

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 755**

(51) Int. Cl.:

B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 35/00 (2011.01)
G01N 21/17 (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016 PCT/US2016/045606**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17024163**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016 E 16833889 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024 EP 3331818**

(54) Título: **Amplificación de señal en ensayos de socios de unión específica plasmónica basados en soluciones**

(30) Prioridad:

04.08.2015 US 201562201051 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

(73) Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

(72) Inventor/es:

**FRISZ, JESSICA;
MEHRA, RAJESH K.;
ARON, KENNETH P. y
CHIANG, VINCENT**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 989 755 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

Amplificación de señal en ensayos de socios de unión específica plasmónica basados en soluciones

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. Núm. 62/201,051, presentada el 4 de agosto de 2015.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos y procedimientos para detectar analitos diana en una muestra. En particular, la presente invención proporciona un sistema de detección de analitos en base a la resonancia local de plasmones, capaz de detectar una cantidad diminuta de un analito diana en una muestra.

10 Antecedentes de la invención

Los inmunoensayos y ensayos de unión de biomoléculas actuales suelen requerir múltiples etapas y equipos sofisticados para realizar los ensayos. La falta de sensibilidad y la complejidad que conlleva la realización de estos ensayos heterogéneos surge de la necesidad específica de separar los elementos de enlace específicos marcados de los no marcados.

15 Se han realizado intentos de desarrollar ensayos en base a propiedades de resonancia local de plasmón superficial (PRLPS) de las nanopartículas de metales nobles (Tokel *et al.*, Chem Rev., Vol. 114: 5728-5752, 2014). La LSPR es la oscilación colectiva de electrones en estructuras de tamaño nanométrico inducida por la luz incidente. Las nanopartículas metálicas tienen una fuerte respuesta electromagnética a los cambios del índice de refracción en su proximidad inmediata y, por tanto, los cambios en la frecuencia de resonancia de las nanopartículas pueden medirse como un indicador de las moléculas que se unen a la superficie de la nanopartícula. Aunque las nanopartículas metálicas, en particular las de oro, se han empleado en ensayos de diagnóstico para detectar eventos de enlace, estos ensayos generalmente tienen una baja sensibilidad y no pueden utilizarse para controlar de manera cuantitativa la cinética de los eventos de enlace secuenciales.

25 El documento US2013/252275 describe un dispositivo para detectar analitos diana que comprende un conjunto de nanopartículas metálicas que comprende nanopartículas metálicas.

Por lo tanto, se necesitan procedimientos de ensayo mejorados que empleen un formato homogéneo y proporcionen una mayor sensibilidad. También es deseable la realización de ensayos con técnicas estándar de laboratorio, tal como la espectroscopia.

Sumario de la invención

30 La invención está definida por las reivindicaciones. Todos los demás aspectos, configuraciones o realizaciones expuestos en el presente documento que no entran en el alcance de las reivindicaciones son meramente informativos. La presente solicitud describe el uso de técnicas de resonancia de plasmón de superficie localizada (PRLPS) para realizar ensayos que implican socios de unión específicos, incluidos, pero no limitados a, ligandos, receptores, factores de transcripción, socios de ADN de unión, antígenos y anticuerpos. Más concretamente, la presente solicitud se refiere a los procesos y materiales para lograr una amplificación significativa en dichos ensayos mediante el uso de nanomateriales metálicos compuestos etiquetados.

En diversas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva con fines ilustrativos, la presente solicitud se refiere al uso de nanomateriales compuestos etiquetados en solución para determinar la unión de socios de unión específicos de forma cualitativa o cuantitativa.

40 En un primer aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos de detección de un analito diana en una muestra basados en resonancia de plasmón superficial localizada, los procedimientos comprenden mezclar la muestra con un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección en presencia de polietilenglicol, en el que el polietilenglicol está presente a una concentración de entre 0,1 mg/mL y 200 mg/mL. 1 mg/mL a 200 mg/mL, en la que el primer y segundo conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas compuestas acopladas a socios de unión que son capaces de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra para formar un complejo entre el primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección en solución; exponer el complejo a una fuente de luz en un intervalo de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y medir una señal óptica del complejo, en la que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito diana en la muestra. En una realización ejemplar, la etapa de mezclado se produce en presencia de un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido se selecciona entre maltodextrina, jarabe de maíz y poliglucosa. En una realización preferente, el polisacárido es maltodextrina. En otra realización ejemplar, la etapa de mezcla se realiza en presencia de un agente bloqueante. En algunas realizaciones, el agente bloqueante se selecciona entre albúmina sérica bovina, caseína, gelatina, ovoalbúmina y gammaglobulinas. En una realización preferente, el agente bloqueante es albúmina sérica bovina.

- En algunas realizaciones, los conjugados de detección comprenden socios de unión que son capaces de unirse específicamente a un analito diana. En algunas realizaciones, los socios de unión son haptenos y otras moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, macromoléculas biológicas, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ej., Fv, Fab, (Fab)₂, cadena simple, CDR, etc.), antígenos, receptores, ligandos, polinucleótidos, aptámeros, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucopéptidos, lipoproteínas o nucleoproteínas. En ciertas realizaciones exemplares, los socios de unión son anticuerpos. En otras realizaciones exemplares, los socios de unión son antígenos. En algunas realizaciones, los conjugados de detección (*por ejemplo*, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección) comprenden socios de unión que son el mismo tipo de molécula.
- En realizaciones preferentes, las composiciones metálicas de nanoestructuras en los conjugados de detección comprenden al menos dos metales nobles, metales de transición, metales alcalinos, lantánidos o sus combinaciones. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden al menos dos metales seleccionados de oro, plata, cobre, platino, paladio, rutenio, rodio, osmio, iridio, titanio, cromo, cadmio, zinc, hierro, cobalto y níquel. En otras realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden al menos dos metales seleccionados de oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio, hierro, níquel y zinc. En una realización de ejemplo, las composiciones metálicas de nanoestructuras comprenden oro y plata.
- En una realización exemplar, el primer socio de unión está unido a una nanopartícula compuesta y el segundo socio de unión está unido a otro nanomaterial compuesto que contiene dos metales seleccionados del grupo que consiste en oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio y zinc. En otra realización exemplar, el primer socio de unión se conjuga con nanopartículas que contienen plata y oro y el segundo socio de unión se conjuga con nanopartículas que contienen oro y cobre.
- Como se describe en la presente memoria descriptiva, se puede lograr una amplificación significativa de la señal en una variedad de ensayos. En ciertas realizaciones, los ensayos son directos, indirectos, sándwich, competitivos y de etiquetado secundario. En ciertas realizaciones adicionales, estos ensayos pueden utilizar mediciones de extinción, dispersión y/o reflectancia para monitorizar eventos de unión específicos.
- En ciertas realizaciones, los procedimientos de la presente invención son capaces de detectar cantidades de femtogramo a nanogramo de un analito diana en la muestra.
- Como se ha indicado anteriormente, la presente solicitud, con fines meramente ilustrativos, se refiere al uso de socios marcados con nanomateriales, *por ejemplo*, anticuerpos conjugados con nanoestructuras metálicas compuestas, en solución para determinar la unión de socios de unión específicos de forma cualitativa o cuantitativa. En algunas realizaciones, la solución comprende uno o más de un polisacárido (*por ejemplo*, maltodextrina), trehalosa, un material polimérico (*por ejemplo*, PEG), un agente bloqueante (*por ejemplo*, *la* maltodextrina, puede proporcionarse en forma liofilizada, *por ejemplo*, como una perla o gránulo. Por ejemplo, uno o más de los componentes de la solución pueden suministrarse en forma de microesferas o gránulos en una cubeta espectrofotométrica o en una o más cámaras de reacción de un rotor analítico. La perla o gránulo puede suspenderse tras la adición de un líquido, *por ejemplo*, agua, solución salina, una muestra líquida, etc. En una realización, la solución comprende maltodextrina en una concentración final de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% peso/volumen (p/vol). En otra realización, la solución comprende maltodextrina en una concentración final de aproximadamente 4% a aproximadamente 15% p/p/vol. En otra realización, la 4olutelución comprende maltodextrina en una concentración final de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% en peso/vol. En algunas realizaciones, la sensibilidad del ensayo mejora cuando se añade maltodextrina a la solución en comparación con un ensayo realizado en una solución que comprende un azúcar alternativo, *por ejemplo*, sacarosa o ficolina.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona dispositivos de detección de analitos para utilizar los procedimientos aquí descritos para detectar un analito diana en una muestra. Los dispositivos de detección de analitos adecuados pueden incluir, entre otros, una cubeta espectrofotométrica, un rotor analítico, una placa de micropocillos, un analizador clínico (*por ejemplo*, Cobas Fara) o una cámara de flujo. La punta de una fibra óptica o de un gel transparente también puede emplearse para llevar a cabo los procedimientos de detección divulgados en la presente memoria descriptiva. En una realización exemplar, el dispositivo de detección del analito se selecciona entre una cubeta espectrofotométrica y un rotor analítico.
- En una realización preferente, los componentes del dispositivo de detección de analitos están contenidos dentro de un rotor o disco centrífugo. En algunas realizaciones, un rotor o disco puede contener una o más cámaras de reacción en las que se encuentra la pluralidad de conjugados de detección. En ciertas realizaciones, los conjugados de detección están presentes en la forma de una composición liofilizada, tal como una perla o gránulo liofilizado. En algunas realizaciones, el dispositivo de detección de analitos comprende un rotor o disco que tiene una o más cámaras de reacción, en el que cada cámara de reacción comprende una pluralidad de conjugados de detección (*por ejemplo*, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección), en los que los conjugados de detección están acoplados a nanopartículas metálicas, *por ejemplo*, nanoestructuras metálicas compuestas. En las realizaciones en las que el rotor o disco contiene más de una cámara de reacción, los conjugados de detección pueden seleccionarse de forma que se pueda detectar un analito diferente en cada cámara de reacción.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona con fines ilustrativos únicamente conjuntos que comprenden los dispositivos de detección de analitos de la invención. En una realización, el conjunto comprende una pluralidad de conjugados de detección (por ejemplo, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección), en el que los conjugados de detección están acoplados a nanopartículas metálicas, por ejemplo, nanoestructuras metálicas compuestas. En algunas realizaciones, uno o más de los conjugados de detección pueden liofilizarse. En una realización, todos los conjugados de detección se liofilizan. En una realización ejemplar, la nanoestructura metálica en el primer conjugado de detección y/o el segundo conjugado de detección es una nanoestructura metálica compuesta.

En otro aspecto más, con fines meramente ilustrativos, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar nanoestructuras metálicas compuestas para su uso en los dispositivos y procedimientos de detección descritos en la presente memoria descriptiva. En una realización, los procedimientos comprenden la preparación de una primera solución que comprende una mezcla de un polímero y ácido cloroaurico, la preparación de una segunda solución que comprende nanoestructuras de plata o cobre, y la incubación de la primera solución con la segunda durante un período de tiempo, en el que la mezcla resultante comprende nanoestructuras de plata revestidas por oro o nanoestructuras de cobre revestidas por oro. En ciertas realizaciones, se añade un agente reductor, tal como ácido ascórbico, a la mezcla de reacción para aumentar la cantidad de nanoestructuras producidas. En una realización, el polímero de la primera solución es polivinilpirrolidona. En otra realización, el polímero de la primera solución es alcohol polivinílico. En otra realización, el procedimiento comprende la preparación de una primera solución que comprende una mezcla de un detergente tal como CHAPS y ácido cloroaurico, y una solución que comprende sales de plata o cobre, y la incubación de la primera solución con la segunda solución que contiene un agente reductor, tal como ácido ascórbico que conduce a la formación de nanoestructuras compuestas. El tamaño y la forma de las nanoestructuras pueden variarse modificando la proporción de metales utilizados, la concentración de detergente y, por último, la cantidad de ácido ascórbico empleada.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ilustra el principio básico del inmunoensayo PRLPS descrito en la presente memoria descriptiva. La nanopartícula metálica exhibe por sí misma un espectro óptico que depende de la composición del metal, el tamaño, la forma y la naturaleza del medio dispersante. Los ligeros cambios en la superficie de la nanopartícula debidos a la primera unión primaria y a la posterior unión secundaria provocan cambios progresivos en las características de la luz que interactúa con los nanoconjungados. Estos cambios pueden registrarse con un espectrómetro adecuado y proporcionar información cualitativa y cuantitativa.

Figura 2. Ilustra un ejemplo en el que el receptor tiene múltiples sitios de unión al ligando. Los anticuerpos marcados con nanopartículas provocan un desplazamiento espectral cuando se unen al antígeno.

Figura 3. Ilustra el efecto de acoplamiento PRLPS entre diferentes tipos de nanopartículas cuando el receptor tiene múltiples sitios de unión o el receptor tiene diferentes sitios de unión.

Figura 4. Ilustra el efecto del polietilenglicol (PEG) en las señales PRLPS. Las señales PRLPS aumentan considerablemente en presencia de PEG. Esta figura muestra un aumento de diez veces en la señal PRLPS tras la adición de PEG al medio de reacción que contiene 2,5 ng de antígeno del gusano del corazón y anticuerpo polyclonal anti-gusano del corazón.

Figura 5. Ilustra el aumento del desplazamiento de la longitud de onda utilizando nanoestrellas de oro de color azul. En esta figura, el anticuerpo conjugado con nanoestrellas de color azul proporcionó un aumento de 2 veces en la tasa de desplazamiento de la longitud de onda en comparación con el conjugado de oro coloidal rojo del anticuerpo. Este experimento se realizó utilizando 2,5 ng de extracto crudo de gusano del corazón como antígeno y después se hizo reaccionar con un conjugado comercial preparado mediante el uso de oro coloidal rojo o con el nuevo conjugado azul preparado según esta invención. En ambos tipos de conjugados se utilizó polietilenglicol.

Figura 6. Ilustra que los conjugados coloidales de color azul de la antiproteína A de pollo reaccionan con la proteína A en una amplia gama de concentraciones y que las velocidades de reacción son lineales durante un tiempo prolongado.

Figuras 7A y 7B. Ilustra una mejora sustancial en la detección del analito cuando la técnica PRLPS se utiliza en fase de solución (**Fig. 7A**) en lugar de la fase sólida (**Fig. 7B**). Las reacciones se realizaron en fase sólida utilizando un chip Nicoya o en fase líquida mediante el uso de un conjunto de cubetas Nicoya. En los dos experimentos se utilizó el mismo espectrómetro Nicoya. Las respuestas de la PCR en el ensayo de la cubeta (fase de solución) fueron aproximadamente de 6 a 8 veces mayores que en la fase sólida.

Figuras 8A y 8B. Ilustra la detección de TSH en fase de solución utilizando anticuerpos monoclonales anti-TSH conjugados con oro coloidal.

Figuras 9A, 9B y 9C. Ilustra una comparación de la detección de TSH sin PEG (**Fig. 9A**) o con PEG (**Fig. 9B**) en el medio de reacción. Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales (C1 y C6) como conjugados de oro coloidal. Se variaron las proporciones de los dos conjugados y se obtuvo una señal óptima con un 30% de C1 y un 70% de C6. La **Fig. 9C** muestra la comparación TSH PRLPS Pico de Cambio de detección con PEG incluido en el medio de reacción. La **Fig. 9C** demuestra que el PEG mejora la detección del analito en el ensayo de TSH a 500 segundos.

Fig. 10. Ilustra los espectros ópticos de las nanopartículas de aleación de oro y plata sintetizadas como sigue: El cloruro de oro se hizo reaccionar con CTAB antes de añadir nitrato de plata, seguido de la adición de ácido ascórbico y, por último, hidróxido de sodio.

La Figura 11. Ilustra el desplazamiento azul lineal en λ_{\max} con el aumento del contenido de plata en las partículas de nanoaleación.

La Figura 12. Ilustra la inmunorreactividad de conjugados de IgG de ratón con nanopartículas de oro y de aleación de oro/plata. Los conjugados se sintetizaron por adsorción pasiva de la IgG de ratón sobre partículas de oro o de aleación.

5 Se comprobó su reactividad con la proteína A rayada en una tira de nitrocelulosa de flujo lateral.

Fig. 13. Ilustra los espectros ópticos de nanoestrellas de oro/plata revestidas con CHAPS. El cloruro de oro se añade al CHAPS antes de añadir el nitrato de plata y el citrato trisódico. La formación de nanoestrellas se induce por medio de la adición de una solución reductora que contiene ácido ascórbico, CHAPS y citrato trisódico. λ_{\max} se desplaza hacia el rojo hasta una determinada concentración de plata y después se desplaza hacia el azul. Así, se producen 10 nanoestrellas de distintos tamaños cambiando la proporción de oro y plata en el medio de reacción.

Fig. 14. Ilustra el desplazamiento del pico al rojo tras la unión de IgG de ratón a nanopartículas sólo de oro producidas en ausencia de plata.

Fig. 15. Ilustra un desplazamiento del pico mucho mayor hacia el rojo tras la unión de IgG de ratón a nanoestrellas de oro/plata producidas en presencia de ~37,5% de plata.

15 **Fig. 16.** Ilustra el elevado efecto positivo de la maltodextrina en la señal PRLPS.

Fig. 17. Ilustra cómo la maltodextrina y la BSA disminuyen la sedimentación en el rotor analítico y mantienen una señal PRLPS elevada.

Fig. 18. Ilustra la detección de TSH en pg/ml bajo diversas concentraciones de BSA, PEG y maltodextrina.

Descripción detallada de la invención

20 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que se puede lograr una amplificación significativa en los ensayos en base a PRLPS con socios de unión etiquetados con composiciones metálicas de nanoestructuras. Así, la presente invención proporciona procedimientos de detección de analitos que utilizan una pluralidad de conjugados de detección que comprenden nanoestructuras metálicas compuestas acopladas a biomoléculas.

25 La presente invención supera los problemas de los inmunoensayos actuales, los ensayos de unión ligando-receptor, los ensayos de unión ácido nucleico-proteína u otros ensayos de pareja de unión específica que generalmente requieren múltiples etapas y equipos sofisticados para realizar dichos pasos. La falta de sensibilidad y la complejidad que conlleva la realización de estos ensayos heterogéneos surge de la necesidad específica de separar los elementos de enlace específicos marcados de los no marcados. La presente invención supera tales limitaciones realizando todos 30 las etapas implicadas en el ensayo en un formato homogéneo en el que la separación de los componentes reaccionados y no reaccionados del ensayo es innecesaria ya que los eventos de unión cambian las características PRLPS que se miden en tiempo real por cualquiera de las técnicas espectroscópicas utilizadas por aquellos con conocimientos ordinarios en espectroscopia. Los ensayos de la presente invención, sin separación y en un solo recipiente, utilizan el acoplamiento plasmónico y los efectos relacionados para proporcionar la amplificación de las 35 señales moduladas PRLPS finales.

Como será evidente para un experto en la materia, la presente invención puede aplicarse a la detección de una variedad de analitos antigenéticos, como los asociados con enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales, por ejemplo, antígenos asociados con enfermedades infecciosas y anticuerpos generados en respuesta a las mismas. Más allá de la detección de antígenos y anticuerpos, las técnicas aquí descritas también pueden utilizarse 40 para realizar ensayos que impliquen a socios de unión específicos, como ligandos y receptores, y factores de transcripción y sus socios de unión al ADN asociados. Además, las interacciones ARN-ARN, ARN-ADN, ADN-ADN o proteína-ácido nucleico pueden detectarse utilizando conjugados adecuados de nanopartículas metálicas con socios de unión específicos.

45 Tal como se proporciona en la presente memoria descriptiva, la presente invención describe el uso de nanopartículas metálicas en solución (en contraposición a estar unidas a una superficie por medio de deposición química o física) para determinar la unión de socios de unión específicos de forma cualitativa o cuantitativa. Se pueden medir los cambios en las características de la luz que interactúa con las regiones que contienen socios unidos y no unidos a nanopartículas metálicas, lo que permite determinar las interacciones cualitativas y cuantitativas entre los socios de unión específicos mediante detectores adecuados.

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de detección de un analito diana en una muestra, como se recita en las reivindicaciones. Los procedimientos comprenden mezclar la muestra con una pluralidad de conjugados de detección que comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a socios de unión. Los procedimientos comprenden un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección, en los que el primer y segundo conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a socios de unión que 55 son capaces de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra para formar un complejo entre el primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección; exponer el complejo a una fuente de luz en una gama de longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y medir una señal óptica del complejo, donde un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito diana en la muestra. La nanoestructura metálica en el primer conjugado de detección y el segundo conjugado de detección es una nanoestructura metálica compuesta. La etapa de mezclado se produce en presencia de un material polimérico polietilenglicol (PEG). Otros materiales poliméricos son la polivinilpirrolidona, la polialilamina, la polietilenimina, la polilisisina, el ácido poliacrílico, el

polivinilalcohol y el ácido poliaspártico. En otra realización ejemplar, la etapa de mezclado se produce en presencia de un polisacárido. En algunas realizaciones, el polisacárido se selecciona entre maltodextrina, jarabe de maíz y poliglucosa. En una realización preferente, el polisacárido es maltodextrina. En otra realización ejemplar, la etapa de mezcla se realiza en presencia de un agente bloqueante. En algunas realizaciones, el agente bloqueante se selecciona entre albúmina sérica bovina, caseína, gelatina, ovoalbúmina y gammaglobulinas. En una realización preferente, el agente bloqueante es albúmina sérica bovina.

En diversas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, los procedimientos de la presente invención pueden configurarse en un formato de ensayo en sándwich, un formato de ensayo directo, un formato de ensayo indirecto, así como formatos de etiquetado competitivo y secundario.

10 En algunas realizaciones, los procedimientos de detección son ensayos en sándwich. En tales realizaciones, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a socios de unión que son capaces de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra. Por ejemplo, en una realización, el procedimiento en un formato de ensayo en sándwich comprende un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección en el que el primer y segundo conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a socios de unión que son capaces de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra para formar un complejo entre el primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección. En una realización ejemplar, la nanoestructura metálica en el primer conjugado de detección y/o el segundo conjugado de detección es una nanoestructura metálica compuesta. El complejo se expone a una fuente de luz y se mide una señal óptica, en la que un cambio en la señal óptica indica la presencia de analito en la muestra. A modo de ilustración, cuando una muestra que contiene el analito diana se mezcla con el primer y el segundo conjugado de detección, el analito diana se une a los socios de unión en los conjugados de detección para formar un complejo entre el primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección. Esta formación compleja hace que las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección se aproximen entre sí, es decir, que se produzca un acoplamiento plasmón-plasmón. La cantidad de luz que es absorbida, dispersada o transmitida por las nanoestructuras metálicas se ve afectada por la proximidad de las nanoestructuras metálicas en el complejo y, por lo tanto, produce un cambio potenciado de la longitud de onda del pico de absorción, lo que indica la presencia del analito diana en la muestra.

30 En otras realizaciones, los procedimientos de detección son ensayos competitivos. En tales realizaciones, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras metálicas acopladas al analito diana de interés. Como en el procedimiento de ensayo sándwich, el segundo conjugado de detección es capaz de unirse específicamente al analito diana. En este tipo de ensayo, el primer conjugado de detección se unirá inicialmente al segundo conjugado de detección. Si una muestra que contiene un analito diana se mezcla con estos complejos iniciales, el analito diana no marcado o libre en la muestra competirá con el primer conjugado de detección para unirse al segundo conjugado de detección. El cambio en la señal óptica en este tipo de ensayo será el resultado del desplazamiento de las nanoestructuras metálicas en el primer conjugado de detección desde el segundo conjugado de detección, lo que reducirá proporcionalmente el cambio de la longitud de onda del pico de absorción

35 Como se ha indicado anteriormente, los procedimientos de la invención pueden utilizar una pluralidad de conjugados de detección. Los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a socios de unión capaces de unirse específicamente a un analito diana o a otro conjugado de detección dependiendo de la configuración del ensayo. Por ejemplo, en las realizaciones en las que el procedimiento está configurado en un formato de ensayo en sándwich, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas o conjugadas a socios de unión que son capaces de unirse específicamente a un analito diana. En otras realizaciones en las que el procedimiento está configurado en un formato de ensayo competitivo directo, al menos uno de los conjugados de detección comprende nanoestructuras metálicas acopladas o conjugadas a analitos objetivo. De acuerdo con la invención, la nanoestructura metálica en el primer conjugado de detección y el segundo conjugado de detección es una nanoestructura metálica compuesta.

40 En algunas realizaciones, los conjugados de detección comprenden socios de unión que son capaces de unirse específicamente a un analito diana. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "unión específica" hace referencia a unir a una molécula diana con alta afinidad, por ejemplo una afinidad de al menos 10^{-6} M. En algunas realizaciones, los socios de unión son haptenos y otras moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, macromoléculas biológicas, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo., Fv, Fab, (Fab)₂, cadena simple, CDR, etc.), antígenos, receptores, ligandos, polinucleótidos, aptámeros, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucopéptidos, lipoproteínas o nucleoproteínas. En ciertas realizaciones, los socios de unión son anticuerpos. En otras realizaciones, los socios de unión son antígenos.

45 55 En algunas realizaciones, los conjugados de detección, por ejemplo, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección, comprenden socios de unión que son el mismo tipo de molécula, pero preferiblemente se unen al analito diana en ubicaciones distintas entre sí. A modo de ejemplo, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección pueden ser ambos anticuerpos que reconocen un analito diana, pero el epítopo al que el primer conjugado de detección se une al analito diana está separado e idealmente no se solapa con el epítopo al que el segundo conjugado de detección se une al analito diana. De este modo, en ciertas realizaciones, el primer conjugado de detección comprende un anticuerpo que reconoce un primer epítopo de un analito diana y el segundo

conjugado de detección comprende un anticuerpo diferente que reconoce un segundo epítopo de un analito diana. En diversas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, el primer conjugado de detección puede comprender un anticuerpo monoclonal que reconoce un primer epítopo de un analito diana. En otras realizaciones, el segundo conjugado de detección puede comprender un anticuerpo monoclonal que reconoce un segundo epítopo de un analito diana que está separado del epítopo reconocido por el primer conjugado de detección e idealmente no se solapa con él. Alternativamente, el primer conjugado de detección y/o el segundo conjugado de detección pueden comprender un anticuerpo policlonal. Por ejemplo, el primer conjugado de detección puede comprender un anticuerpo policlonal mientras que el segundo conjugado de detección comprende un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el primer conjugado de detección comprende un anticuerpo policlonal y el segundo conjugado de detección comprende un anticuerpo policlonal.

Las nanoestructuras metálicas para su uso en los procedimientos y dispositivos de la invención son nanoestructuras metálicas compuestas. Además, a título meramente ilustrativo, se proporcionan nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección compuestas de un metal noble o un compuesto del mismo. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección pueden estar compuestas por un metal de transición o un composite de los mismos. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección pueden comprender un metal alcalino o un lantánido en combinación con un metal noble o de transición. En ciertas realizaciones, las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección comprenden un metal seleccionado de oro, plata, cobre, platino, paladio, rutenio, rodio, osmio, iridio, titanio, cromo, cadmio, zinc, hierro, cobalto, níquel y sus composite. En una realización, las nanoestructuras metálicas son nanoestructuras de oro. En otra realización, las nanoestructuras metálicas son nanoestructuras de plata.

Las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección son composiciones metálicas de nanoestructuras. El término "nanoestructuras metálicas de composite" se refiere a nanoestructuras que comprenden al menos dos metales nobles, metales de transición, metales alcalinos o lantánidos. Los dos o más metales pueden estar mezclados, tal como en una aleación, o los dos o más metales pueden estar presentes en porciones separadas de la nanoestructura. Por ejemplo, un metal puede formar el núcleo de la nanoestructura, mientras que el segundo metal forma una capa exterior o revestimiento de la nanoestructura. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden al menos dos metales seleccionados de oro, plata, cobre, platino, paladio, rutenio, rodio, osmio, iridio, titanio, cromo, cadmio, zinc, hierro, cobalto y níquel. En otras realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden al menos dos metales seleccionados de oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio, hierro, níquel y zinc. En una realización particular, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden oro y plata. En otra realización, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden oro y cobre. En otra realización, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden plata y cobre. Las composiciones metálicas de nanoestructuras utilizadas en los procedimientos de la invención pueden incluir un número de geometrías diferentes, tal como nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanotubos, nanovainas, nanorodillos, nanopuntos, nanoislas, nanocables, nanodiscos, nanocubos, o sus combinaciones. En una realización exemplar, la nanoestructura metálica compuesta se selecciona entre una nanoestrella y un nanorodillo.

En ciertas realizaciones, las composiciones metálicas de nanoestructuras utilizadas en los procedimientos de la invención son aleaciones de un primer metal y un segundo metal. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite utilizadas en los procedimientos de la invención comprenden un núcleo de un primer metal y un revestimiento de un segundo metal. En determinadas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden un núcleo de plata y un revestimiento de oro. En otras realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden un núcleo de cobre y un revestimiento de oro. En otra realización, el núcleo es de plata y el revestimiento es de cobre. En algunas realizaciones, cada una de las nanoestructuras metálicas de composite comprende un núcleo dieléctrico (por ejemplo, dióxido de silicio, sulfuro de oro, dióxido de titanio, sílice y poliestireno), un primer revestimiento de un primer metal y un segundo revestimiento de un segundo metal. En una realización particular de los procedimientos de detección, el núcleo es de sílice, el primer revestimiento (es decir, el revestimiento interior) es un revestimiento de plata, y el segundo revestimiento es un revestimiento de oro (es decir, el revestimiento exterior). En otra realización, el núcleo es de sílice, el primer revestimiento (es decir, el revestimiento interior) es un revestimiento de cobre, y el segundo revestimiento es un revestimiento de oro (es decir, el revestimiento exterior).

En algunas realizaciones, el núcleo que comprende un primer metal se disuelve tras el proceso de revestimiento con un segundo metal para crear una estructura hueca compuesta por el segundo metal. Por ejemplo, el revestimiento de un núcleo de plata con nanopartículas de oro genera una vaina de oro alrededor del núcleo de plata y el núcleo de plata se disuelve o degrada posteriormente dando lugar a la formación de una estructura de vaina hueca de nanooro.

Las nanoestructuras metálicas incluyen nanopartículas esféricas, así como nanoplacas y nanovainas. Las nanoplacas tienen dimensiones laterales (por ejemplo, la longitud de los bordes) mayores que su espesor. Las nanoplacas incluyen nanodiscos, nanopolígonos, nanohexágonos, nanocubos, nanoanillos, nanoestrellas y nanoprismas. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas, incluidas las composiciones de nanoestructuras, tienen una geometría seleccionada de nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanotubos, nanovainas, nanorodillos, nanopuntos, nanoislas, nanocables, nanodiscos, nanocubos o sus combinaciones. También son posibles otras formas, incluidas las formas irregulares. En ciertas realizaciones, el tamaño y la forma de las nanoestructuras metálicas no son uniformes, es decir, las nanoestructuras metálicas son una mezcla heterogénea de diferentes formas y tamaños de nanoestructuras. En una realización exemplar, las nanoestructuras metálicas son

nanoestrellas. En otra realización ejemplar, las nanoestructuras metálicas son nanorodillos. En otra realización ejemplar, las nanoestructuras metálicas son composiciones de nanoesferas.

Para las nanopartículas esféricas, los intervalos de diámetro adecuados incluyen desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 200 nm, desde aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm, y desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 60 nm. Para los nanorodillos, los intervalos de diámetro adecuados incluyen desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm, desde aproximadamente 8 nm a aproximadamente 30 nm, y desde aproximadamente 10 nm a aproximadamente 25 nm. Adicionalmente, para los nanorodillos, los intervalos de longitud adecuados incluyen desde aproximadamente 25 nm a aproximadamente 150 nm, desde aproximadamente 40 nm a aproximadamente 120 nm, y desde aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la relación de aspecto, es decir, longitud/diámetro, de los nanorodillos está entre 2 y 10. Para las nanoplacas, las longitudes de los bordes pueden ser de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 100 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 300 nm. El espesor de las nanoplacas puede oscilar de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 5 nm a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 10 nm a 50 nm, o aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm.

En algunas realizaciones, las nanoplacas tienen una relación de aspecto superior a 2. La relación de aspecto es la relación entre la longitud de los bordes y el espesor. Preferentemente, las nanoplacas tienen una relación de aspecto de aproximadamente 2 a aproximadamente 25, de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30.

Los procedimientos de conjugación de moléculas en nanoestructuras metálicas son conocidos por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen químicas de conjugación, como las que implican el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), el acoplamiento sulfo-NHS, la unión hidrófoba o la química del tioéter. En algunas realizaciones, los socios de unión o los analitos diana pueden acoplarse a las nanoestructuras metálicas a través de varias funcionalidades químicas, incluyendo tiol, amina, ditiol, fosforamida acrílica, azida o alquinos. En algunas realizaciones, la molécula puede acoplarse a la nanoestructura metálica de forma indirecta a través de una molécula o proteína portadora mayor. Este acoplamiento indirecto es especialmente útil cuando la molécula es pequeña, como una hormona, un fármaco y otras moléculas pequeñas de menos de 10 kD. Preferentemente, la proteína portadora no es capaz de interactuar específicamente con el analito objetivo. En algunas realizaciones, la proteína A o la proteína G o la proteína A/G pueden conjugarse o acoplarse a las nanopartículas.

En algunas realizaciones, el metal o los metales empleados en un primer conjugado de detección pueden ser los mismos que el metal o los metales con los que se fabrican las nanoestructuras metálicas en el segundo conjugado de detección. Las nanoestructuras metálicas utilizadas en la invención reivindicada son nanoestructuras metálicas compuestas. Por ejemplo, en un ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro. En otras realizaciones, el metal empleado en el primer conjugado de detección es diferente del metal o metales utilizados para crear las nanoestructuras metálicas en el segundo conjugado de detección. Por ejemplo, en un ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de plata y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro. En otro ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras de plata. En otro ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras compuestas. En algunas realizaciones, las composiciones de nanoestructuras comprenden nanoestructuras de plata revestidas por oro. En otras realizaciones particulares, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras compuestas que comprenden nanoestructuras de cobre revestidas de oro. En otros ejemplos ilustrativos, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras compuestas que comprenden nanoestructuras de magnetita revestidas de oro. En otros ejemplos ilustrativos, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras compuestas de oro y un metal alcalino o un lantánido.

En ciertas realizaciones, el tamaño de las nanoestructuras metálicas utilizadas para crear el primer conjugado de detección es similar al tamaño de las nanoestructuras metálicas utilizadas en el segundo conjugado de detección. En tales realizaciones, la coincidencia del tamaño de los dos conjuntos de nanoestructuras puede proporcionar un desplazamiento óptimo de la longitud de onda en un espectro de reflectancia, emisión o dispersión.

En algunas realizaciones, el entorno de reacción puede ajustarse con amortiguadores apropiados, fuerza iónica y otros acelerantes. De acuerdo con la invención reivindicada, el medio de reacción comprende polietilenglicol (PEG), que, como se describe en la presente memoria descriptiva, puede aumentar la intensidad de la señal PRLPS. También pueden utilizarse otros materiales poliméricos similares, incluyendo, pero no limitándose a, polivinilpirrolidona, polialilamina, polietilenimina, polilisina, ácido poliacrílico, polivinilalcohol y ácido poliaspártico.

La presente invención también proporciona dispositivos de detección de analitos para utilizar los procedimientos de la invención para detectar un analito diana en una muestra, como se recita en el conjunto de reivindicaciones. Los

dispositivos de detección de analitos adecuados pueden incluir, entre otros, una cubeta espectrofotométrica, un rotor analítico, una placa de micropocillos o una cámara de flujo. Como comprenderá el artesano experto, la punta de una fibra óptica o un gel transparente también pueden emplearse para llevar a cabo los procedimientos de detección divulgados en la presente memoria descriptiva.

- 5 En ciertas realizaciones, todos los componentes de los dispositivos de detección de analitos descritos en la presente memoria descriptiva están contenidos en un rotor o disco centrífugo. Por ejemplo, un rotor o disco puede contener una o más cámaras de reacción en las que se colocan la pluralidad de conjugados de detección. En algunas realizaciones, los conjugados de detección están presentes en la forma de composiciones liofilizadas, tal como una perla o gránulo liofilizado. En algunas realizaciones, el dispositivo de detección de analitos comprende un rotor o disco que tiene una o más cámaras de reacción, en el que cada cámara de reacción comprende una pluralidad de conjugados de detección (por ejemplo, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección), en la que los conjugados de detección están acoplados a nanopartículas metálicas. Tal dispositivo proporciona un ensayo de detección de analitos de una sola etapa en el que una muestra de prueba se pone en contacto con el rotor o el disco, y la aplicación de una fuerza centrífuga al rotor o al disco lleva la muestra de prueba a las cámaras de reacción en las que la muestra se mezcla con el primer conjugado de detección y el segundo conjugado de detección. En las realizaciones en las que el rotor o disco contiene más de una cámara de reacción, los conjugados de detección pueden seleccionarse de forma que se pueda detectar un analito diferente en cada cámara de reacción. Estos dispositivos de detección en formato de rotor pueden configurarse en el formato de ensayo en sándwich, en el formato de competencia directa, o en ambos si los rotores comprenden múltiples cámaras de reacción.
- 10
- 15
- 20 Cualquiera de los tipos de nanoestructuras metálicas discutidas en la presente memoria descriptiva puede utilizarse con estos dispositivos de detección en formato de rotor. En un ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y las nanoestructuras metálicas del segundo conjugado de detección son nanoestructuras de oro. En otro ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de plata y las nanoestructuras metálicas del segundo conjugado de detección son nanoestructuras de oro. En otro ejemplo ilustrativo, el primer conjugado de detección comprende nanoestructuras de oro y el segundo conjugado de detección comprende nanoestructuras compuestas. Por ejemplo, en una realización, las nanoestructuras de composite son nanoestructuras de plata revestidas por oro. En otra realización, las nanoestructuras de composite son nanoestructuras de cobre revestidas por oro.
- 25
- 30 La presente divulgación también incluye, con propósitos ilustrativos, conjuntos que comprenden los dispositivos de detección de analitos divulgados en la presente memoria. En una realización, el conjunto comprende una pluralidad de conjugados de detección (por ejemplo, un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección), en los que los conjugados de detección están acoplados a nanopartículas metálicas. En algunas realizaciones, uno o más de los conjugados de detección se puede liofilizar, por ejemplo, en forma de gránulo o perla. En una realización, todos los conjugados de detección se liofilizan. En otras realizaciones, el conjunto puede incluir uno o más reactivos adicionales. En algunas realizaciones, uno o más de los reactivos adicionales se proporciona en forma liofilizada. En algunas realizaciones, el conjunto puede comprender un agente bloqueante, un azúcar, un material acelerante polimérico, cloruro sódico y/o combinaciones de los mismos. Un "agente bloqueante" es un agente que impide la asociación de las proteínas presentes en la muestra con el agente detectable y/o el analito. Los agentes bloqueantes suelen ser proteínas propiamente dichas y pueden incluir, entre otros, albúmina de suero bovino, caseína, gelatina, ovoalbúmina, gammaglobulinas e IgG de animales no inmunizados. En algunas realizaciones, el azúcar es un polisacárido. En una realización, el polisacárido se selecciona entre maltodextrina, jarabe de maíz y poliglucosa. En una realización preferente, el polisacárido es maltodextrina. En otra realización, el azúcar es trehalosa. En algunas realizaciones, el conjunto de reactivos puede comprender maltodextrina y trehalosa. En algunas realizaciones, el material polimérico acelerante es PEG.
- 35
- 40
- 45

Los conjuntos también pueden incluir instrucciones para utilizar el dispositivo para detectar un analito en una muestra de prueba, dispositivos o herramientas para recoger muestras biológicas, y/o amortiguadores de extracción para obtener muestras de materiales sólidos, tal como suelo, alimentos y tejidos biológicos.

- 50 Como se describe en la presente memoria descriptiva, una muestra de prueba puede ser cualquier tipo de muestra líquida, incluyendo muestras biológicas o extractos preparados a partir de muestras ambientales o de alimentos. En una realización particular, la muestra de ensayo es una muestra biológica. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, derrame pleural, sudor, bilis, líquido cefalorraquídeo, material fecal, fluidos vaginales, esperma, líquido del cristalino ocular, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejidos de biopsia, saliva y lisados celulares. La muestra biológica puede obtenerse de un sujeto humano o animal del que se sospecha que padece una enfermedad, como cáncer, enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones víricas, bacterianas, parasitarias o fúngicas), enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas, enfermedades autoinmunes, etc. La muestra biológica también puede obtenerse de un sujeto sano (por ejemplo, un humano o un animal) que se somete a un control médico rutinario.
- 55
- 60

En algunas realizaciones de los procedimientos, la muestra de ensayo se mezcla con un primer conjugado de detección y la mezcla se pone posteriormente en contacto con el segundo conjugado de detección. En ciertas realizaciones, la muestra, el primer conjugado de detección y el segundo conjugado de detección se ponen en contacto

al mismo tiempo. Por ejemplo, el contacto de la muestra con ambos reactivos simultáneamente puede ocurrir en los dispositivos de detección en formato de rotor descritos en la presente memoria descriptiva.

Como se ha indicado anteriormente, la presente solicitud se refiere al uso de nanomateriales compuestos etiquetados en solución para determinar la unión de socios de unión específicos de forma cualitativa o cuantitativa. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la sensibilidad del ensayo basado en la solución aumenta significativamente cuando se añade a la solución un polisacárido, por *ejemplo*, maltodextrina, en comparación con la adición de otros azúcares como sacarosa, trehalosa o ficol. En un formato de rotor centrífugo, es necesario centrifugar a baja velocidad para introducir una muestra en una cámara analítica. La adición de un polisacárido, por ejemplo, maltodextrina, a la solución es particularmente eficaz para prevenir la agregación y sedimentación de los nanomateriales compuestos marcados, por *ejemplo*, anticuerpos conjugados con nanoestrellas de oro-plata, durante y después de la centrifugación. La mejora de la sensibilidad en relación con otros azúcares como la sacarosa, la trehalosa o el ficol fue inesperada. En virtud de la reducción de la agregación y la sedimentación, se consigue una mayor sensibilidad del ensayo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención se llevan a cabo en una solución que comprende un polisacárido, por ejemplo, maltodextrina, jarabe de maíz o poliglucosa.

En una realización, la solución comprende un polisacárido a una concentración final de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% en peso/vol. En otra realización, la solución comprende un polisacárido a una concentración final de aproximadamente 4% a aproximadamente 15% p/p/vol. En otra realización, la solución comprende un polisacárido en una concentración final de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% en peso/vol. En una realización ejemplar, la solución comprende un polisacárido a una concentración final de aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10%, incluidos todos los valores intermedios. En diversas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, la sensibilidad del ensayo puede mejorarse cuando se añade un polisacárido a la solución en comparación con un ensayo realizado en una solución que comprende un azúcar alternativo, por *ejemplo*, sacarosa o ficol. En una realización ejemplar, el polisacárido es maltodextrina.

En una realización, la solución comprende un agente bloqueante a una concentración final de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% p/vol. En otra realización, la solución comprende un agente bloqueante a una concentración final de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% en peso/vol. En otra realización, la solución comprende un agente bloqueante a una concentración final de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso/vol. En una realización ejemplar, la solución comprende un agente bloqueante a una concentración final de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5%, incluidos todos los valores intermedios. En diversas realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, la sensibilidad del ensayo puede mejorarse cuando se añade un agente bloqueante a la solución en comparación con un ensayo realizado en ausencia de un agente bloqueante. En algunas realizaciones, el agente bloqueante se selecciona entre albúmina sérica bovina, caseína, gelatina, ovoalbúmina y gammaglobulinas. En una realización ejemplar, el agente bloqueante es albúmina sérica bovina.

En algunas realizaciones, la solución comprende una o más de las siguientes sustancias: maltodextrina, trehalosa, PEG, un agente bloqueante (*por ejemplo*, albúmina sérica bovina) y/o cloruro de sodio. En realizaciones ejemplares, uno o más de los componentes de la solución, por ejemplo, la maltodextrina, puede proporcionarse como una perla o gránulo liofilizado que se suspende tras la adición de un líquido, por *ejemplo*, agua, solución salina o una muestra líquida. Por ejemplo, uno o más de los componentes de la solución pueden suministrarse en una cubeta espectrofotométrica o en una cámara de reacción de un rotor analítico como una perla que se suspende en la solución tras la adición de un líquido.

En otras realizaciones, la señal PRLPS puede aumentarse sustancialmente mezclando los conjugados de detección primero y segundo con el analito en presencia de un material acelerante polimérico seleccionado entre polietilenglicol, polivinilpirrolidona, polialilamina, polietilenimina, polilisina, ácido poliacrílico, polivinilalcohol y ácido poliaspártico. De acuerdo con la invención reivindicada, el material polimérico es polietilenglicol (PEG). La mezcla de reacción comprende un material polimérico, PEG, a una concentración final de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL. En otra realización, la mezcla de reacción comprende un material polimérico, por *ejemplo*, PEG, a una concentración final de aproximadamente 0,2 mg/mL a aproximadamente 100 ng/mL. En otra realización, la mezcla de reacción comprende un material polimérico, por *ejemplo*, PEG, a una concentración final de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL. En otra realización, la mezcla de reacción comprende un material polimérico, por *ejemplo*, PEG, a una concentración final de aproximadamente 2 mg/mL a aproximadamente 8 mg/mL. En una realización ejemplar, la mezcla de reacción comprende un material polimérico, por *ejemplo*, PEG, a una concentración final de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mg/mL, incluidos todos los valores intermedios.

Los procedimientos de detección de la invención pueden utilizarse para determinar cantidades cualitativas o cuantitativas de un analito diana. Estos procedimientos son especialmente útiles para determinar la cantidad aproximada de un analito objetivo en una muestra, que puede utilizarse, *inter alia*, para diagnosticar determinadas enfermedades o evaluar la eficacia de un tratamiento farmacológico. En una realización, la cantidad de un analito diana puede determinarse estableciendo una curva estándar para el analito particular midiendo los cambios en las señales ópticas de la superficie de las nanopartículas metálicas como se describe en la presente memoria descriptiva para las muestras con una cantidad conocida de analito diana; determinando el cambio de la señal óptica para una muestra de prueba; y comparando el cambio de la señal óptica para la muestra de prueba con los valores obtenidos

para la curva estándar. En algunas realizaciones, la determinación de la cantidad de un complejo entre un primer reactivo y un segundo reactivo comprende la comparación de la relación de absorbencia y/o la velocidad de reacción de una muestra de ensayo con la relación de absorbencia y/o la velocidad de reacción de una muestra con una cantidad conocida de complejo, determinando así la cantidad del complejo en la muestra de ensayo. Los valores cuantitativos obtenidos de las muestras de ensayo pueden compararse con valores umbral predeterminados, en los que dichos valores umbral predeterminados son indicativos de un nivel anormal o normal del analito objetivo.

Los procedimientos de detección de la presente invención proporcionan una técnica altamente sensible para detectar cantidades diminutas de un analito diana en una muestra. En algunas realizaciones ilustrativas, la amplificación de las señales en base a la resonancia plasmónica superficial puede lograrse con conjugados de nanoestructuras de oro, de forma que se pueden detectar cantidades nanométricas del analito diana en una muestra. De este modo, en una realización ilustrativa de los procedimientos, se detecta la presencia de cantidades nanométricas de un analito diana.

De acuerdo con la invención reivindicada, las señales basadas en resonancia plasmónica procedentes de conjugados de detección que comprenden nanopartículas de oro pueden amplificarse utilizando conjugados de detección de nanoestructuras metálicas compuestas. El uso de nanoestructuras de plata revestidas de oro y conjugadas con un anticuerpo específico del analito puede permitir la detección de cantidades pictográficas del analito diana. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los procedimientos, se detecta la presencia de cantidades de picogramos del analito objetivo. En otras realizaciones de los procedimientos, se detecta la presencia de cantidades de femtogramos del analito objetivo. Pueden obtenerse mayores sensibilidades alterando la composición y/o la forma de las composiciones metálicas de nanoestructuras.

Cuando la luz incidente se aplica a las nanoestructuras metálicas, los electrones de la banda de conducción del metal oscilan colectivamente a la misma frecuencia de la onda electromagnética incidente. Como resultado de estas oscilaciones de resonancia, las nanoestructuras absorben y dispersan fuertemente la luz en un rango específico de longitudes de onda. En el caso de las nanoestructuras metálicas que comprenden metales nobles o de transición, este rango de longitudes de onda se encuentra en el espectro ultravioleta-visible-infrarrojo, dependiendo de la composición particular de las nanoestructuras. Por lo tanto, las fuentes de luz para aplicar energía electromagnética adecuadas para uso en los procedimientos de la invención pueden incluir cualquier fuente que pueda aplicar un intervalo de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible o ultravioleta-visible-infrarrojo, incluyendo lámparas de arco y láseres. En algunas realizaciones, la fuente de luz puede estar equipada con un monocromador de forma que se puedan aplicar longitudes de onda específicas.

Las propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas dependen de su tamaño, forma y composición. Por ejemplo, las nanopartículas de oro sólidas tienen una longitud de onda de pico de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de aproximadamente 515 nm a aproximadamente 560 nm, dependiendo del tamaño de las partículas. Las nanopartículas esféricas de oro que tienen un diámetro de 30 nm absorben al máximo a aproximadamente 520 nm con $\lambda_{\text{máx}}$ que se cambia a longitudes de onda más largas a medida que aumenta el diámetro de la partícula. Las partículas de plata y cobre tienen una $\lambda_{\text{máx}}$ en la región ultravioleta/azul o roja (por ejemplo, de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 500 nm) con el aumento del diámetro de la partícula provocando un cambio de $\lambda_{\text{máx}}$ hacia longitudes de onda más largas. Los nanorodillos metálicos tienen una $\lambda_{\text{máx}} 1$ transversal y una $\lambda_{\text{máx}} 2$ longitudinal. Las aleaciones de diferentes metales suelen presentar picos de absorción en un intervalo intermedio entre los picos de absorción de los metales que las comprenden. Por ejemplo, las nanoestructuras que comprenden una aleación 50/50 de oro y plata presentan una $\lambda_{\text{máx}}$ de aproximadamente 480 nm, con cantidades crecientes de oro que provocan un desplazamiento del pico de absorción hacia longitudes de onda más largas. La sensibilidad de las señales LSPR a los cambios en el índice de refracción del medio local puede modificarse cambiando la forma o la geometría de las nanoestructuras. Por ejemplo, las partículas no esféricas (por ejemplo, nanoprismas, nanorodillos, nanocarcasas, etc.) tienen una mayor sensibilidad PRLPS en comparación con las esferas. En algunas realizaciones, las propiedades ópticas (por ejemplo, absorción/dispersión en determinadas longitudes de onda) se adaptan a una aplicación concreta variando el tamaño, la forma o la composición de las nanoestructuras metálicas empleadas en los conjugados de detección.

La interacción entre la luz incidente y las nanoestructuras metálicas puede ser supervisada como luz reflejada o luz transmitida. La cantidad de luz incidente que es absorbida o dispersada puede medirse como un espectro de absorción en un modo de reflexión o el espectro de absorción en un modo de transmisión. En algunas realizaciones, la señal óptica medida desde las nanoestructuras metálicas puede ser una reflexión óptica, un espectro de absorbancia, un espectro de dispersión y/o un espectro de emisión.

El acoplamiento plasmónico entre las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección, resultante de la formación de complejos entre los socios de unión y el analito diana produce un cambio en el espectro de resonancia plasmónica superficial localizada de las nanoestructuras metálicas. Por ejemplo, dichos cambios pueden incluir un aumento de la extinción óptica, un aumento de la reflexión óptica, y/o un aumento de la señal de dispersión y/o emisión. En algunas realizaciones, el cambio en la señal óptica indicativa de la presencia del analito objetivo en la muestra incluye un desplazamiento, aumento o disminución de la dispersión óptica o una combinación de estas características. En ciertas realizaciones, el cambio en la señal óptica indicativo de la presencia del analito objetivo en la muestra es un desplazamiento de la longitud de onda del pico espectral. En ciertas realizaciones, el cambio en la señal óptica indicativo de la presencia del analito diana en la muestra es un cambio de la longitud de onda a una posición otra que el pico. Por ejemplo, el cambio en la señal óptica indicativa de la presencia del analito diana en la muestra puede ser el desplazamiento de la longitud de onda espectral del punto medio, el desplazamiento de la longitud de onda espectral

en la base de la longitud de onda o el desplazamiento de la longitud de onda espectral total, como el espectro de diferencia. En una realización, el desplazamiento de la longitud de onda en el pico espectral óptico puede ser un desplazamiento al rojo (*por ej.*, un desplazamiento a una longitud de onda más larga) dentro de una ventana espectral de 200 nm a 1200 nm. En otra realización, el cambio de longitud de onda en el pico espectral óptico puede ser un cambio azul (*por ej.*, un cambio a una longitud de onda más corta) dentro de una ventana espectral de 200 nm a 1200 nm. Los cambios en las señales ópticas pueden medirse en un punto de tiempo determinado tras un período de reacción establecido. Adicional o alternativamente, se pueden medir los cambios en la señal óptica a lo largo del período de reacción (*por ej.*, la determinación de la tasa). Ambos tipos de mediciones pueden utilizarse para el análisis cualitativo o cuantitativo de un analito objetivo.

5 Se conocen en la técnica diversos medios para medición de señales ópticas a diferentes longitudes de onda y adquirir espectros de extinción, dispersión o emisión. Cualquier instrumento espectrofotométrico o fotométrico es adecuado para uso en los procedimientos desvelados. Algunos ejemplos no limitantes incluyen lectores de placas, analizadores Cobas Fara y analizadores Piccolo xpress® y Vetscan (Abaxis, Inc., Union City, CA), lectores de fibra óptica (*por ej.*, LightPath™ S4 (LamdaGen, Menlo Park, CA)), instrumentos SPR (*por ejemplo*, instrumentos Biacore disponibles en GE Healthcare), analizadores centrífugos de Olympus, Hitachi, etc.

10 La presente invención también incluye con fines ilustrativos un complejo de ensayo que comprende (i) un primer conjugado de detección que comprende una nanoestructura metálica compuesta acoplada a un socio de unión, (ii) un analito diana, y (iii) un segundo conjugado de detección que comprende una nanoestructura metálica acoplada a un socio de unión, en el que el socio de unión en el conjugado de detección se une a un primer epítopo en el analito diana y el segundo conjugado de detección se une a un segundo epítopo en el analito diana, formando así un complejo que comprende el primer conjugado de detección, el analito diana y el segundo conjugado de detección. En algunas realizaciones, el complejo de ensayo está contenido en una cubeta adaptada para uso con un rotor centrífugo. En otras realizaciones, el complejo de ensayo está contenido dentro de una cámara de reacción en un rotor o disco centrífugo.

15 20 25 30 35 40 45 50 Cualquier tipo de analito diana puede ser detectado usando los procedimientos, dispositivos y complejos de ensayo de la presente invención, particularmente aquellos que son significativos en los diagnósticos de enfermedades. Un analito objetivo puede incluir, pero sin limitación, una proteína, una enzima, un antígeno, un anticuerpo, un péptido, un ácido nucleico (ARN, ADN, ARNm, miARN), una hormona, una glicoproteína, un polisacárido, una toxina, un virus, una partícula de virus, una molécula de fármaco, un hapteno o una sustancia química. En algunas realizaciones, el analito objetivo es un marcador o antígeno asociado a una enfermedad infecciosa en seres humanos y/o animales. En otras realizaciones, el analito objetivo es un marcador o antígeno asociado a un estado fisiológico o patológico particular.

En ciertas realizaciones, el analito diana es un antígeno patógeno o un anticuerpo contra un antígeno patógeno. Por ejemplo, el antígeno patógeno puede ser un antígeno viral (*por ejemplo*, el virus de la leucemia felina, el parvovirus canino, el virus del pie en la boca, , el virus de la gripe, el virus de la hepatitis a, b, c, el virus del VIH, el virus del papiloma humano, el virus de Epstein Barr, el virus de la rabia, etc.), un antígeno bacteriano (*por ejemplo*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Rickettsia*, etc.), un antígeno fúngico, o un antígeno parasitario (*por ejemplo*, gusano del corazón canino, *Giardia lamblia*, *plasmodium falciparum*, *trypanosomiasis africana*, *Trypanosoma brucei*, etc.). En casos específicos, el antígeno bacteriano puede ser de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Salmonella enterica*, *Bacillus anthracis* y *Rickettsia rickettsii*. En otras realizaciones, el analito objetivo es un antígeno relacionado con la enfermedad o un anticuerpo contra un antígeno relacionado con la enfermedad. Los antígenos relacionados con la enfermedad incluyen, pero no se limitan a, antígenos o marcadores relacionados con el cáncer (*por ejemplo*, PSA, AFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CEA, NY-ESO-1, MUC1, GM3, GD2, ERBB2, etc.), antígenos o marcadores relacionados con enfermedad cardiovascular (*por ejemplo*, troponina, proteína C reactiva, péptido natriurético cerebral, CKMB, proteína de unión a ácidos grasos, etc.), antígenos o marcadores relacionados con el metabolismo (*por ej.*, hormona estimulante del tiroides, tiroxina, leptina, insulina), o antígenos o marcadores relacionados con enfermedades autoinmunes (*por ejemplo*, autoanticuerpos). En ciertas realizaciones, el analito objetivo es un antígeno o marcador inflamatorio (*por ej.*, proteína C-reactiva, MRP14, MRP8, 25F9, etc.). En otras realizaciones, el analito objetivo es un antígeno o marcador relacionado con el embarazo (*por ej.*, un antígeno fetal, gonadotropina coriónica humana).

55 60 La presente divulgación también proporciona, con fines ilustrativos, un procedimiento de preparación de composiciones metálicas de nanoestructuras. En una realización, los procedimientos comprenden la preparación de una primera solución que comprende una mezcla de un polímero y ácido cloroauríco, la preparación de una segunda solución que comprende nanoestructuras de plata o cobre, y la incubación de la primera solución con la segunda durante un período de tiempo, en el que la mezcla resultante comprende nanoestructuras de plata revestidas por oro o nanoestructuras de cobre revestidas por oro. La mezcla resultante tiene preferentemente un pico de absorbancia de aproximadamente 515 nm a aproximadamente 670 nm, o de aproximadamente 520 nm a aproximadamente 560 nm. En una realización, la mezcla resultante tiene un pico de absorbancia de aproximadamente 530 nm a aproximadamente 545 nm. En otra realización, el procedimiento comprende la preparación de una primera solución que comprende una mezcla de un detergente tal como CHAPS y ácido cloroauríco, y una solución que comprende sales de plata o cobre, y la incubación de la primera solución con la segunda solución que contiene un agente reductor, tal como ácido ascórbico que conduce a la formación de nanoestructuras compuestas. El tamaño y la forma de las

nanoestructuras pueden variarse modificando la proporción de metales utilizados, la concentración de detergente y, por último, la cantidad de ácido ascórbico empleada.

El polímero utilizado en la preparación de la primera solución puede ser cualquiera de la polivinilpirrolidona, el alcohol polivinílico, el poliacrilato, el polietenglíclico, la polietilenimina, el ácido poliaspártico, el ácido poliglutámico, diversas gomas, la gelatina o polímeros mixtos que comprenden cualquiera de los anteriores. En una realización particular, el polímero es polivinilpirrolidona. Se pueden obtener diferentes tipos de nanoestructuras revestidas variando el peso molecular del polímero. Los intervalos de peso molecular adecuados del polímero incluyen desde aproximadamente 5.000 Daltons hasta aproximadamente 150.000 Daltons, desde aproximadamente 10.000 Daltons hasta aproximadamente 100.000 Daltons, desde aproximadamente 20.000 Daltons hasta aproximadamente 80.000 Daltons. En algunas realizaciones, el polímero tiene un peso molecular inferior a 50.000 Daltons. En otras realizaciones, el polímero tiene un peso molecular inferior a 20.000 Daltons. En ciertas realizaciones, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons.

Las características del revestimiento de oro pueden controlarse ajustando la relación de concentración del polímero con ácido cloroauríco. Por ejemplo, la relación de concentración entre polímero y ácido cloroauríco es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1, o de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 8:1. En algunas realizaciones, la relación de concentración entre polímero y ácido cloroauríco es de 1:1. Las concentraciones adecuadas de polímero incluyen, pero sin limitación, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % en peso/húmedo en agua o etanol. Las concentraciones adecuadas de ácido cloroauríco incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 1,0 M, aproximadamente 0,010 M a aproximadamente 0,500 M, y aproximadamente 0,050 M a aproximadamente 0,100 M.

La eficacia y el espesor del revestimiento también pueden verse afectados por el pH y el contenido de haluros de la solución de revestimiento (es decir, la primera solución). En ciertas realizaciones, el pH de la solución se mantiene en un intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 14. El contenido de haluros de la solución es, en algunas realizaciones, inferior a 150 mM. En otras realizaciones, el contenido de haluro de la solución está en el intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 mM.

Los procedimientos de preparación de soluciones de nanoestructuras de plata y cobre son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la segunda solución que comprende nanoestructuras de plata o cobre puede prepararse mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la Publicación de Patente de los EE.UU. Núm. 2012/0101007, Publicación de Patente de los EE.UU. Núm. 2014/0105982o Publicación de Patente de los EE.UU. Núm. 2013/0230717. En una realización, la segunda solución que comprende nanoestructuras de plata o cobre se prepara mezclando una fuente de plata o cobre con un agente reductor. Una fuente de plata adecuada incluye una sal de plata, tal como nitrato de plata. Las fuentes de cobre adecuadas incluyen sulfato de cobre (II), cloruro de cobre (II), hidróxido de cobre (II) y nitrato de cobre (II), acetato de cobre (II) y trifluoroacetato de cobre (II). Los agentes reductores que pueden reaccionar con las fuentes de plata o cobre para formar las nanoestructuras pueden incluir glucosa, ácido ascórbico, borohidruro de sodio y soluciones alcalinas (*por ej.*, con un pH superior a 7,5) de polímeros tal como PVP. En ciertas realizaciones, el agente reductor es el ácido ascórbico. La forma y el pico espectral óptico deseados de las nanoestructuras de plata o de las nanoestructuras de cobre pueden obtenerse ajustando las proporciones o las concentraciones de los reactivos, como es sabido por los expertos en la técnica. Sólo a modo de ejemplo, altas concentraciones del agente reductor pueden dar lugar a nanoestructuras de forma pentagonal y bipiramidal, mientras que bajas concentraciones del agente reductor pueden dar lugar a nanohilos alargados o tubos. Dependiendo de las formas particulares de las nanoestructuras, la segunda solución que comprende nanoestructuras de plata o de cobre puede tener un pico de absorbancia de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 1000 nm, de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 630 nm a aproximadamente 680 nm, de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 850 nm, de aproximadamente 900 nm a aproximadamente 940 nm, de aproximadamente 580 nm a aproximadamente 620 nm, o de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 750 nm. En ciertas realizaciones, la segunda solución que comprende nanoestructuras de plata tiene un pico de absorbancia de aproximadamente 600 nm (es decir, de 595 nm a 605 nm, inclusive). En algunas realizaciones, la segunda solución que comprende nanoestructuras de cobre tiene un pico de absorbancia de aproximadamente 585 nm (es decir, de 580 nm a 590 nm, inclusive). En algunas realizaciones, el pico de absorbancia de una solución con nanoestructuras de cobre es mayor (es decir, desplazado al rojo) que el pico de absorbancia de una solución con nanoestructuras de plata de tamaño y forma similares.

En algunas realizaciones, el período de incubación de la primera solución con la segunda solución es de al menos 12 horas. En otras realizaciones, el período de incubación de la primera solución con la segunda solución es superior a 24 horas, preferentemente superior a 48 horas, más preferentemente al menos 72 horas. Por consiguiente, los cambios en el pico de absorbancia de la mezcla de reacción pueden ser monitoreados durante el período de incubación para ajustar el tiempo de incubación. Por ejemplo, los desplazamientos del pico de absorbancia a longitudes de onda más cortas, por ejemplo en la región de 520 nm a 550 nm, pueden indicar que las nanoestructuras revestidas por oro se han estabilizado. En ciertas realizaciones, la estabilidad de las nanoestructuras resultantes al cloruro de sodio (*por ejemplo*, 0,25-1M) se utiliza para indicar un revestimiento adecuado de las nanoestructuras. Las partículas revestidas de CTAB, como los nanorodillos, son resistentes al cloruro sódico.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación describe además procedimientos de síntesis de nanoestructuras con densidades ópticas superiores a aproximadamente 50/ml. En un caso, los procedimientos comprenden la mezcla de un polímero como el descrito en la presente memoria con ácido cloroaurico, la agitación de la mezcla a una temperatura establecida durante un primer período de tiempo, la adición de ácido ascórbico a la mezcla y la incubación de la mezcla durante un segundo período de tiempo. El tamaño y la forma de las nanoestructuras vienen dictados por la relación de concentración entre el polímero y el ácido cloroaurico y por la temperatura y el tiempo de incubación. Las concentraciones de polímero y ácido cloroaurico pueden estar en los rangos descritos anteriormente. La temperatura puede ajustarse en función del tamaño y la forma de las nanoestructuras deseadas, pero puede oscilar entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 100 °C. Del mismo modo, el período de incubación (es decir, el primer período de tiempo) puede ajustarse en función de las propiedades deseadas de las nanoestructuras, pero puede oscilar entre aproximadamente 15 minutos y un día.

En algunas realizaciones, se añade a la mezcla entre 0,1 y 1 partes de ácido ascórbico (*por ejemplo*, entre 1 y 5 M) tras el primer período de incubación. El segundo período de incubación tras la adición del ácido ascórbico puede ser de 1 a 24 horas aproximadamente. Sin suscribir a ninguna teoría, la adición de ácido ascórbico proporciona un aumento sustancial en la cantidad de nanoestructuras producidas.

En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden además la adición o el dopaje de la mezcla con aproximadamente 1 a aproximadamente 100 partes de cloruro de oro (*por ejemplo*, aproximadamente 0,001 M a 1M) o nitrato de plata (*por ejemplo*, aproximadamente 0,001 M a 1M) u otro metal (*por ejemplo*, metal noble, metal de transición, metal alcalino o lantánido). Esta etapa de dopaje puede aumentar aún más la intensidad de la resonancia de las nanoestructuras resultantes. En algunas realizaciones, se añade a la mezcla cloruro de oro, nitrato de plata u otro metal antes de añadir ácido ascórbico a la reacción. En otras realizaciones, se añade cloruro de oro, nitrato de plata u otro metal a la mezcla tras la adición de ácido ascórbico. El orden de adición del metal y del ácido ascórbico puede ajustarse para adaptar las nanoestructuras resultantes a la forma y el tamaño deseados.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona procedimientos para sintetizar nanopartículas compuestas. En ciertas realizaciones, las nanopartículas de plata/oro se sintetizan en un único recipiente añadiendo cantidades predeterminadas de los siguientes reactivos en sucesión y con una mezcla minuciosa: (1) un tensioactivo (*por ejemplo*, iónico [aniónico, catiónico o zwitteriónico], o no iónico) o agente de revestimiento como 3-((3-Colamidopropil) dimetilamino)-1-propanesulfonato (CHAPS), SDS, Tween, Triton, o cualquiera de los detergentes sulfobetaína, (2) cloruro de oro, (3) agua, (4) nitrato de plata, (5) citrato trisódico y, por último, (6) ácido ascórbico para iniciar la formación de nanopartículas. En otras realizaciones, las nanopartículas se sintetizan en un único recipiente añadiendo cantidades predeterminadas de lo siguiente, en el siguiente orden: (1) un tensioactivo o agente de revestimiento como CHAPS, SDS, Tween, Triton, CTAB, o cualquiera de los detergentes de sulfobetaína, (2) cloruro de oro, (3) nitrato de plata, (4) citrato trisódico, (5) agua, y (6) un reductor. En algunas realizaciones, el reductor se compone de CHAPS, ácido ascórbico, citrato trisódico y agua. En otras realizaciones, el reductor se compone de unos 200 mg de CHAPS, unos 4 g de ácido ascórbico, unos 117,6 mg de citrato de trisodio y unos 15,68 g de agua. En algunas realizaciones, aproximadamente 1 mL de CHAPS acuoso al 1% (peso/peso) se mezcla secuencialmente con aproximadamente 0,25 mL de cloruro de oro 0,1M, aproximadamente 0,5 mL de nitrato de plata 0,02M, aproximadamente 0,05 mL de citrato trisódico 1M, aproximadamente 6,2 mL de agua y aproximadamente 2 mL del reductor. La modificación de las concentraciones de diversos ingredientes activos, como sales metálicas, agentes de revestimiento, reductores y pH de la solución, da lugar a distintos tipos de partículas (*por ejemplo*, nanoesferas, nanoestrellas o nanorodillos) y a una composición diferente de las nanopartículas.

En algunas realizaciones, las nanoestrellas se forman mezclando, en orden, agua, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de oro, ácido ascórbico y semillas de nanoesferas de oro preformadas. En otras realizaciones, se mezclan en ese orden unos 0,825 mL de agua, unos 0,1 mL de CTAB al 20%, unos 0,025 mL de cloruro de oro 0,1 M, unos 0,05mL de ácido ascórbico 1M y unos 0,05 mL de semillas de nanoesferas de oro. La edad de las semillas y la proporción entre las semillas y los iones metálicos influyen en la geometría y, por tanto, en los espectros ópticos de las nanopartículas.

La formación de nanomateriales mediante el uso de los procedimientos proporcionados en la presente memoria descriptiva se completa esencialmente en cuestión de minutos, pero puede dejarse que alcance el equilibrio durante la noche. La síntesis de nanopartículas puede controlarse mediante espectroscopia y confirmarse mediante microscopía electrónica de barrido o de transmisión.

En algunas realizaciones, el tamaño y, por tanto, las propiedades ópticas pueden modificarse alterando la concentración del agente tensioactivo o de revestimiento, el ácido ascórbico, el citrato trisódico, el cloruro de oro y/o el nitrato de plata. El tamaño de las nanoestrellas sintetizadas aumenta con el incremento del contenido de plata hasta cierto punto y a continuación disminuye. Estos cambios se reflejan en el pico PRLPS de las nanoestrellas sintetizadas, ya que el pico se desplaza hacia el rojo al aumentar la relación plata/oro, pero a continuación comienza a desplazarse hacia el azul en las relaciones molares de oro: Plata: 5:2. Las concentraciones finales del detergente elegido en la mezcla de reacción pueden variar del 0,05 al 5%, predominando las partículas más pequeñas a concentraciones más altas del detergente. El aumento de las concentraciones de ácido ascórbico produce nanoestrellas más pequeñas con una concentración final de ácido ascórbico que varía de 0,05 a 0,2M. Del mismo modo, el aumento de la concentración de citrato trisódico de 10 mM a 100 mM disminuye el tamaño de las nanoestrellas.

En algunas realizaciones, las nanoaleaciones de oro-plata pueden sintetizarse en condiciones de reducción alcalina mezclando CTAB (por ejemplo, CTAB disuelto en alcohol) con cloruro de oro y nitrato de plata. En algunas realizaciones, la formación de nanoaleaciones puede inducirse mezclando, en orden, agua, CTAB, cloruro de oro (0,5 mM a 5 mM), nitrato de plata (20% a 80% de oro), ácido ascórbico (10 mM a 200 mM) o un reductor que contenga ácido ascórbico, citrato trisódico y CHAPS, y NaOH (50% a 200% de ácido ascórbico). En otras realizaciones, las nanoaleaciones se forman mezclando unos 0,825 ml de agua, unos 0,1 ml de CTAB al 20% preparado en isopropanol, unos 0,025 ml de cloruro de oro 0,1M, unos 0,005-0,025 ml de nitrato de plata 0,1M, unos 0,05 ml de ácido ascórbico 1M y unos 0,05 ml de NaOH 1M. Las concentraciones de CTAB pueden variar de 0,05M a 0,2M, favoreciendo las concentraciones más bajas un mayor contenido de nanoestrellas sintetizadas. El pH ácido favorece la formación de nanorodillos y se obtienen mayores relaciones de aspecto al disminuir el pH.

Esta invención se ilustra además con los siguientes ejemplos adicionales que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Ensayo directo utilizando la amplificación de señales PRLPS

En este ejemplo, se prepara una reacción en blanco añadiendo una solución que contenga conjugado coloidal de anticuerpo policlonal anti-gusano del corazón, un medio dispersante adecuado tal como solución salina tamponada con fosfato, y una muestra desprovista de antígeno del gusano del corazón. Los cambios espectrales se registran durante un periodo de tiempo. A continuación, se establece un conjunto de controles positivos añadiendo cantidades conocidas de antígeno del gusano del corazón a las soluciones de reacción utilizadas en la solución en blanco anterior. Alternativamente, se registra una reacción en blanco y a continuación se añaden cantidades conocidas de antígeno del gusano del corazón para preparar una curva de calibración que correlacione el cambio en el barrido espectral con las concentraciones de antígeno. Esta curva de calibración se utiliza entonces para calcular la cantidad de antígeno del gusano del corazón en una muestra desconocida. El desplazamiento en la exploración espectral significa (1) un cambio en λ_{max} , (2) espectro de diferencia entre muestras positivas y negativas, o (3) espectros derivados.

Ejemplo 2. Ensayo en sándwich que utiliza la amplificación de señales PRLPS

Los ensayos en sándwich son más adecuados cuando un analito muestra al menos dos sitios de unión distintos (epítopos de un antígeno) con cada sitio de unión a un socio de unión específico. Así, en este ejemplo, un anticuerpo dirigido hacia un epítopo de la PCR se inmoviliza en las nanopartículas de oro y/o plata y el segundo anticuerpo dirigido hacia un epítopo no solapante se marca con oro y/o plata coloidal. Esta configuración permite medir el antígeno de la PCR, ya que la cantidad de antígeno de la PCR en la muestra determina la magnitud del cambio espectral. El cambio espectral también se observa cuando no se marca el segundo anticuerpo, pero el cambio es varios órdenes de magnitud inferior. La composición metálica de las nanopartículas puede modificarse para optimizar las condiciones de reacción.

Ejemplo 3. Realización de ensayos en un rotor

Los ensayos competitivos directos o los ensayos tipo sándwich pueden realizarse en un rotor centrífugo, tal como el rotor descrito en las patentes US Nos. 5,061,381, 5,122,284, 5,186,844, 5,304,348, 5,457,053, y 5,693,233. En este caso, los conjugados de nanopartículas de los dos anticuerpos monoclonales emparejados o una mezcla de anticuerpos policlonales que se unen a más de un epítopo se añaden como perlas liofilizadas. El ensayo PRLPS en fase de solución funciona tanto con anticuerpos monoclonales como policlonales.

Ejemplo 4. Potenciación de las señales PRLPS por medio de polietilenglicol o polímeros similares

Los datos presentados en las Figuras 4 y 9A-9C muestran que las señales PRLPS aumentan sustancialmente en presencia de polietilenglicol. Pueden utilizarse PEG con diferentes pesos moleculares a concentraciones optimizadas para obtener la selectividad deseada en un ensayo determinado. Se puede sustituir el PEG por polivinilpirrolidona o materiales poliméricos similares para obtener condiciones de reacción optimizadas para un conjunto dado de nanopartículas y/o el conjunto de socios de unión específicos.

Ejemplo 5. La adición de maltodextrina mejora la sensibilidad del ensayo

Se llevaron a cabo varios experimentos para determinar los efectos de varios azúcares y otros agentes para minimizar los efectos de sedimentación y retener las señales PRLPS. Como se muestra en la Figura 16, la maltodextrina aumentó sorprendentemente la señal, que mejoró aún más con la presencia de BSA. Por el contrario, la intensidad de la señal PRLPS no era tan fuerte cuando se añadía trehalosa, sorbitol o ciclodextrina (datos no mostrados). Además, el problema de la sedimentación también se resolvió mediante la adición de maltodextrina y BSA (Figura 17). Se detectaron aproximadamente 50 pg/ml de TSH con determinadas cantidades de PEG, BSA y maltodextrina (Figura 18).

Ejemplo 6. Síntesis de nanoestrellas de oro y partículas de aleación de oro y plata y usos de las mismas

Se utilizaron procedimientos novedosos para sintetizar nanomateriales para su uso en ensayos plasmónicos tales como los ensayos plasmónicos en fase de solución descritos en la presente memoria descriptiva.

Se prepararon nanoestrellas recubiertas de CHAPS o nanoestrellas revestidas de CTAB utilizando los siguientes procedimientos. Para las nanoestrellas revestidas de CHAPS, se preparó 1 ml de CHAPS acuoso al 1% (peso/peso)

5 (3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfonato) en un recipiente adecuado. 0,25 ml de cloruro de oro 0,1 M, 0,5 ml de nitrato de plata 0,02 M, 0,05 ml de citrato trisódico 1 M, 6,2 ml de agua y, por último, 2 ml de reductor (200 mg de CHAPS, 4 g de ácido ascórbico, 117,6 mg de citrato trisódico, 15,68 g de agua) se agitaron en el recipiente secuencialmente y se mezclaron bien durante al menos una hora. Tras diluir a 1:20 en agua, se leyó el espectro óptico.

10 En algunas realizaciones, el tamaño y, por tanto, las propiedades ópticas pueden modificarse alterando la concentración de CHAPS, ácido ascórbico, citrato trisódico, cloruro de oro y nitrato de plata.

Para las nanoestrellas revestidas de CTAB, se disolvió bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en isopropanol a una concentración del 20% (peso/peso). Todos los demás reactivos eran acuosos. La formación de nanoestrellas se indujo mezclando en orden: 0,825 ml de agua, 0,1 ml de CTAB al 20%, 0,025 ml de cloruro de oro 0,1M, 0,05 ml de ácido ascórbico 1M y, por último, 0,05 ml de semillas de nanoesferas de oro preformadas. En algunas realizaciones, el tamaño y, por tanto, las propiedades ópticas pueden modificarse alterando la concentración de los componentes. Las soluciones acuosas de CTAB a 30 °C produjeron nanorodillos cuando se utilizaron semillas frescas para sembrar nanorodillos. Las soluciones de CTAB preparadas en isopropanol pueden utilizarse a temperatura ambiente, pero favorecen la síntesis de nanoestrellas frente a la de nanorodillos.

20 Se sintetizaron nanoaleaciones de oro-plata en condiciones de reducción alcalina mezclando CTAB disuelto en isopropanol con cloruro de oro y nitrato de plata. La formación de nanoaleaciones se indujo mezclando en orden: agua (para hacer un volumen de reacción total de un ml), 0,2 ml de CTAB al 20% (en isopropanol), 0,025 ml de cloruro de oro 0,1M, 0-0,05 ml de nitrato de plata 0,02M, 0,02 ml de reductor que contenía ácido ascórbico, CHAPS y citrato trisódico y, por último, 0,05 ml de NaOH 1M. En algunas realizaciones, los reductores contienen CHAPS, citrato trisódico y ácido ascórbico. El pH ácido favorece la producción de nanoestrellas y nanorodillos, dependiendo de la edad de las semillas.

25 El espectro óptico de las nanopartículas de aleación de oro/plata sintetizadas mediante la reacción de cloruro de oro con CTAB antes de la adición de nitrato de plata, seguida de la adición de ácido ascórbico y, por último, hidróxido de sodio, se muestra en la figura 10. Al aumentar el contenido de plata en las partículas de nanoaleación se produce un desplazamiento azul lineal en λ_{max} y al aumentar el contenido de oro en las partículas de nanoaleación se produce un desplazamiento rojo, como se muestra en la figura 11.

30 Para preparar nanoestrellas de oro/plata revestidas con CHAPS, se añadió cloruro de oro a CHAPS antes de añadir nitrato de plata y citrato trisódico. La formación de nanoestrellas se indujo mediante la adición de una solución reductora que contenía ácido ascórbico, CHAPS y citrato trisódico. En la figura 13 se muestran los espectros ópticos de las nanoestrellas de oro/plata revestidas con CHAPS λ_{max} se desplaza hacia el rojo hasta una determinada concentración de plata y después hacia el azul. Así, se produjeron nanoestrellas de diferentes tamaños cambiando la proporción de oro y plata en el medio de reacción.

35 Los anticuerpos se unieron a nanoestrellas o nanoaleaciones utilizando el siguiente procedimiento. Se centrifugó un volumen adecuado de solución de nanoestrella o nanoaleación a una fuerza g adecuada. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se sustituyó por un volumen igual de CHAPS al 1%. Se leyó una dilución 1:20 en agua para el espectro y la DO en λ_{max} . En un tubo de microcentrifuga de 2 ml, se añadió agua, borato 0,5M (pH 9,2), CHAPS al 1%, nanoestrellas/nanoaleaciones lavadas del paso 1 y el anticuerpo deseado, en esa secuencia. Las cantidades de las soluciones se ajustaron de modo que la concentración final de CHAPS fuera de 0,1%, la de borato de 0,05 a 0,1M, la DO de las partículas de 2 por ml y la concentración de anticuerpos de 1-10 µg/OD. Después de 5-10 min de incubación, se añadió un volumen igual de diluyente de conjugado CG (3x PBS, 1%BSA, 2%CHAPS, y 0,1% azida sódica) y se mezcló bien, después se centrifugó a 5000 g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, y el conjugado se resuspendió en el diluyente de conjugado CG hasta el volumen original. La etapa de centrifugación se repitió una vez, y el pellet final se resuspendió en 1/5 del volumen original de diluyente del conjugado CG. Se leyó el espectro de DO de la dilución 1:10. En este punto, los conjugados están listos para su uso terapéutico o en inmunoensayos. Como se conoce en la bibliografía, los anticuerpos se unen a las nanopartículas sintetizadas añadiendo anticuerpos a las soluciones diluidas de nanopartículas.

40 La Figura 12 muestra la inmunorreactividad de conjugados de IgG de ratón con nanopartículas de aleación de oro y oro/plata (50%/50% equimolar). Los conjugados sintetizados por adsorción pasiva de la IgG de ratón en partículas de oro o de aleación se sometieron a pruebas de reactividad con la proteína A rayada en una tira de nitrocelulosa de flujo lateral.

45 55 Las nanoestrellas de oro/plata mostraron un desplazamiento de pico mucho mayor hacia el rojo al unirse a IgG de ratón, en relación con las nanopartículas de oro solo producidas en ausencia de plata. En la Figura 14 se muestra el desplazamiento del pico hacia el rojo tras la unión de IgG de ratón a nanopartículas de oro solamente, y en la Figura 15 se muestra el desplazamiento del pico hacia el rojo tras la unión de IgG de ratón a nanoestrellas de oro/plata producidas en presencia de ~37,5% de plata.

En algunas realizaciones, las condiciones de centrifugación, la fuerza iónica, el pH y la proporción anticuerpo-nanomaterial pueden optimizarse para cada tipo de combinación anticuerpo-nanomaterial. Los expertos en la materia conocen bien procedimientos alternativos de conjugación por medio de enlaces covalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de un analito diana en una muestra basado en resonancia de plasmón superficial localizada, el procedimiento comprende:
 - (a) mezclar la muestra con un primer conjugado de detección y un segundo conjugado de detección en presencia de polietilenglicol, en el que el polietilenglicol está presente a una concentración de entre 0,1 mg/mL y 200 mg/mL, en el que el primer y el segundo conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas compuestas acopladas a socios de unión que son capaces de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra para formar un complejo entre el primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección en solución;
 - (b) exponer el complejo a una fuente de luz en un intervalo de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y
 - (c) medir una señal óptica del complejo, en el que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito diana en la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) de mezclado se produce en presencia adicional de cloruro sódico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la señal óptica es una reflectancia, un espectro de absorbencia, un espectro de dispersión o un espectro de emisión;
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cambio en la señal óptica comprende un desplazamiento de longitud de onda espectral de pico y/o un desplazamiento de longitud de onda espectral total, opcionalmente en el que el desplazamiento de longitud de onda espectral total es un espectro de diferencia.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (a) se realiza en una cubeta espectrofotométrica, un rotor analítico, una placa de micropocillos, un analizador clínico, una cámara de flujo, en la punta de una fibra óptica o en un gel transparente.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada una de las nanoestructuras metálicas compuestas es una aleación de un primer metal y un segundo metal, o en el que cada una de las nanoestructuras metálicas compuestas comprende un núcleo de un primer metal y un revestimiento de un segundo metal, opcionalmente en el que (i) cada una de las nanoestructuras metálicas compuestas comprende un revestimiento de oro y un núcleo de plata; o (ii) cada una de las nanoestructuras compuestas comprende un revestimiento de plata y un núcleo de oro.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las composiciones de nanoestructuras tienen una geometría seleccionada de nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanocarcasas, nanotubos, nanorodillos, nanopuntos, nanoislas, nanocables, o sus combinaciones.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el socio de unión es una macromolécula biológica seleccionada entre un anticuerpo o un fragmento del mismo, un antígeno, un receptor, un ligando, un polinucleótido, un aptámero, un polipéptido, un polisacárido, un lipopolisacárido, un glucopéptido, una lipoproteína o una nucleoproteína.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer conjugado de detección y el segundo conjugado de detección comprenden socios de unión que son anticuerpos, opcionalmente en el que los anticuerpos se unen a diferentes epitopos del analito diana.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el analito diana es un antígeno patógeno o un anticuerpo contra un antígeno patógeno, en el que el antígeno patógeno es un antígeno viral, bacteriano o fúngico, opcionalmente en el que el antígeno bacteriano se selecciona entre *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Salmonella*, *Bacillus* y *Rickettsia*, opcionalmente entre *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Salmonella enterica*, *Bacillus anthracis* y *Rickettsia rickettsii*.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa (a) de mezclado se produce en presencia adicional de:
 - (i) un polisacárido, y/o
 - (ii) un agente bloqueante.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el polisacárido se selecciona entre maltodextrina, jarabe de maíz y poliglucosa, opcionalmente en el que el polisacárido es maltodextrina y la concentración final de maltodextrina en la mezcla de reacción es del 2% al 20% en peso/vol.

13. El procedimiento de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, en el que el agente bloqueante se selecciona entre albúmina sérica bovina, caseína, gelatina, ovoalbúmina y gammaglobulinas, opcionalmente en el que el agente bloqueante es albúmina sérica bovina y la concentración final de albúmina sérica bovina en la mezcla de reacción es del 1% al 5% p/vol.

5 14. Un dispositivo de detección de analitos para detección en base a resonancia plasmónica superficial localizada, comprendiendo el dispositivo de detección de analitos:

un primer conjugado de detección, en el que el primer conjugado de detección comprende una nanoestructura metálica acoplada a un socio de unión que es capaz de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra; y

10 un segundo conjugado de detección, en el que el segundo conjugado de detección comprende una nanoestructura metálica acoplada a un socio de unión que es capaz de unirse específicamente al analito diana si está presente en la muestra,

en la que los conjugados de detección primero y segundo están en una solución que comprende polietilenglicol, en la que el polietilenglicol está presente en una concentración de entre 0,1 mg/mL y 200 mg/mL, y

15 en la que la nanoestructura metálica del primer conjugado de detección y/o del segundo conjugado de detección es una nanoestructura metálica compuesta.

15. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 14, en el que la solución comprende además cloruro sódico.

20 16. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 14 o de la reivindicación 15, en el que el dispositivo de detección de analitos es una cubeta espectrofotométrica, un rotor analítico, una placa de micropocillos o una cámara de flujo.

25 17. El dispositivo de detección de analitos de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el dispositivo está configurado para exponer un complejo del primer conjugado de detección, el analito y el segundo conjugado de detección a una fuente de luz en un intervalo de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo, opcionalmente en el que el dispositivo está configurado además para medir una señal óptica del complejo, en el que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito diana en la muestra.

18. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o el dispositivo de detección de analitos de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en el que el procedimiento o el dispositivo de detección de analitos es capaz de detectar cantidades de nanogramos, picogramos o femtogramos del analito diana.

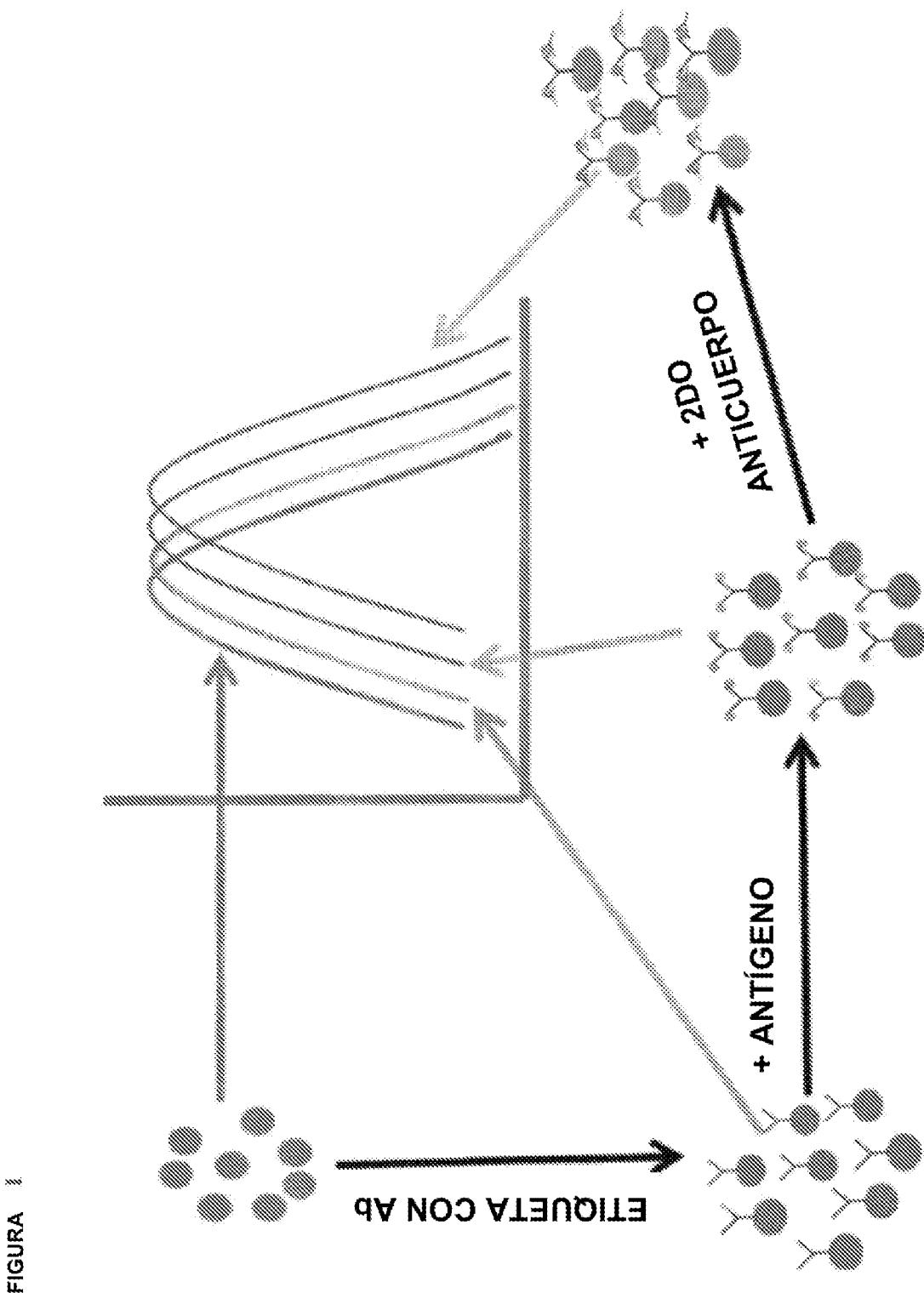
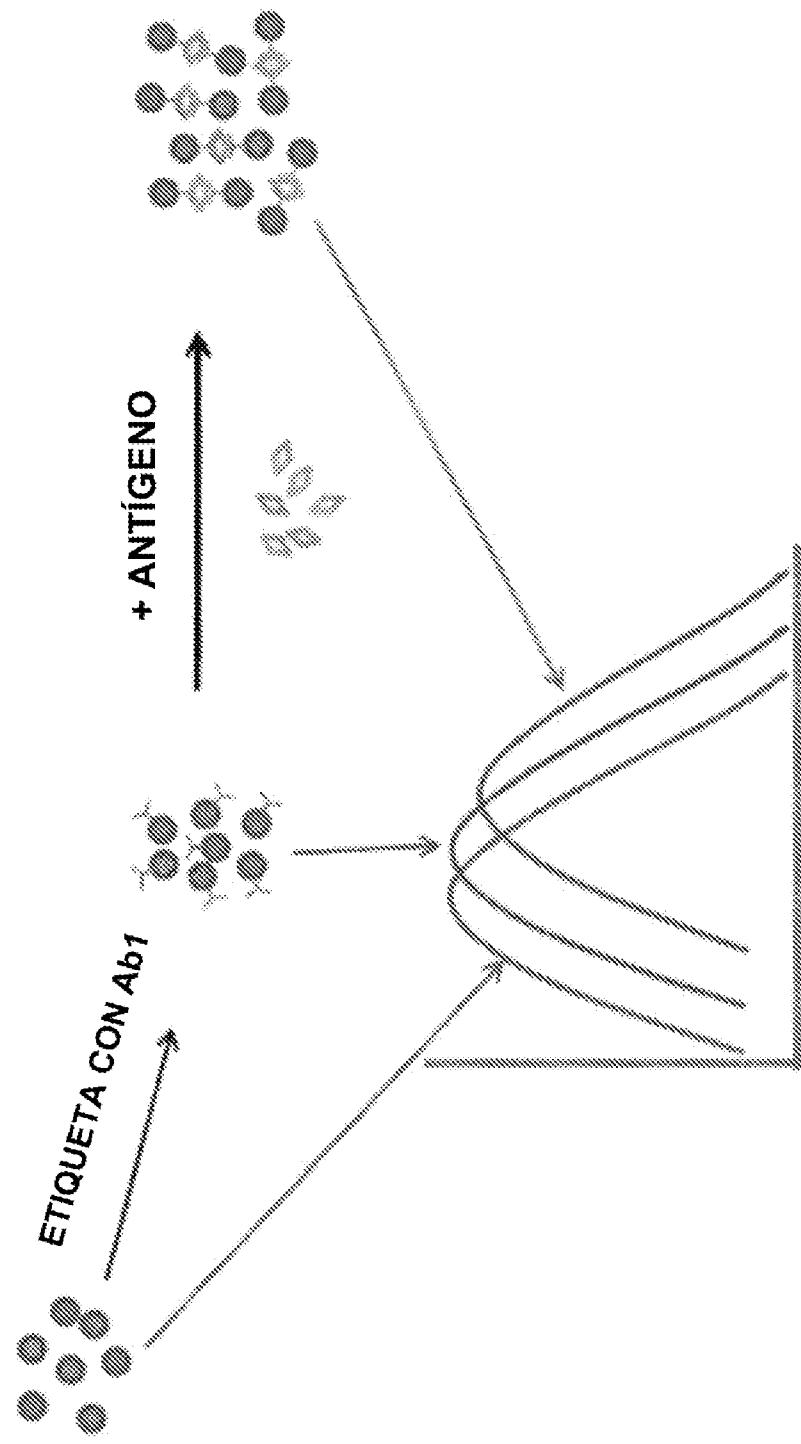


FIGURA 2

NANOPARTÍCULAS



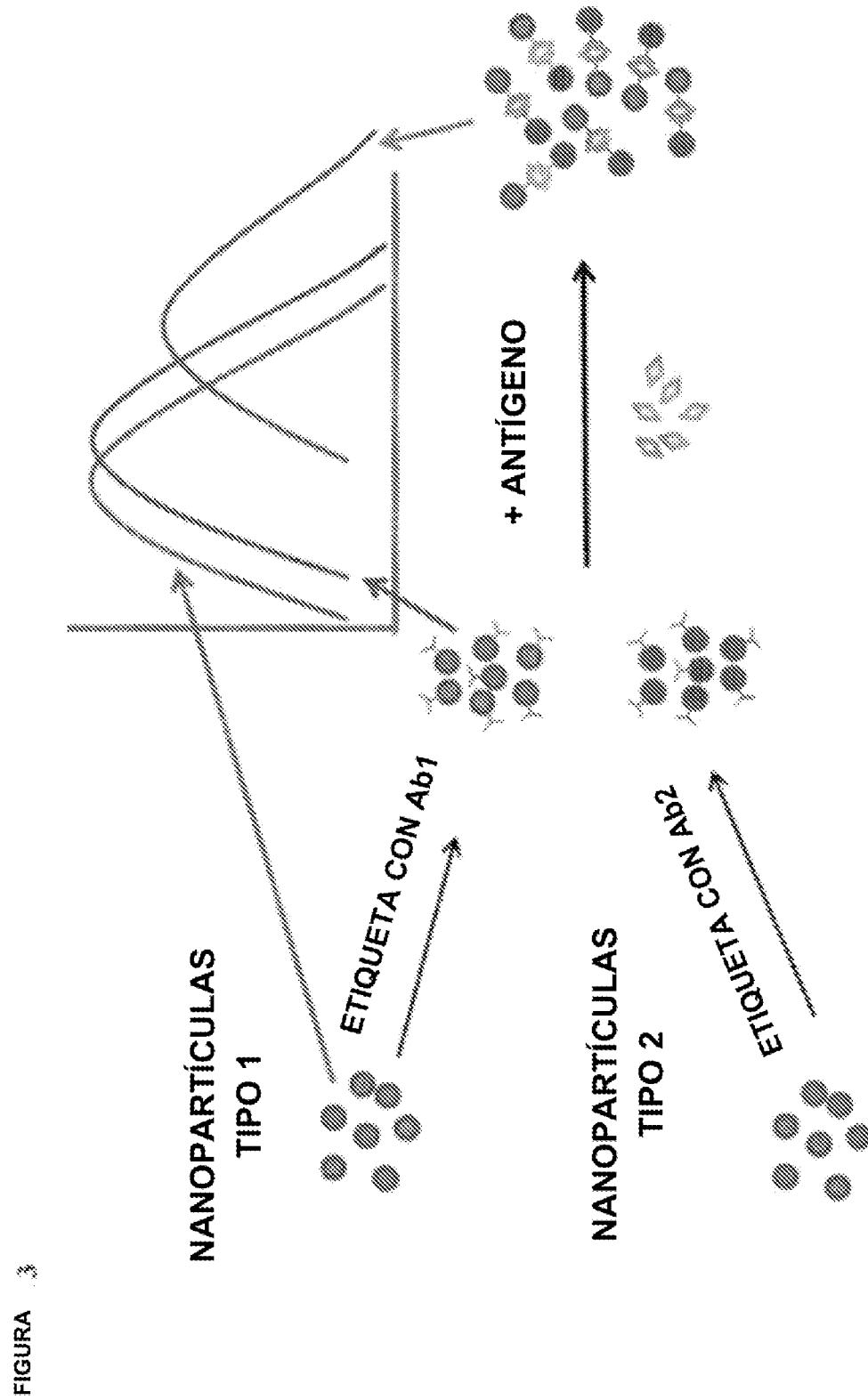


FIGURA 4

**ENSAYO CHW DE CAMBIO DE LONGITUD DE ONDA UTILIZANDO
CONJUGADO COMERCIAL (EFECTO PEG)**

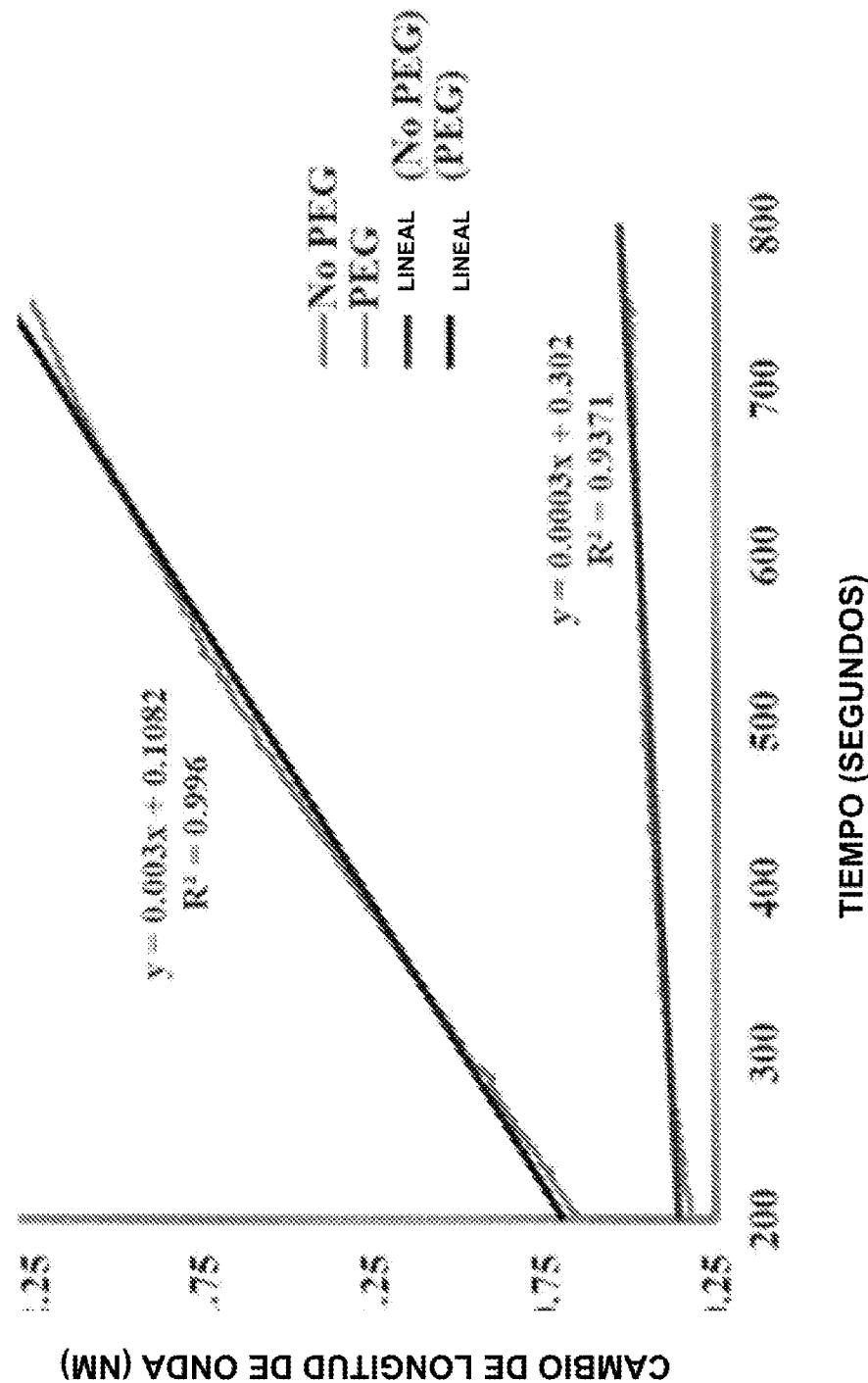


FIGURA 8

ENSAYO CHW DE CAMBIO DE LONGITUD DE ONDA UTILIZANDO ÚNICAMENTE ORO Y CONJUGADOS ANISOTRÓPICOS (CON PEG)

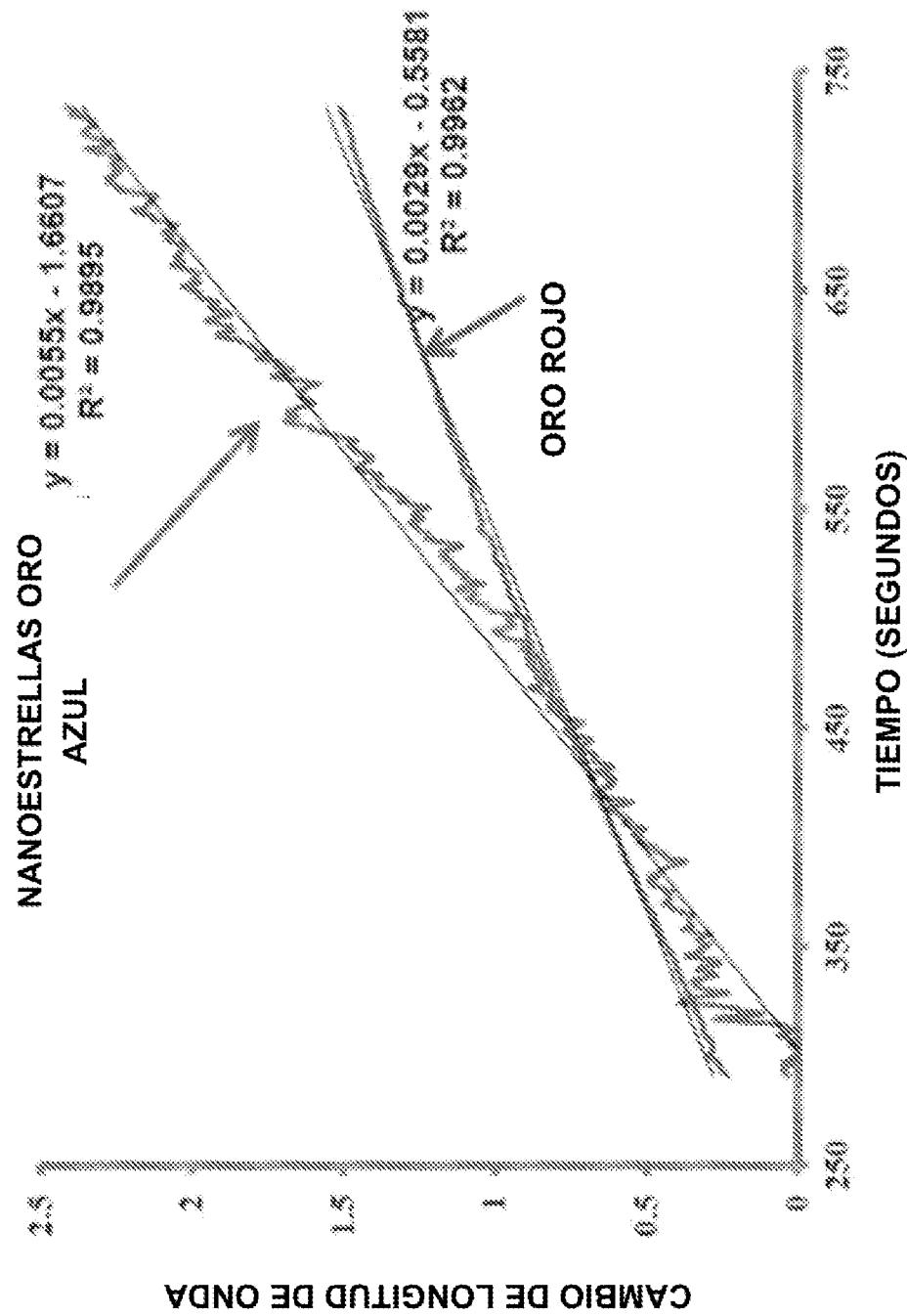


FIGURA 6

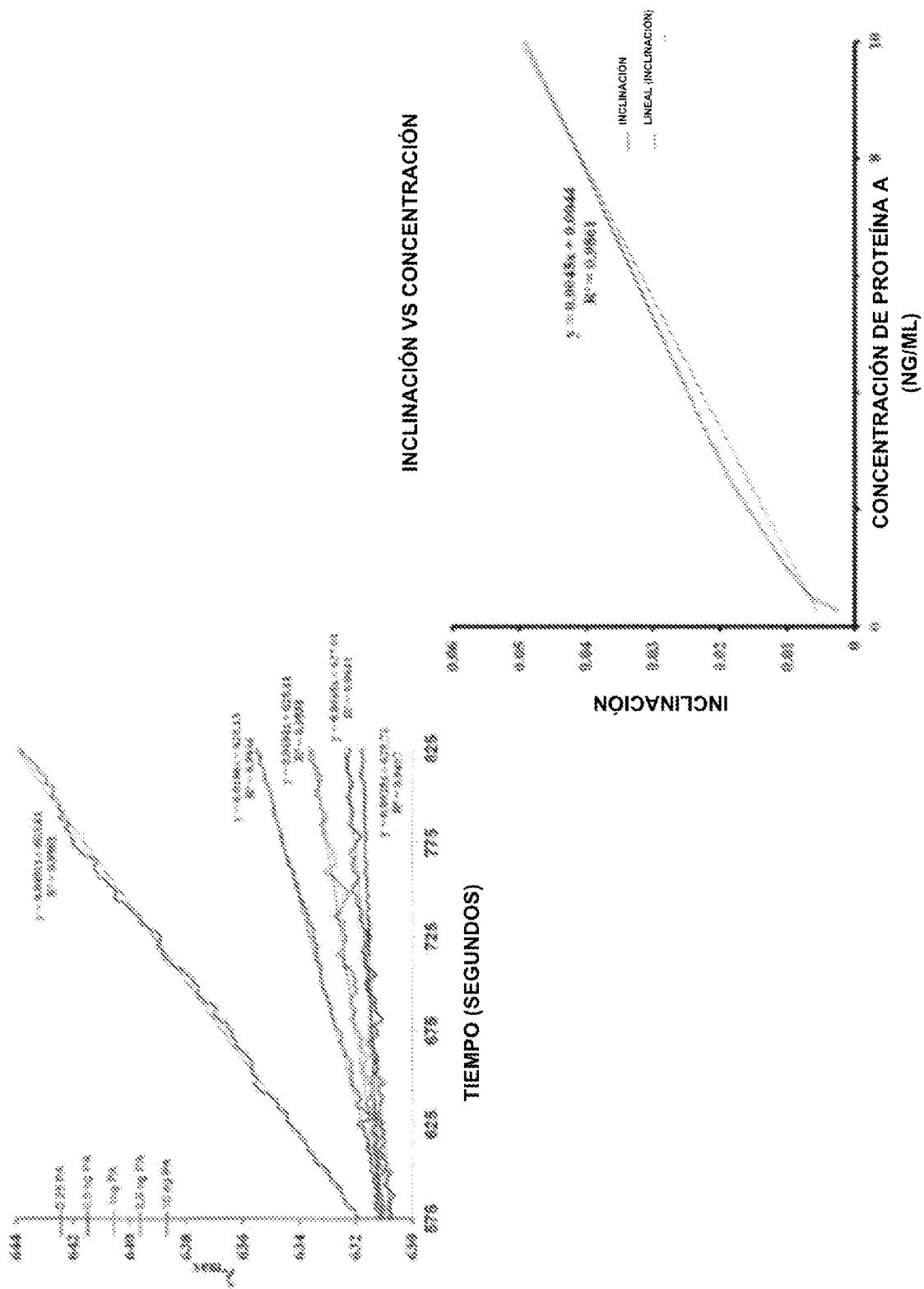


FIGURA 7A

CPR-C6 CGC ENSAYO CONJUGADO DEL CURSO DE LOS TIEMPOS DE RESPUESTA DE CUBETAS HOMOGENEAS OD=0,5

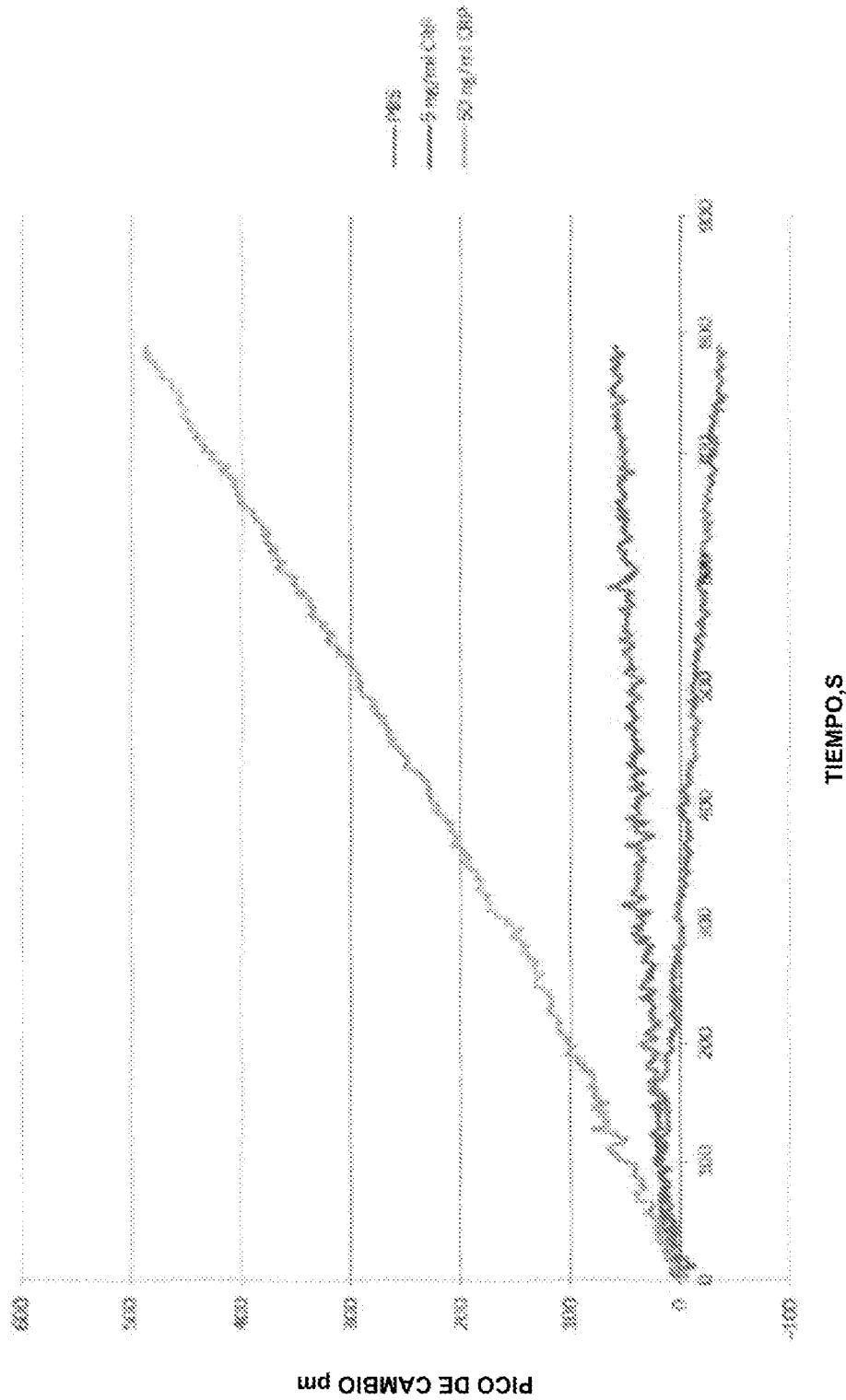
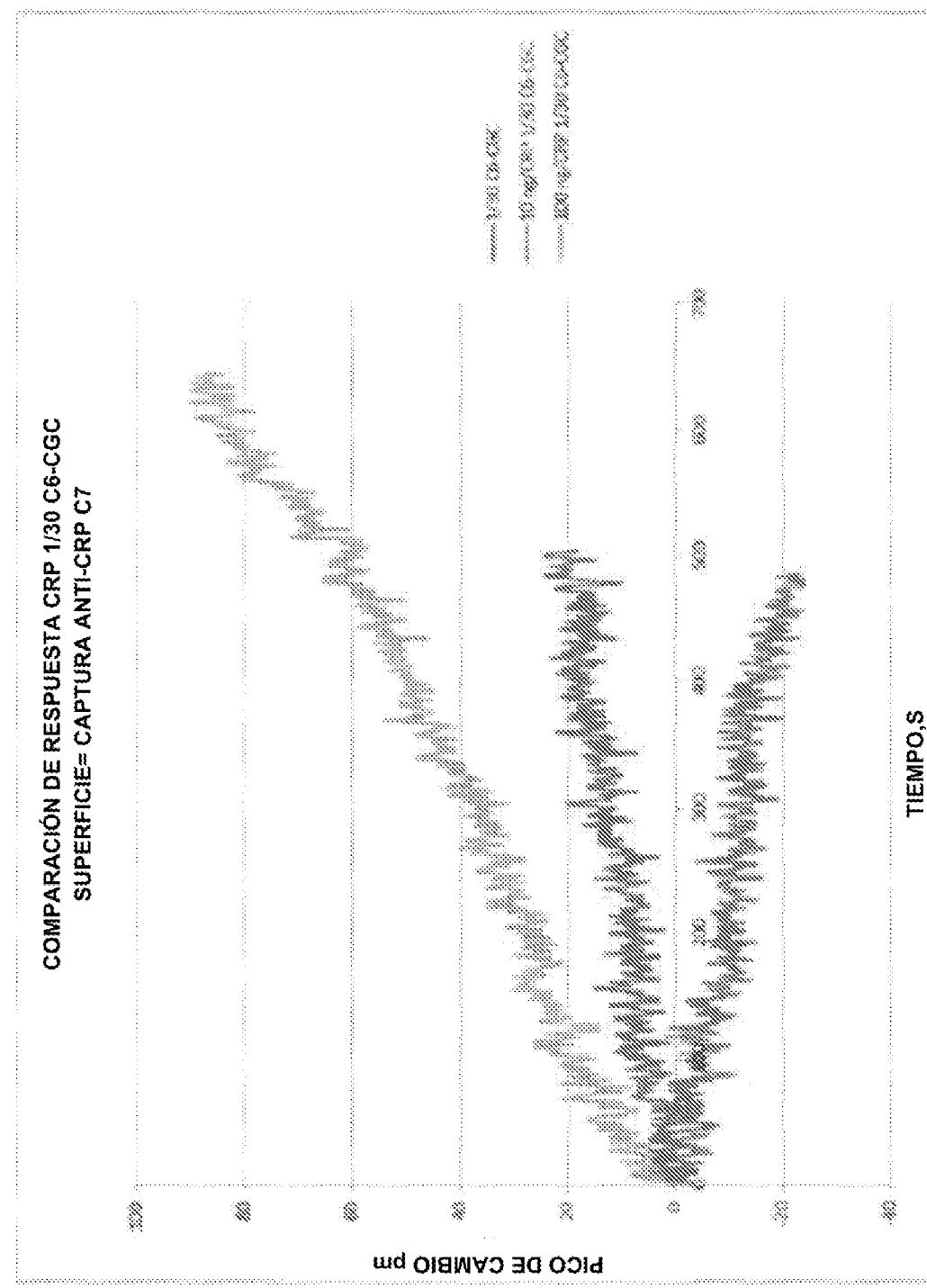


FIGURA 78



ES 2 989 755 T3

FIGURA 4

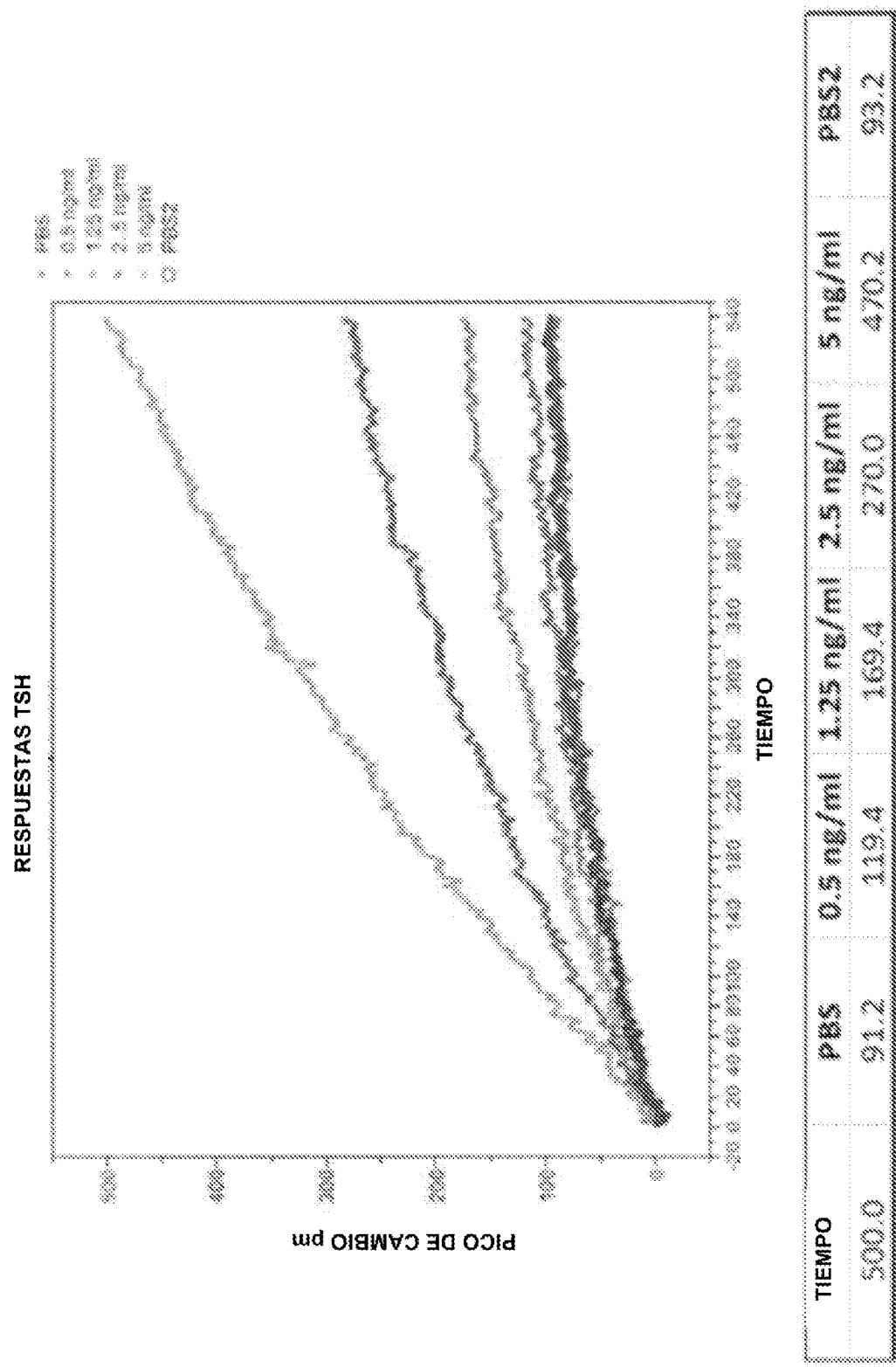
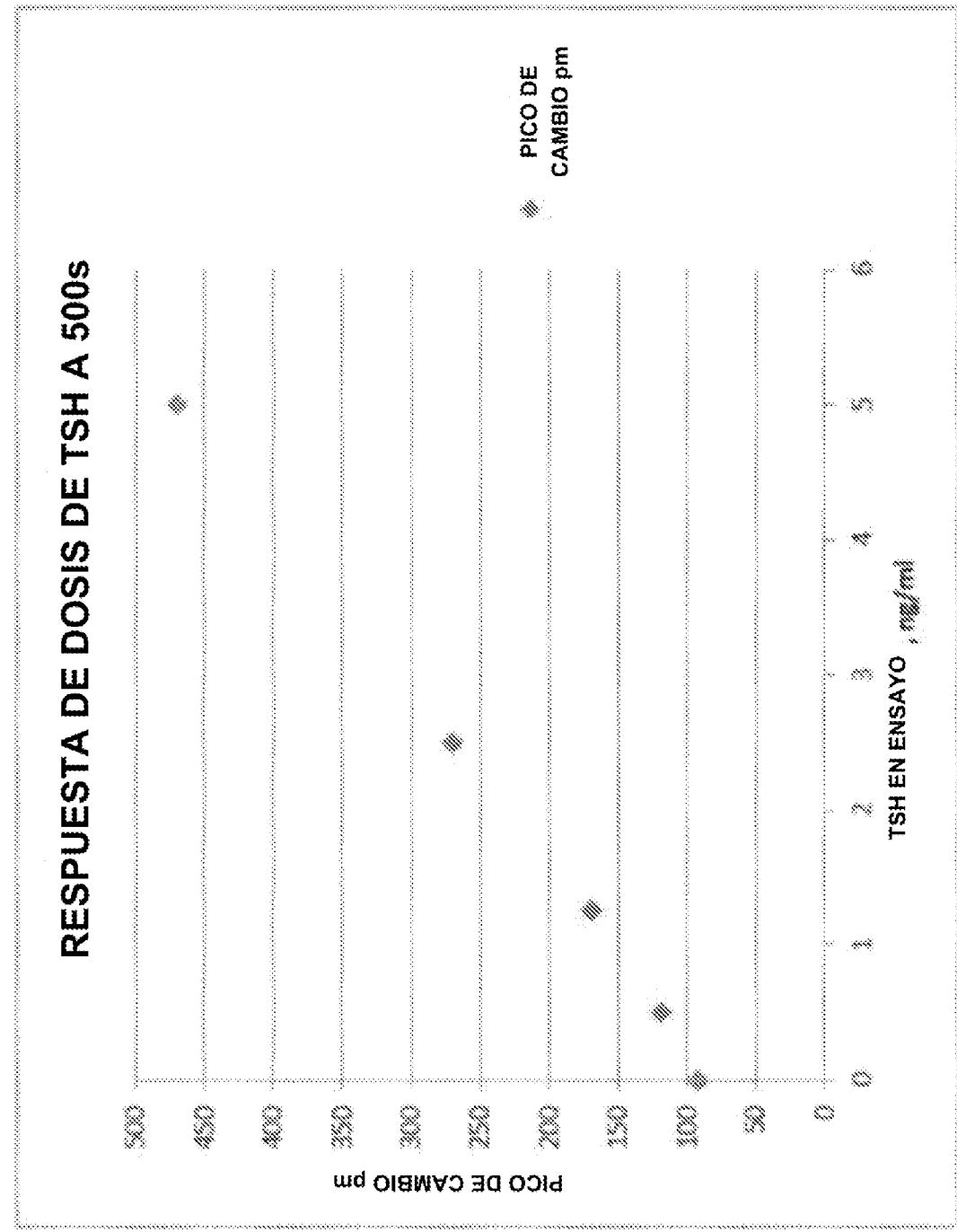
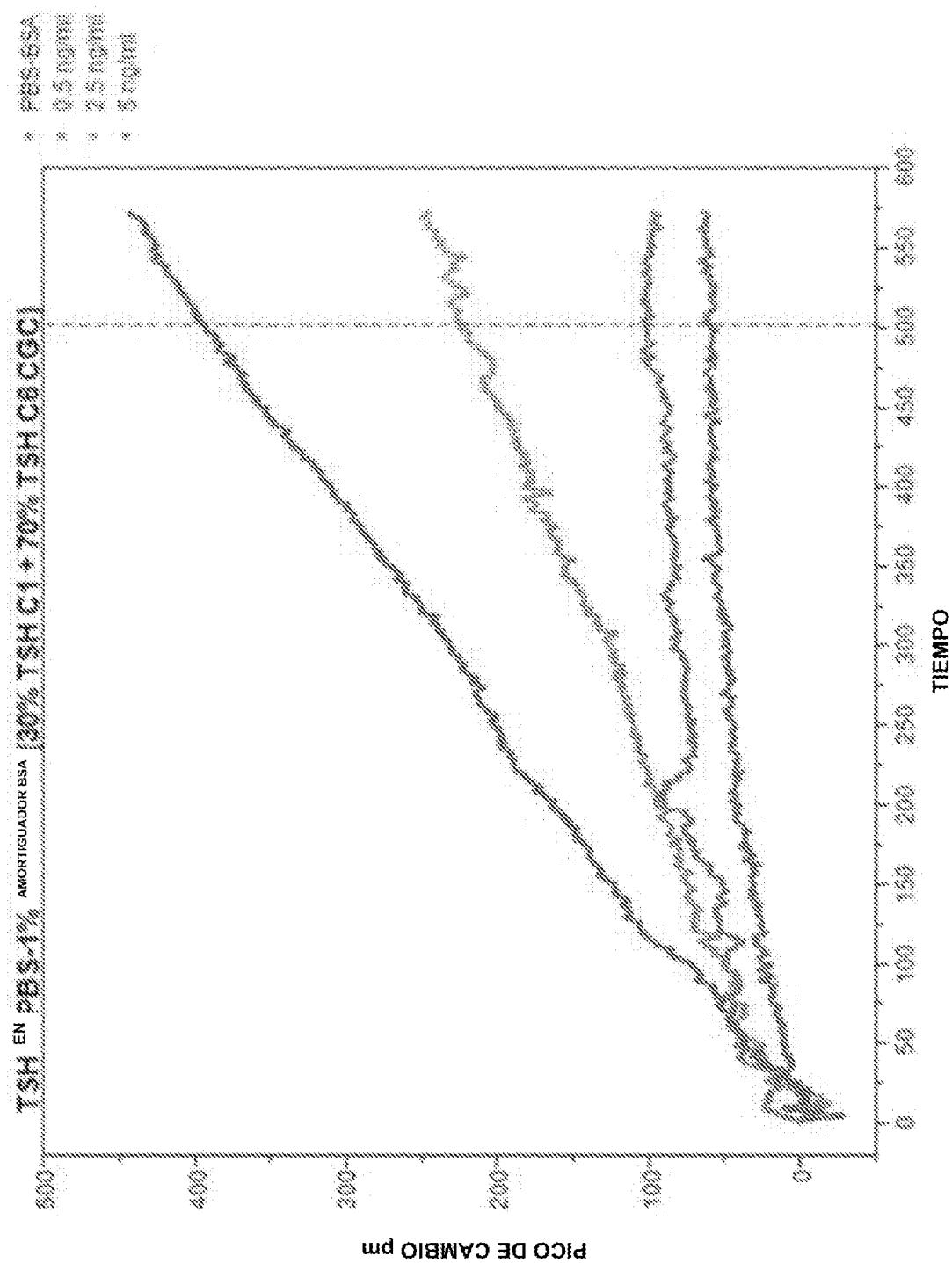


FIGURA 33



ES 2 989 755 T3

FIGURA 9A



ES 2 989 755 T3

FIGURA 31

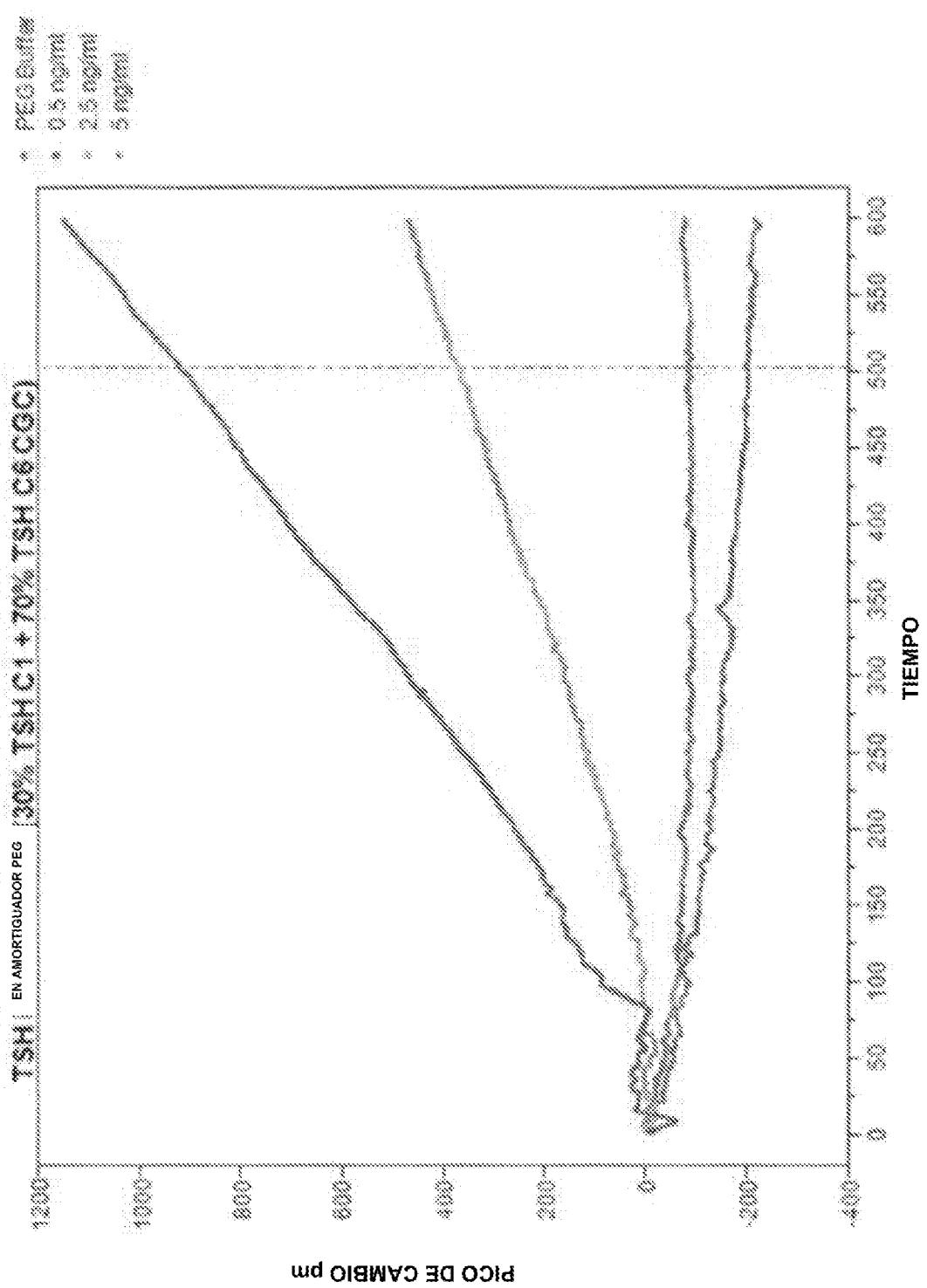


FIGURA 3C

	0 ng/ml	0.5 ng/ml	2.5 ng/ml	5 ng/ml
30% C1 + 70% C6 PBS-BSA	62.8	104.1	222.3	394.6
30% C1 + 70% C6 AMORTGUADOR PEG	-194.4	-80.6	369.7	920.4
50% C1 + 50% C6 PBS-BSA	91.2	119.4	270.0	470.2

FIGURA 18

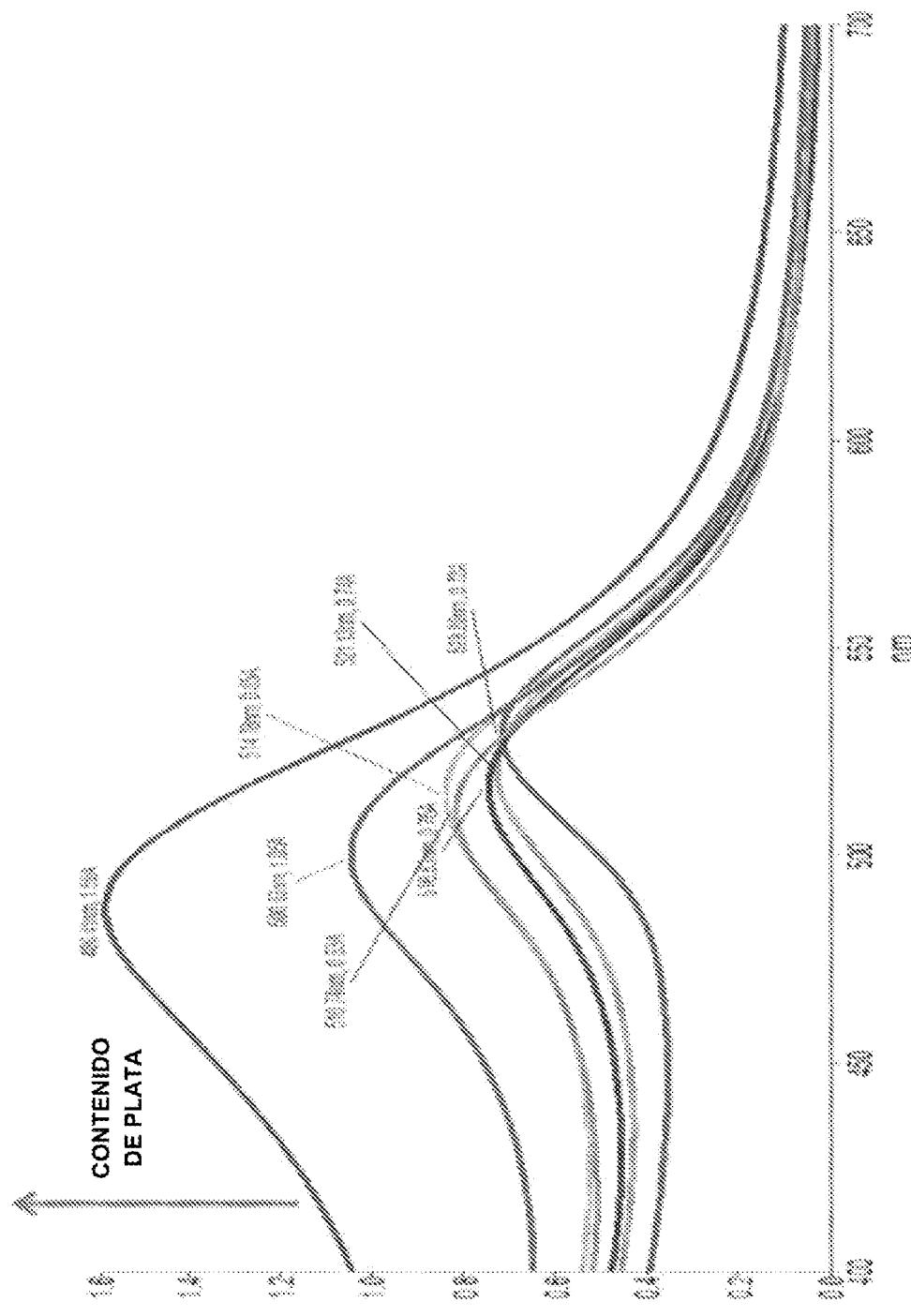


FIGURA 11

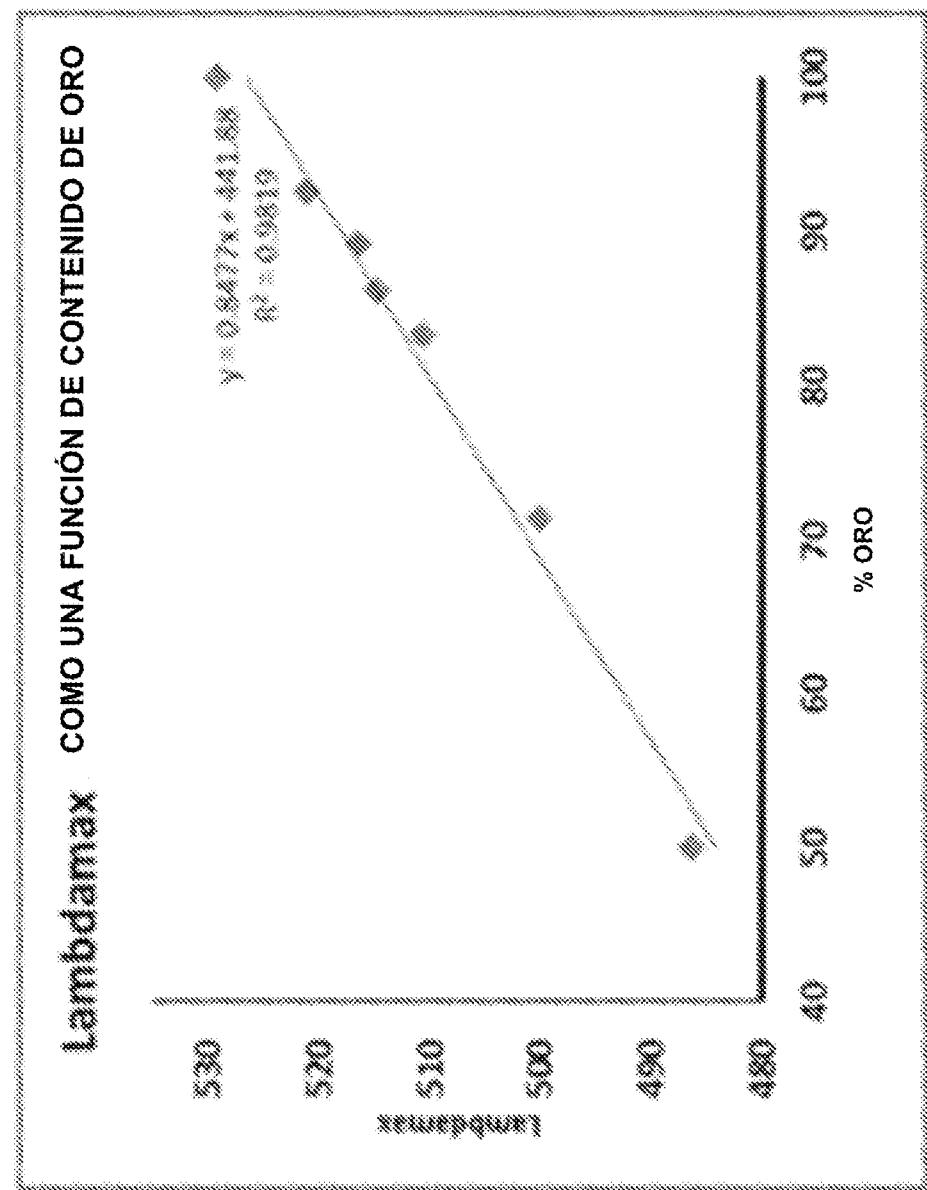


FIGURA 112

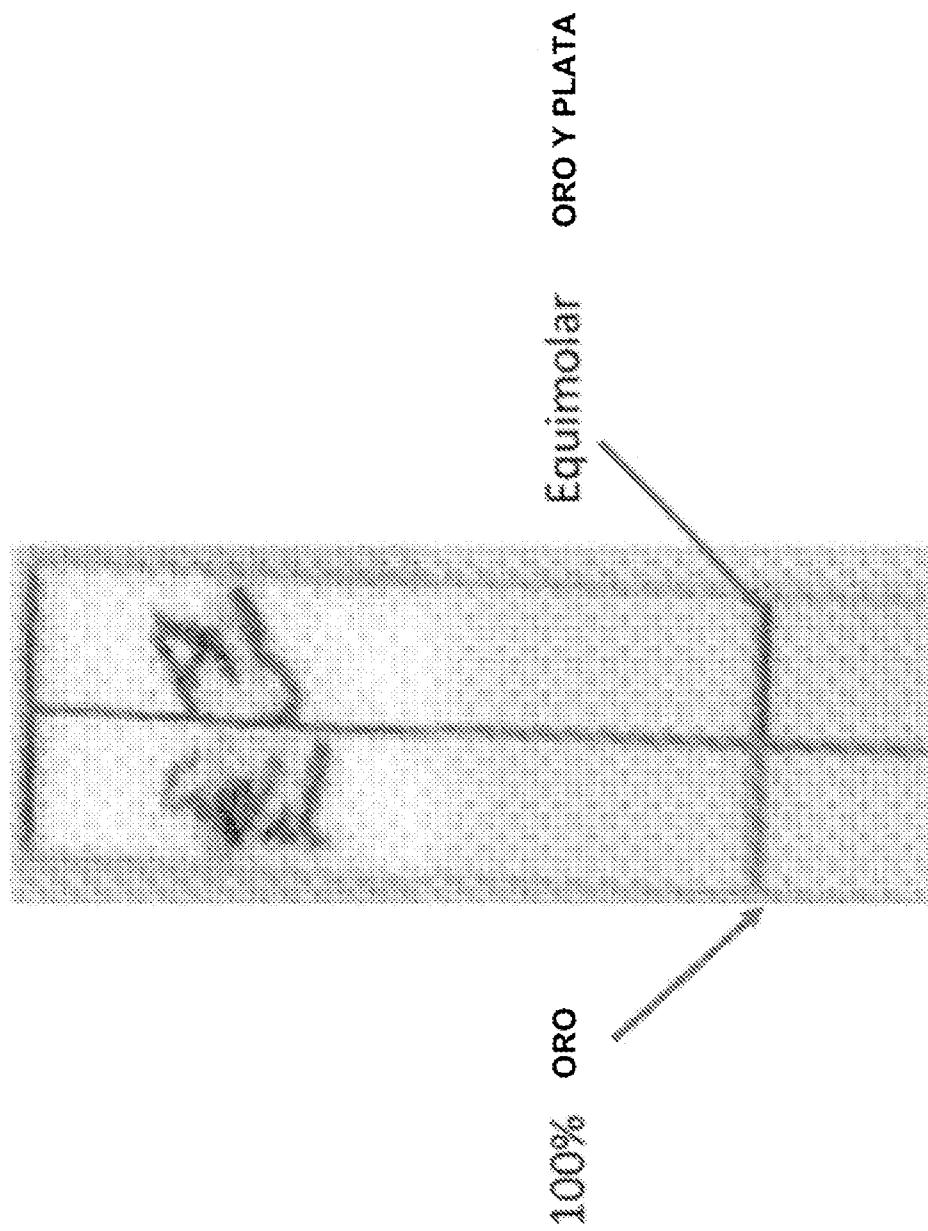


FIGURA 13

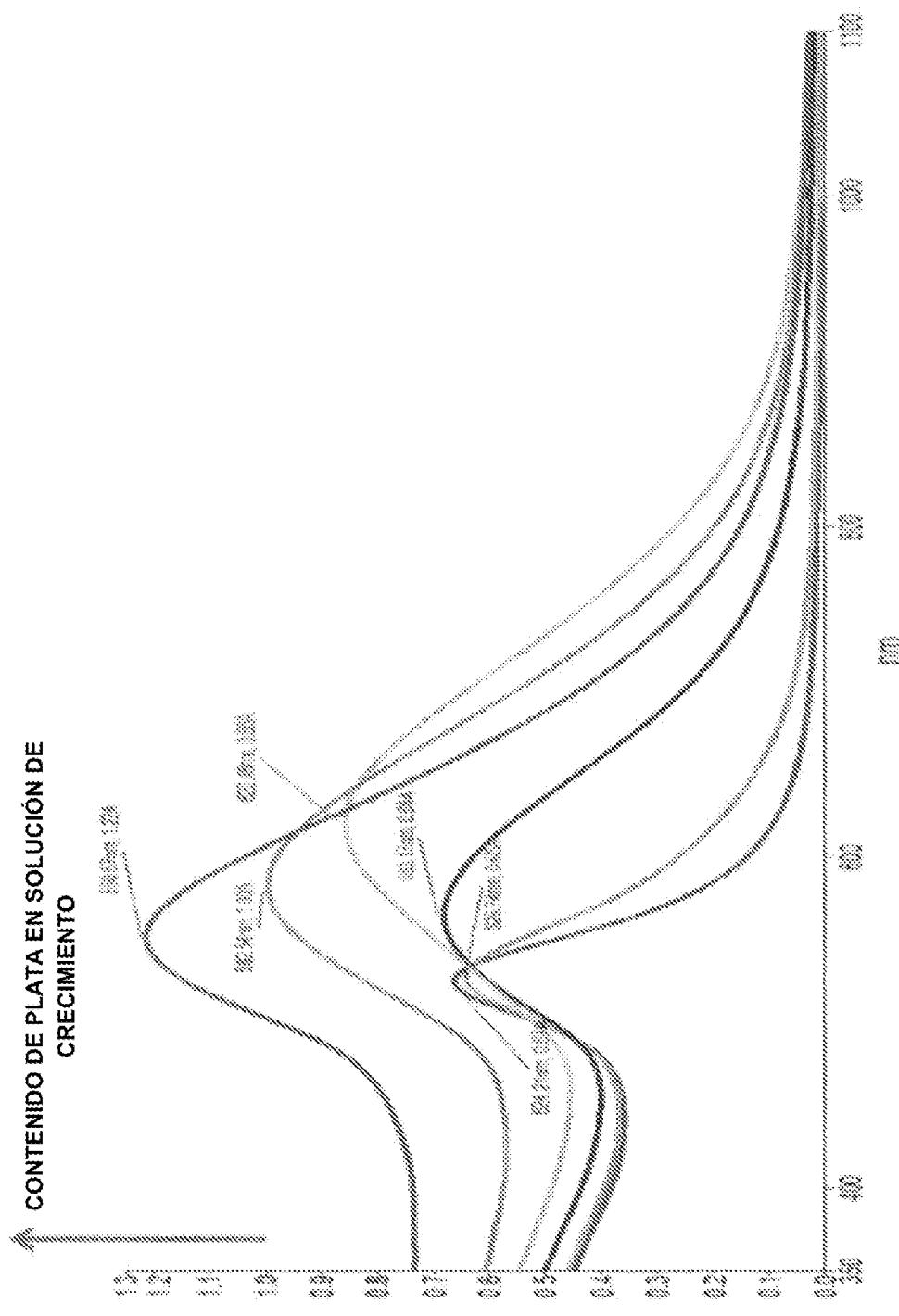


FIGURA 14

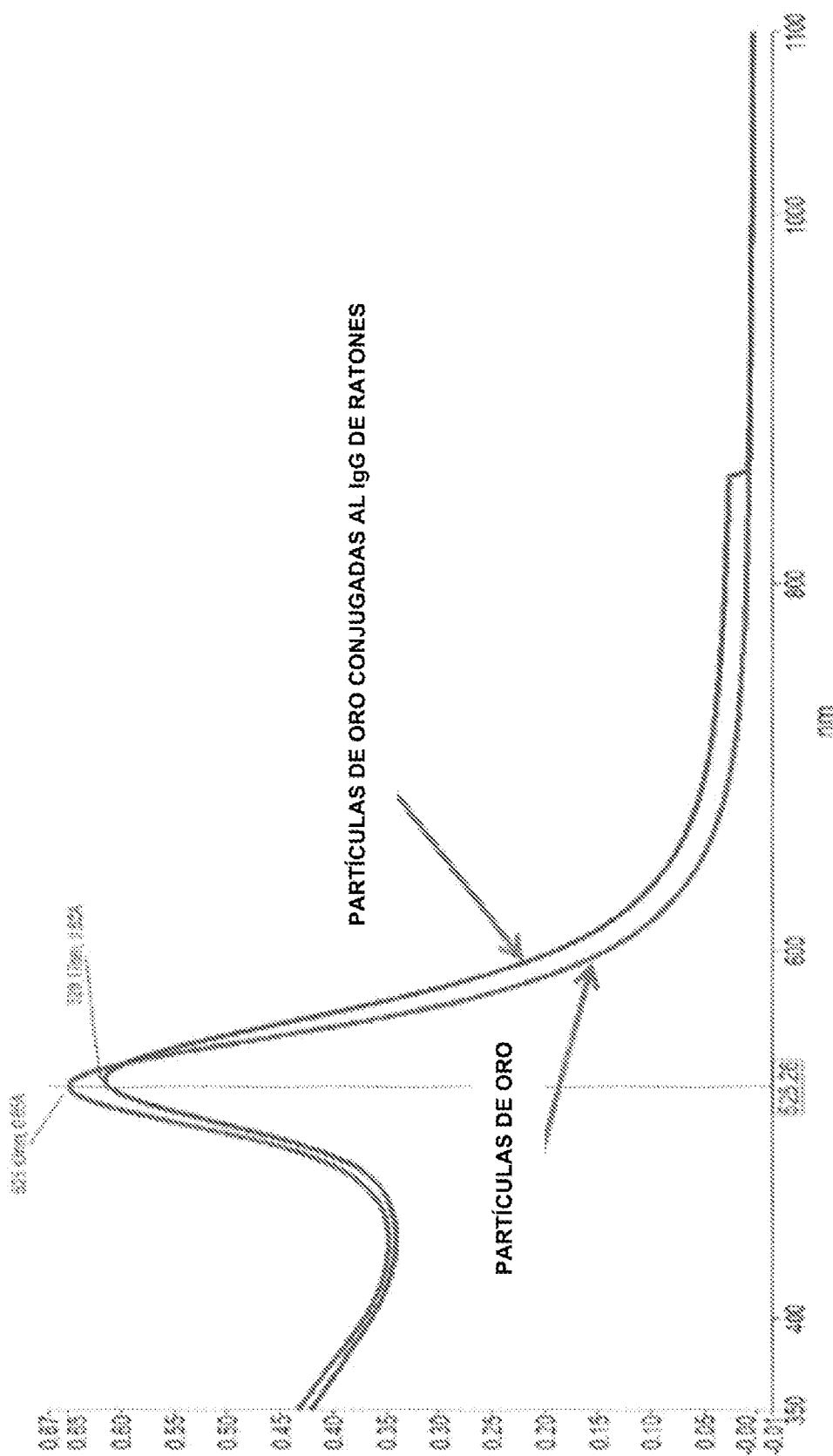


FIGURA 18

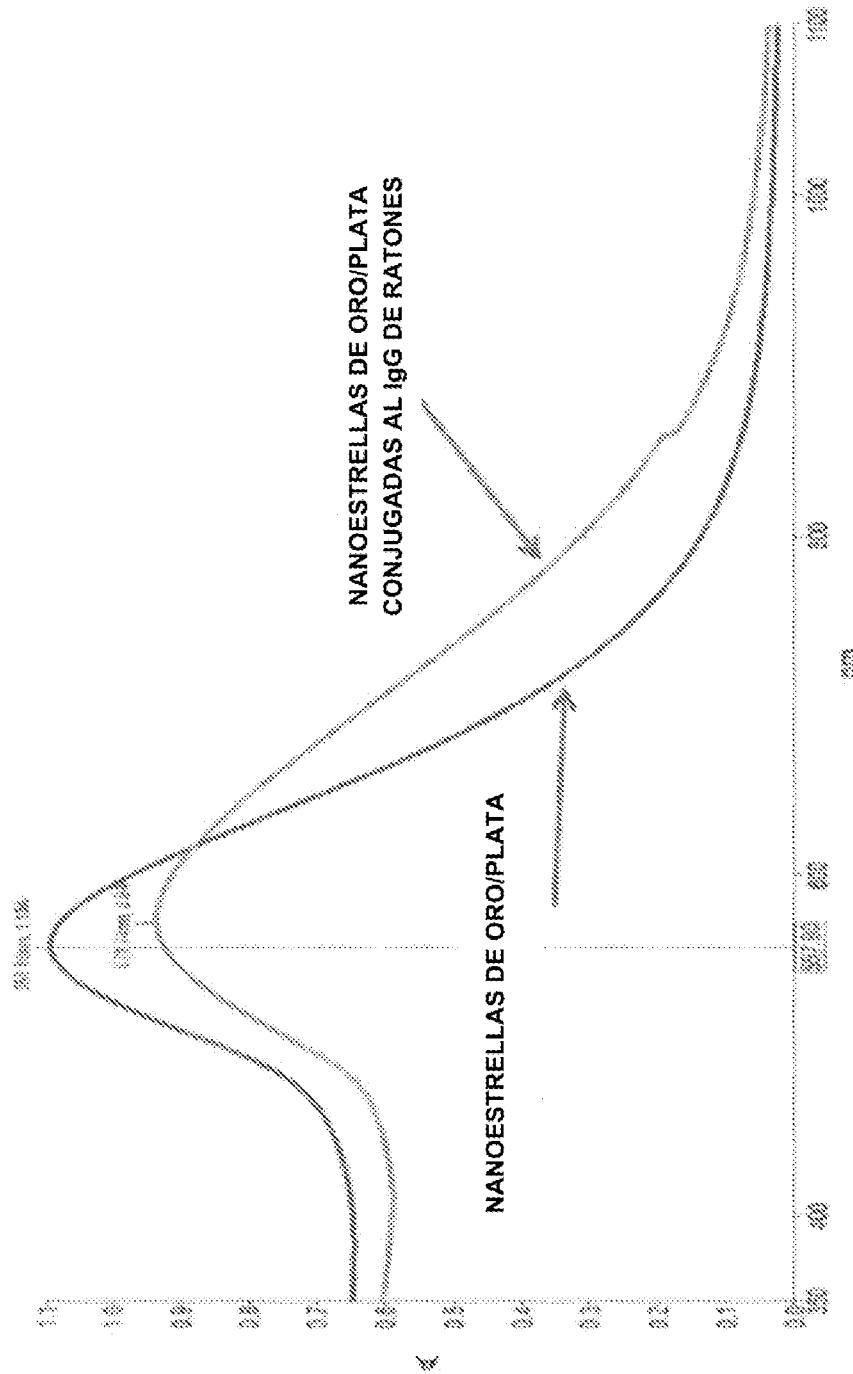


FIGURA 16

RESPUESTA A 5 NG/ML TSH EN AMORTIGUADOR PBS

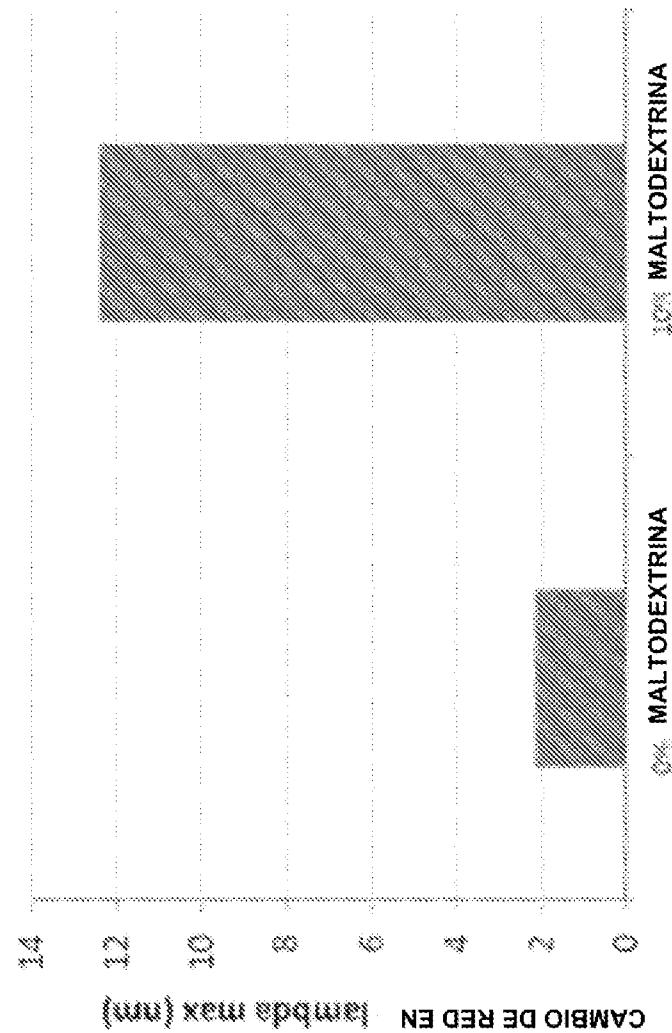
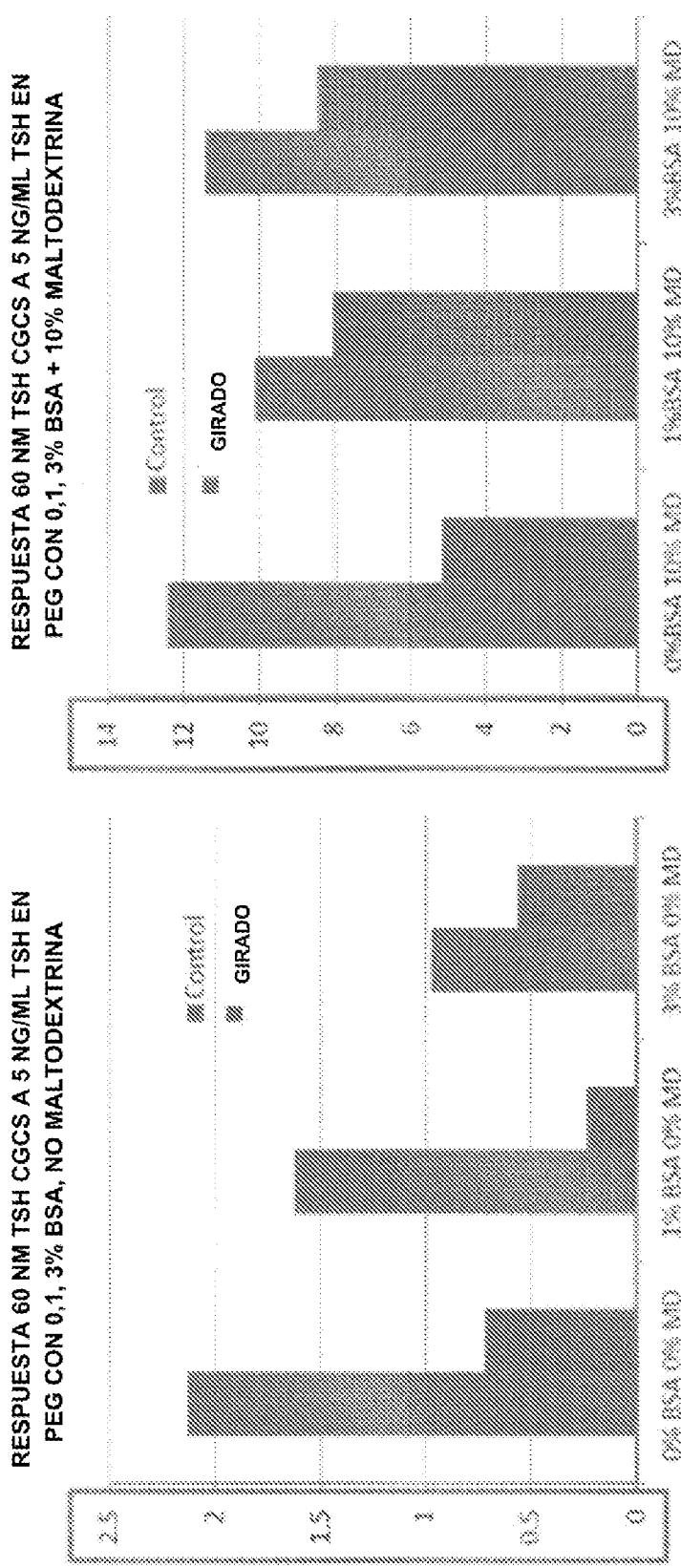


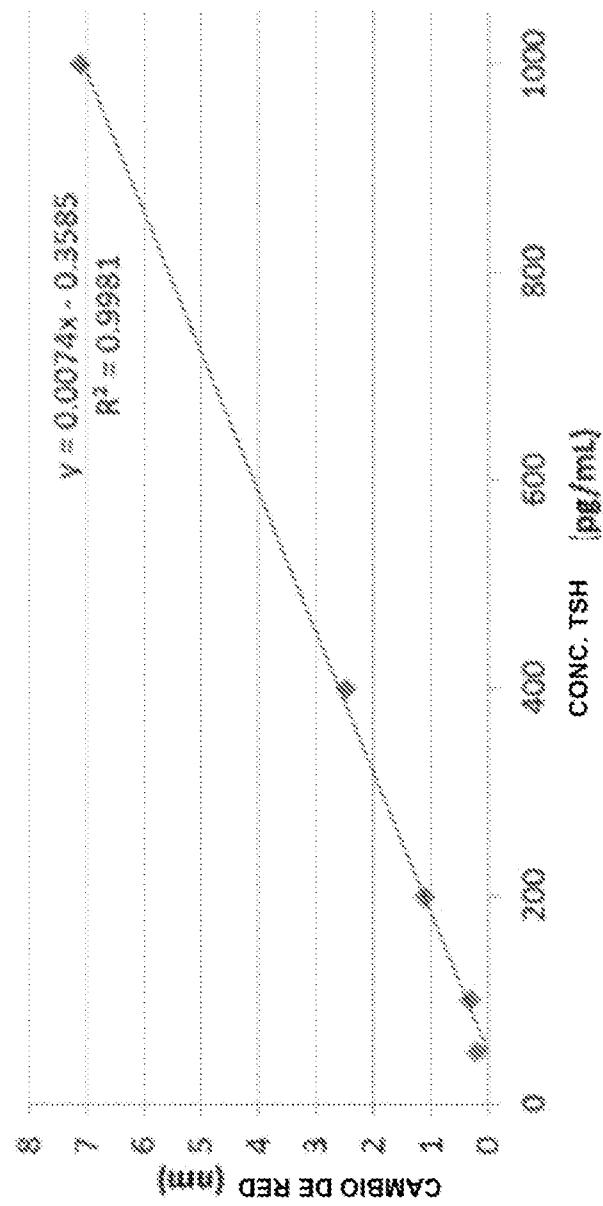
FIGURA 17



SOLUCIÓN CONJUGADA CETRIFUGADA POR 4 MINS A 1600 XG PARA SIMULAR LAS CONDICIONES EN EL ROTOR ANALÍTICO

FIGURA 18

**NIVEL DE SENSIBILIDAD PG
PARA TSH EN PEG/BSA Y
MALTODEXTRINA**



PGML TSH EN AMORTIGUADOR PEG, CON 10% MALTODEXTRINA DE 4-7

	50	100	200	400	1000
X TSH [nm]	543.732	543.903	543.915	543.932	546.645
X TSH [nm]	543.92	543.93	547.012	548.458	553.761
CAMBIO DE RED [nm]	0.196	0.300	1.037	2.476	7.116