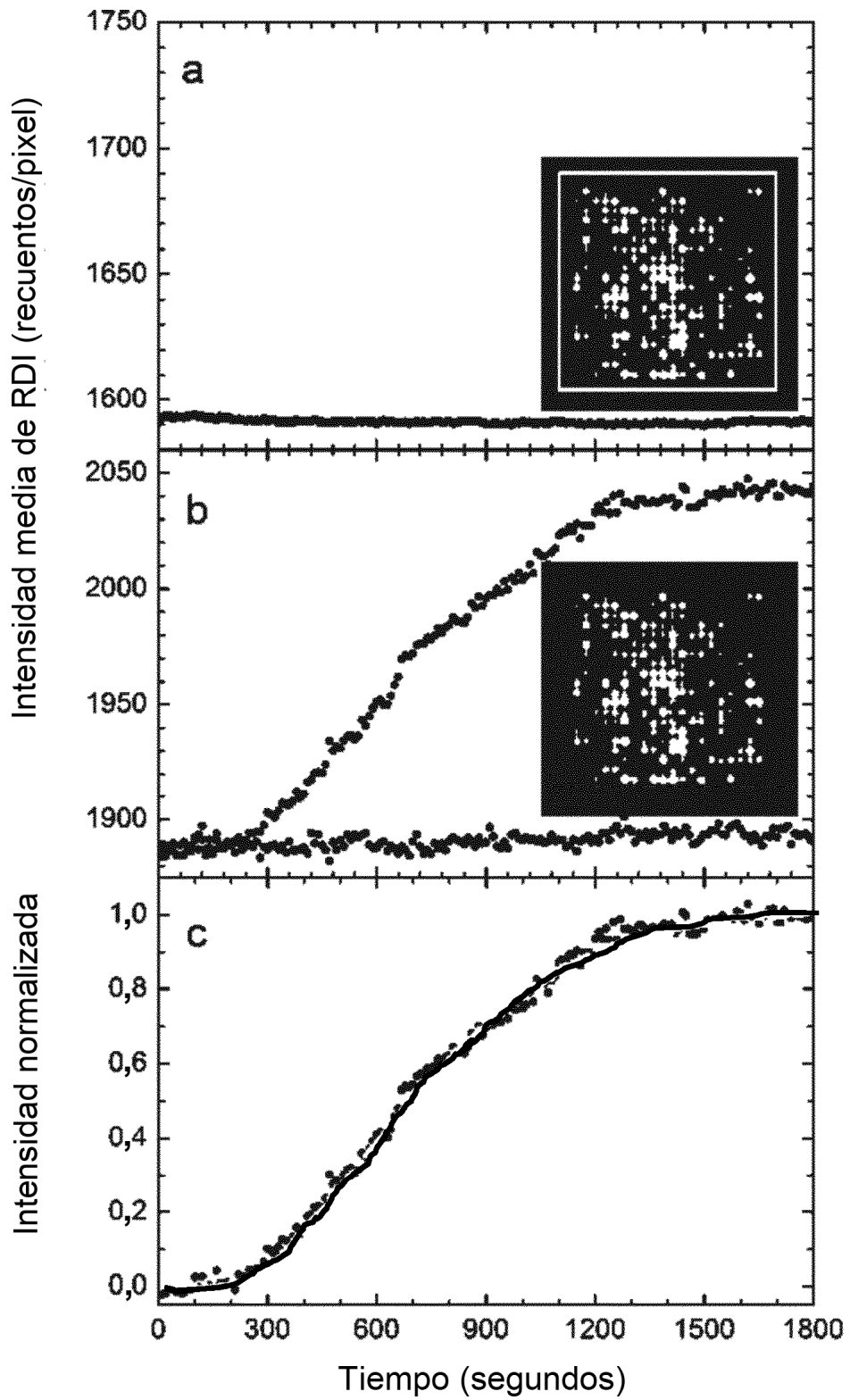


FIG. 2

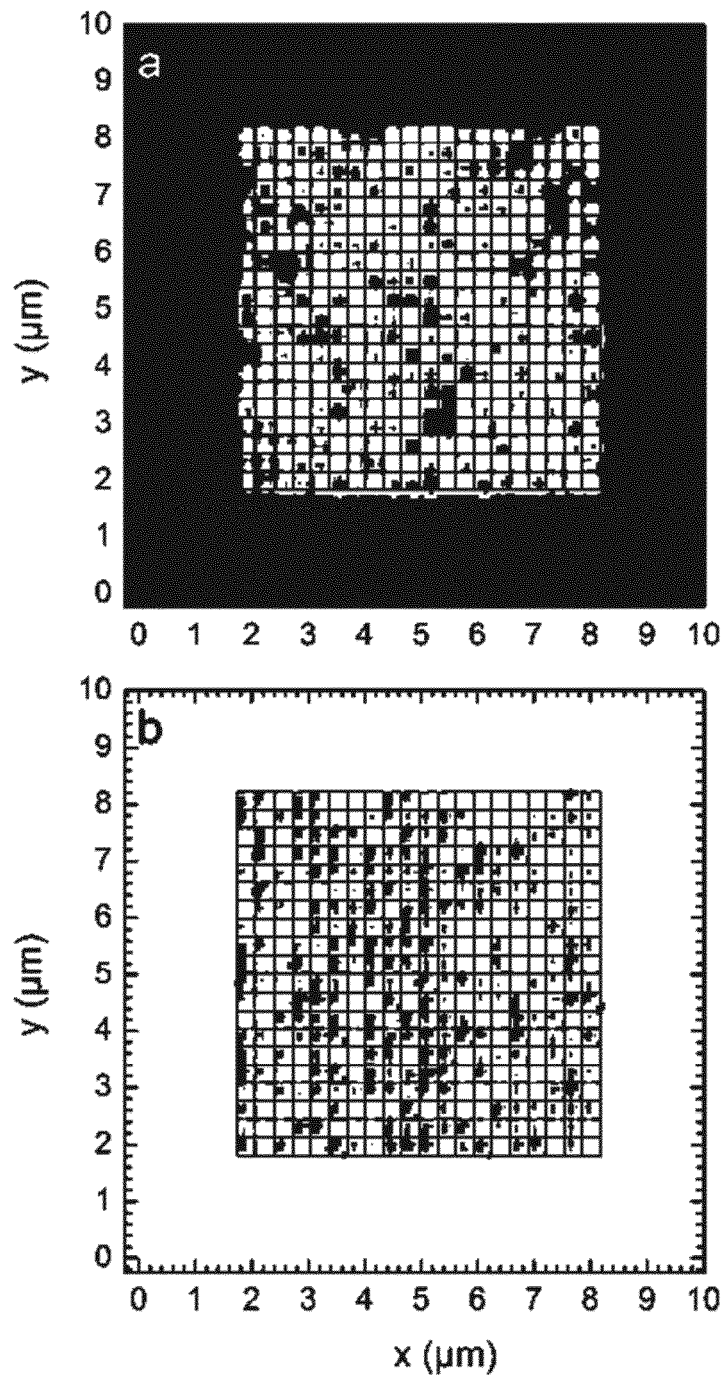


FIG. 3

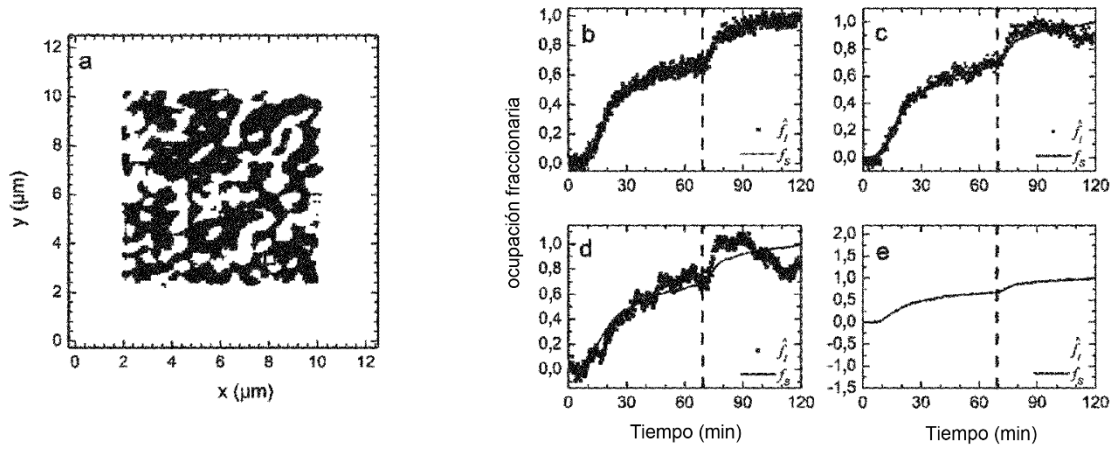


FIG. 4