



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 888 230**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/552 (2014.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2015 PCT/US2015/045041**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16025703**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015 E 15831667 (9)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021 EP 3180619**

④ Título: **Amplificación de señal en ensayos de elemento de enlace plasmónico específico**

⑩ Prioridad:

**13.08.2014 US 201462037071 P
20.11.2014 US 201462082468 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2022

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

**CHIANG, VINCENT;
KRELL, ASHER;
MEHRA, RAJESH K. y
ARON, KENNETH P.**

⑮ Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 888 230 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 elemento de enlace plasmónico específico

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a sistemas y procedimientos para detectar analitos objetivo 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 objetivo en una muestra.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los inmunoensayos y ensayos de enlace 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 (LSPR) 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 20 cinética de los eventos de enlace secuenciales.

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

25 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las nanoestructuras metálicas de composite pueden mejorar las señales ópticas inducidas por la unión de una molécula a una superficie de nanocapa metálica. La amplificación observada aumenta en gran medida la sensibilidad de la detección de eventos de enlace biomolecular específicos, de manera que pueden detectarse cantidades de sub-picogramo de la biomolécula. En consecuencia, la 30 presente invención proporciona dispositivos de detección de analitos y procedimientos de uso de dichos dispositivos para detectar cantidades diminutas de un analito objetivo en una muestra.

En una realización, los dispositivos de detección de analitos comprenden una pluralidad de conjugados de detección, una superficie que contiene una nanocapa metálica y una pluralidad de moléculas de captura, en el que las moléculas de captura están inmovilizadas en la nanocapa metálica y son capaces de unirse específicamente al analito objetivo. En las realizaciones en las cuales los dispositivos de detección de analitos están configurados en un formato de ensayo 35 en sándwich, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a elementos de enlace que son capaces de unirse específicamente al analito objetivo. En las realizaciones en las que los dispositivos de detección de analitos están configurados en un formato de ensayo competitivo directo, los conjugados de detección componen nanoestructuras metálicas acopladas a los analitos objetivo.

40 Las nanoestructuras metálicas de composite en los conjugados de detección comprenden generalmente 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, cadmio, hierro, níquel y zinc. En ciertas realizaciones, cada una de las nanoestructuras metálicas de composite comprende un núcleo de un primer metal y un revestimiento de un segundo metal. En algunas realizaciones, el núcleo puede ser de plata o de cobre con un revestimiento de oro. En otras realizaciones, el núcleo de un primer metal puede disolverse tras el revestimiento de forma que resulte una estructura hueca compuesta por el segundo metal de revestimiento.

45 La nanocapa metálica depositada en la superficie puede ser una película metálica o estar compuesta por una pluralidad de nanoestructuras metálicas inmovilizadas en la superficie. La nanocapa metálica también puede estar compuesta por un metal noble o de transición. En algunas realizaciones, la nanocapa metálica comprende oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio, zinc o un composite de los mismos. En una realización, la nanocapa metálica comprende oro. En otra realización, la nanocapa metálica comprende plata. En otra realización, la nanocapa metálica comprende una nanocapa de plata superpuesta a una nanocapa de oro.

50 La presente invención también proporciona procedimientos de detección de un analito objetivo en una muestra utilizando los dispositivos de detección de analitos descritos en la presente memoria. En una realización, los procedimientos comprenden la mezcla de la muestra con una pluralidad de conjugados de detección, el contacto de

la mezcla con una superficie que contiene una nanocapa metálica sobre la que se inmoviliza una pluralidad de moléculas de captura, la exposición de la superficie a una fuente de luz en un intervalo de longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y la medición de una señal óptica de la superficie, en la que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito objetivo en la muestra. En ciertas realizaciones, los procedimientos de la presente invención son capaces de detectar cantidades de femtogramo a nanogramo de un analito objetivo en la muestra.

La presente invención incluye un complejo de ensayo que comprende un conjugado de detección que comprende una nanoestructura metálica compuesta acoplada a un elemento de enlace; un analito objetivo; y una cuenta revestida por nanocapa metálica en la que se inmoviliza una molécula de captura, en el que el elemento de enlace en el conjugado de detección se une a un primer epítopo en el analito objetivo y la molécula de captura se une a un segundo epítopo en el analito objetivo, formando así un complejo que comprende el conjugado de detección, el analito objetivo y la molécula de captura. En algunas realizaciones, la nanoestructura metálica compuesta es una nanoestructura de plata revestida por oro o una nanoestructura de cobre revestida por oro y el revestimiento de nanocapas metálicas en la cuenta comprende oro.

La divulgación describe además un procedimiento de preparación de nanoestructuras metálicas de composite para uso en los dispositivos y procedimientos de detección descritos en la presente memoria. 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. 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico en función del tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro acoplado a albúmina sérica bovina (BSA) (canal 1) y sensores de nanocapas de oro acoplados a IgG humana (canales 2-4). Las flechas indican la secuencia de inyección y la concentración de proteína A no marcada, HCl 1 mM o proteína A marcada con oro coloidal (CGC).

Figura 2. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico frente al tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro acoplado al anticuerpo anti-CRP C7. Las flechas indican la secuencia de inyección de concentraciones de 0 a 100 ng/ml de CRP en diferentes canales (carga de CRP), 1 µg/ml de anticuerpo anti-CRP C6 no marcado, o 3 µg/ml de anticuerpo anti-CRP C6 marcado con oro coloidal (C6-CGC). No se observó ninguna otra unión de C6-CGC cuando la superficie del sensor estaba ocupada con un anticuerpo anti-CRP C6 no marcado.

Figura 3. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico frente al tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro acoplado al anticuerpo anti-CRP C7. Las flechas indican la secuencia de inyección de concentraciones de 0 a 100 ng/ml de CRP en diferentes canales (carga de CRP), 1 µg/ml de anticuerpo anti-CRP C6 marcado con oro coloidal (C6-CGC), 3 µg/ml de C6-CGC, o 1 mM de HCl (Ácido).

Figura 4A. Espectros de reflectancia de los sensores de nanocapas de oro acoplados a anticuerpos anti-CRP C7 cargados con 10 ng/ml de CRP a las distintas concentraciones de C6-CGC en la Figura 3.

Figura 4B. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico frente al tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro acoplado a anticuerpos anti-CRP C7 incubado con una de las tres concentraciones de CRP tras la introducción de 3 µg/ml de anticuerpos anti-CRP C6 marcados con oro coloidal (C6-CGC). La tabla de la derecha muestra el análisis de los picos 700 segundos después de la introducción de C6-CGC.

Figura 5. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico frente al tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro acoplado al anticuerpo anti-CRP C7. Las flechas indican la secuencia de inyección de concentraciones de 0 a 100 ng/ml de CRP en diferentes canales (carga de CRP con tiempo de incubación minimizado), 3 µg/ml de anticuerpo anti-CRP C6 marcado con oro coloidal (C6-CGC), o 1 mM HCl (Ácido).

Figura 6. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico frente al tiempo de adquisición para las trazas de la Figura 5 tras la introducción inmediata de 3 µg/ml de anticuerpo anti-CRP C6 marcado con oro coloidal (C6-CGC). La tabla de la derecha muestra el análisis de los picos 700 segundos después de la introducción de C6-CGC en comparación con los desplazamientos de los picos obtenidos con la incubación de CRP (valores mostrados en la Figura 4B).

Figura 7. Gráfico del desplazamiento de la longitud de onda del pico en función del tiempo de adquisición para un sensor de nanocapas de oro con anticuerpos anti-CRP C7 incubados con una de las tres

concentraciones de CRP y anticuerpos anti-CRP C6 conjugados con nanoestructuras de plata revestidas por oro. El control es un sensor de nanocapas de oro con albúmina de suero bovino (BSA) inmovilizada en lugar del anticuerpo C7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que se puede lograr una amplificación significativa en los ensayos en base a LSPR con elementos de enlace etiquetados con nanoestructuras metálicas de composite. De este modo, la presente invención proporciona dispositivos de detección de analitos que comprenden una superficie LSPR, *por ej.*, una superficie que contiene una nanocapa metálica, una pluralidad de moléculas de captura inmovilizadas a la nanocapa metálica, y una pluralidad de conjugados de detección que comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a biomoléculas.

10 Los dispositivos de detección de analitos pueden configurarse en un formato de ensayo en sándwich o en un formato de ensayo competitivo directo. Por ejemplo, en una realización, un dispositivo de detección de analitos en formato de ensayo en sándwich comprende (i) una pluralidad de conjugados de detección, en el que los conjugados comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a elementos de enlace que son capaces de unirse específicamente a un analito objetivo, (ii) una superficie que contiene una nanocapa metálica, y (iii) una pluralidad de moléculas de captura, en el que las moléculas de captura se inmovilizan en la nanocapa metálica y son capaces de unirse específicamente al analito objetivo. En otra realización, un dispositivo de detección de analitos en un formato de ensayo competitivo directo comprende (i) una pluralidad de conjugados de detección, en el que los conjugados comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a analitos objetivo, (ii) una superficie que contiene una nanocapa metálica, y (iii) una pluralidad de moléculas de captura, en el que las moléculas de captura están inmovilizadas en la nanocapa metálica y son capaces de unirse específicamente a los analitos objetivo.

15 Los dispositivos de detección de analitos de la invención comprenden una superficie que contiene una nanocapa metálica. La superficie puede tener cualquier tamaño y forma adecuados, tal como un chip, un pocillo, una cubeta o una cuenta. En algunas realizaciones, la superficie es un chip rectangular. En otras realizaciones, la superficie es un 20 disco. En ciertas realizaciones, la superficie es el fondo, el revestimiento y/o las paredes interiores de una cubeta (*por ej.*, una cubeta cilíndrica o rectangular). En otras realizaciones, la superficie es un conjunto de partículas no metálicas. La superficie puede estar fabricada con varios materiales, incluyendo, pero sin limitación, vidrio, cuarzo, silicio, silice, poliestireno, grafito, tela (*por ejemplo*, telas de polietileno), malla o una membrana (*por ej.*, membranas de látex, polivinilo, nylon o poliéster).

25 30 Una nanocapa metálica se deposita preferentemente sobre la superficie. La nanocapa metálica puede, en algunas realizaciones, revestir toda el área de la superficie particular. En otras realizaciones, la nanocapa metálica puede depositarse sólo sobre una parte de la superficie. Por ejemplo, la superficie puede contener una pluralidad de depresiones o pocillos y la nanocapa metálica se deposita dentro de las depresiones o pocillos. En otras realizaciones, la nanocapa metálica puede aplicarse a la superficie como una pluralidad de depósitos espaciados a través de la 35 superficie. Las propiedades ópticas de la nanocapa metálica pueden ajustarse variando el espesor de la nanocapa y/o la naturaleza de las nanoestructuras. En una realización, la nanocapa está compuesta por nanoislas metálicas. En otra realización, la nanocapa está compuesta por nanovarillas. Los espesores adecuados de la nanocapa metálica para uso en los dispositivos y procedimientos de la invención incluyen desde aproximadamente 0,5 nm hasta 40 aproximadamente 100 nm, desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 30 nm, o desde aproximadamente 3 nm hasta aproximadamente 10 nm. Las superficies ejemplares con un revestimiento de nanocapas metálicas que pueden utilizarse en los dispositivos y procedimientos de la invención incluyen las superficies descritas en la Publicación de Patente de los EE. UU. Núm. 2006/0240573.

45 50 En ciertas realizaciones, la nanocapa metálica es una película metálica. Los procedimientos para depositar películas metálicas sobre la superficie de un sustrato son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, la deposición de capas atómicas, la deposición por láser pulsado, el colado de gotas, la deposición por vapor y la adsorción. Véase, *por ej.*, Atanasov et al., Journal of Physics: Conference Series 514 (2014); Walters and Parkin, Journal of Materials Chemistry, 19: 574-590, 2009y Gupta et al., J. Appl. Phys. 92, 5264-5271, 2002. La película metálica puede comprender otros componentes, por ejemplo, la película metálica puede ser una película polimérica, una película de Langmuir-Blodgett o una película de óxido. En algunas realizaciones, la película metálica comprende dos capas, en la que cada capa comprende un metal diferente. A modo de ejemplo, la película metálica puede comprender una capa de plata superpuesta a una capa de oro.

55 60 En otras realizaciones, la nanocapa metálica comprende una pluralidad de nanoestructuras metálicas inmovilizadas en la superficie. Las nanoestructuras metálicas pueden inmovilizarse en la superficie tratando el material de la superficie con un reactivo para añadir grupos químicos funcionales, tal como cianuro, amina, tioles, carboxilo, aldehído o maleimida, y haciendo reaccionar las nanoestructuras metálicas con la superficie tratada. Es sabido que las nanoestructuras metálicas se unen a estos grupos químicos funcionales con gran afinidad. En algunas realizaciones, las nanoestructuras metálicas que comprenden la nanocapa metálica son nanopartículas esféricas. Dichas nanopartículas tienen diámetros inferiores a aproximadamente 300 nm, a aproximadamente 200 nm o a aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas esféricas tienen un diámetro de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm, o de

aproximadamente 20 nm a aproximadamente 60 nm. En ciertas realizaciones, el tamaño de las nanoestructuras metálicas utilizadas para crear la nanocapa metálica es similar al tamaño de las nanoestructuras de composite utilizadas en los conjugados 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.

La nanocapa metálica (película metálica o pluralidad de nanoestructuras metálicas) puede estar compuesta por un metal noble o un composite del mismo. En otras realizaciones, la nanocapa metálica (película metálica o pluralidad de nanoestructuras metálicas) puede estar compuesta por un metal de transición o un composite del mismo. En ciertas realizaciones, la nanocapa metálica comprende un metal seleccionado de oro, plata, cobre, platino, paladio, rutenio,

rodio, osmio, iridio, el titanio, cromo, cadmio, zinc, hierro, cobalto, níquel y sus composites. En una realización particular, la nanocapa metálica (por ejemplo, la película metálica o la pluralidad de nanoestructuras metálicas) comprende oro. En otra realización particular, la nanocapa metálica (por ejemplo, la película metálica o la pluralidad de nanoestructuras metálicas) comprende plata. En ciertas realizaciones, la nanocapa metálica (por ejemplo, la película metálica o la pluralidad de nanoestructuras metálicas) comprende un compuesto de oro y plata u oro y cobre.

El uso de metales alcalinos (*por ej.*, litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y francio) o lantánidos (*por ej.*, lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y luteo) puede mejorar la intensidad de los picos LSPR. En consecuencia, en algunas realizaciones, la nanocapa metálica (película metálica o pluralidad de nanoestructuras metálicas) puede estar compuesta por uno o más metales alcalinos o lantánidos. En otras realizaciones, la nanocapa metálica (película metálica o pluralidad de nanoestructuras metálicas) puede estar compuesta por una combinación de un metal noble y un metal alcalino o lantánido.

Los dispositivos de detección de analitos de la invención comprenden además una pluralidad de moléculas de captura inmovilizadas a la nanocapa metálica depositada en una superficie. Las moléculas de captura son capaces de unirse específicamente a un analito objetivo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "unión específica" se refiere a la unión a una molécula diana con alta afinidad, *por ej.*, una afinidad de al menos 10^{-6} M. En algunas realizaciones, las moléculas de captura 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, la pluralidad de moléculas de captura son anticuerpos. En otras realizaciones, la pluralidad de moléculas de captura son antígenos.

Los procedimientos de inmovilización de moléculas en nanocapas o 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, la molécula puede acoplarse a la nanocapa o 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.

Los dispositivos de detección de analitos de la invención también pueden comprender una pluralidad de conjugados de detección. Los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a elementos de enlace capaces de unirse específicamente a un analito objetivo o a las moléculas de captura dependiendo de la configuración del ensayo. Por ejemplo, en las realizaciones en las que el dispositivo está configurado en un formato de ensayo en sándwich, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas o conjugadas a elementos de enlace que son capaces de unirse específicamente a un analito objetivo. En otras realizaciones en las que el dispositivo está configurado en un formato de ensayo competitivo directo, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas o conjugadas a analitos objetivo.

Los elementos de enlace pueden ser los mismos tipos de moléculas que las moléculas de captura, incluyendo, pero sin limitación, haptenos y otras moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, macromoléculas biológicas como anticuerpos o sus fragmentos mismos (*por ej.*, Fv, Fab, (Fab)₂, cadena única, CDR, etc.), antígenos, receptores, ligandos, polinucleótidos, aptámeros, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucopéptidos, lipoproteínas o nucleoproteínas. En algunas realizaciones, los elementos de enlace son del mismo tipo de molécula que las moléculas de captura, pero preferentemente se unen al analito objetivo en un lugar distinto del sitio de enlace de las moléculas de captura. A modo de ejemplo, los elementos de enlace y las moléculas de captura pueden ser anticuerpos que reconocen un analito objetivo, pero el epítopo al que los elementos de enlace se unen al analito objetivo está separado e idealmente no se solapa con el epítopo al que las moléculas de captura se unen al analito objetivo. De este modo, en ciertas realizaciones, los elementos de enlace son anticuerpos que reconocen un primer epítopo de un analito objetivo y las moléculas de captura son anticuerpos diferentes que reconocen un segundo epítopo de un analito objetivo.

Las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección pueden estar compuestas por un metal noble o un composite de los mismos. 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.

- 5 En realizaciones preferentes, las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección son nanoestructuras metálicas de composite. 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, 10 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, 15 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.

En algunas realizaciones, cada una de las nanoestructuras metálicas de composite es una aleación de un primer metal y un segundo metal. En ciertas realizaciones, cada una de las nanoestructuras metálicas de composite comprende un núcleo de un primer metal y un revestimiento de un segundo metal. En una realización, el núcleo es de plata y el revestimiento es de oro. En otra realización, el núcleo es de cobre y el revestimiento es 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, el núcleo es de sílice, el primer revestimiento (es decir, el revestimiento interior) es un revestimiento de plata, y el segundo 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 nanoestructuras de composite, tienen una geometría seleccionada de nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanotubos, nanovainas, nanovarillas, 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.

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 20 nm a aproximadamente 60 nm. 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 elementos de enlace o los analitos objetivo pueden acoplarse o conjugarse a las nanoestructuras metálicas (por ejemplo, nanoestructuras de composite) utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente para la inmovilización de las moléculas de captura a la nanocapa metálica. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, la química de conjugación EDC, el acoplamiento sulfo-NHS, la unión hidrófoba o la química de tioéter. Los elementos de enlace o los analitos objetivo pueden acoplarse a las nanoestructuras metálicas a través de varias funcionalidades químicas, incluyendo tiol, amina, ditiol, fosforamida acrílica, azida o alquinos.

En algunas realizaciones, el metal o los metales empleados en la nanocapa metálica depositada en la superficie pueden ser los mismos que el metal o los metales con los que se fabrican las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección. Por ejemplo, en una realización, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de oro o una pluralidad de nanoestructuras de oro y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de oro. En otras realizaciones, el metal empleado en la nanocapa metálica depositada en la superficie es diferente del metal o metales utilizados para crear las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de plata o una pluralidad de nanoestructuras de plata y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de oro. En otras realizaciones, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de oro o una pluralidad de nanoestructuras de oro y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de plata. En ciertas realizaciones, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de oro o una pluralidad de nanoestructuras de oro y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de composite. En las realizaciones relacionadas, las nanoestructuras de composite comprenden nanoestructuras de plata revestidas por oro. En otras realizaciones particulares, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de oro o una pluralidad de nanoestructuras de oro y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de composite que comprenden nanoestructuras de magnetita revestidas por oro. En otras realizaciones, la nanocapa metálica depositada en la superficie comprende una película de oro o una pluralidad de nanoestructuras de oro y los conjugados de detección comprenden nanoestructuras de composite que comprenden oro y un metal alcalino o lantánido.

La presente divulgación también describe kits que comprenden los dispositivos de detección de analitos desvelados en la presente memoria. En un caso, el kit comprende (i) una superficie que contiene una nanocapa metálica sobre la que se inmoviliza una pluralidad de moléculas de captura y (ii) una composición que comprende una pluralidad de conjugados de detección como se describe en la presente memoria. En ciertos casos, la composición se empaca por separado de la superficie, de manera que pueda entrar en contacto posterior con la superficie durante la ejecución de los procedimientos de detección. En algunos casos, la composición que comprende la pluralidad de conjugados de detección se liofiliza, por ejemplo, en forma de gránulo o cuenta. En casos relacionados, la superficie que contiene la nanocapa metálica puede ser un chip, un disco o una cubeta. En un caso particular, la superficie que contiene la nanocapa metálica es una cubeta adaptada para su uso con un rotor centrífugo. En estos casos, la nanocapa metálica puede depositarse en el revestimiento, el fondo y/o las paredes de la cubeta.

En ciertas realizaciones, todos los componentes de los sistemas de detección de analitos descritos en la presente memoria 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 superficie de nanocapas metálicas que contienen moléculas de captura inmovilizadas y la pluralidad de conjugados de detección. En una realización, la superficie de la nanocapa metálica es un chip situado en el fondo de la cámara de reacción. En otra realización, la nanocapa metálica se deposita directamente en el suelo de la cámara de reacción. En otra realización, la superficie de la nanocapa metálica es una cuenta (por ejemplo, una cuenta de plástico) revestida con la nanocapa metálica. En todas estas realizaciones, las moléculas de captura se inmovilizan en las superficies de las nanocapas metálicas. En las realizaciones relacionadas, la pluralidad de conjugados de detección está presente en la forma de una composición liofilizada, tal como una cuenta o gránulo liofilizado.

En realizaciones alternativas, las moléculas de captura se conjugan con nanoestructuras metálicas, que están en suspensión coloidal. La pluralidad de conjugados de detección se añade a la suspensión en presencia de una muestra de ensayo. Si el analito objetivo está presente en la muestra, se producirá la formación de un complejo entre los conjugados de detección y las nanoestructuras suspendidas que contienen las moléculas de captura, lo que dará lugar a un cambio en la señal óptica (*por ej.*, un cambio en la longitud de onda del pico de absorción de las nanoestructuras suspendidas).

Por consiguiente, en algunos casos, los kits comprenden un rotor o disco que tiene una o más cámaras de reacción, en el que cada cámara de reacción comprende (i) una composición liofilizada que comprende una pluralidad de conjugados de detección como se describe en la presente memoria y (ii) una cuenta revestida por una nanocapa metálica, en el que una pluralidad de moléculas de captura están inmovilizadas a la nanocapa metálica. Dichos kits proporcionan 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 el cual la muestra se mezcla con la pluralidad de conjugados de detección y la cuenta metálica revestida por nanocapas que contiene moléculas de captura inmovilizadas. En las realizaciones en las que el rotor o disco contiene más de una cámara de reacción, los conjugados de detección y las moléculas de captura 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.

60 Cualquiera de los tipos de nanocapas metálicas o nanoestructuras metálicas discutidas en la presente memoria puede utilizarse con estos dispositivos de detección en formato de rotor. En algunas realizaciones, el revestimiento de

nanocapas metálicas en la cuenta es una nanocapa de oro y las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección son nanoestructuras de oro. En otras realizaciones, el revestimiento de nanocapas metálicas en la cuenta es una nanocapa de plata y las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección son nanoestructuras de oro. En otras realizaciones, la nanocapa metálica que reviste la cuenta es una nanocapa de oro y las nanoestructuras

- 5 metálicas de los conjugados de detección son nanoestructuras de plata. En una realización, el revestimiento de nanocapas metálicas en la cuenta es una nanocapa de plata superpuesta a una nanocapa de oro y las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección son nanoestructuras de oro. En ciertas realizaciones, la nanocapa metálica que reviste la cuenta es una nanocapa de oro y las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección son 10 nanoestructuras de composite. 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.

Los kits 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 tampones de extracción para obtener muestras de materiales sólidos, tal como suelo, alimentos y tejidos biológicos.

- 15 La presente invención también proporciona procedimientos de detección de un analito objetivo en una muestra. En una realización, los procedimientos comprenden (i) mezclar una muestra de ensayo con una pluralidad de conjugados de detección como los descritos en la presente memoria; (ii) poner en contacto la mezcla con una superficie que contiene una nanocapa metálica, en el que una pluralidad de moléculas de captura como las descritas en la presente memoria están inmovilizadas a la nanocapa metálica; (iii) exponer la superficie a una fuente de luz en un rango de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y (iv) medir una señal óptica de la superficie, en el que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito objetivo en la muestra.

En algunas realizaciones, los procedimientos de detección son ensayos en sándwich. En tales realizaciones, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas a elementos de enlace que son capaces de unirse específicamente al analito objetivo si está presente en la muestra para formar complejos de conjugado de detección de analito. La pluralidad de moléculas de captura, que están inmovilizadas en la superficie de la nanocapa 25 metálica, también son capaces de unirse específicamente al analito objetivo si está presente en la muestra. La nanocapa metálica 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 ejemplo, cuando una muestra que contiene el analito objetivo se mezcla con la pluralidad de conjugados de detección, el analito objetivo se une a los elementos de enlace en los

- 30 conjugados de detección para formar complejos de conjugado de detección de analito. Estos complejos, a su vez, se unen a la pluralidad de moléculas de captura inmovilizadas en la superficie de la nanocapa metálica a través del analito, con lo que las nanoestructuras metálicas de los conjugados de detección se acercan a la superficie de la nanocapa metálica. La cantidad de luz que es absorbida o dispersada por la superficie de la nanocapa metálica se ve 35 afectada por la proximidad de las nanoestructuras metálicas en el complejo y, por tanto, produce un mayor desplazamiento de la longitud de onda del pico de absorción, lo que indica la presencia del analito objetivo en la muestra.

En otras realizaciones, los procedimientos de detección son ensayos competitivos. En dichas realizaciones, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas acopladas al analito objetivo de interés. Al igual que en el procedimiento de ensayo en sándwich, la pluralidad de moléculas de captura, que están inmovilizadas en la superficie de la nanocapa metálica, son capaces de unirse específicamente al analito objetivo. En este tipo de ensayo, 40 los conjugados de detección se unirán inicialmente a las moléculas de captura. Si una muestra que contiene un analito objetivo se mezcla con estos complejos iniciales, el analito objetivo no marcado o libre en la muestra competirá con los conjugados de detección para unirse a las moléculas de captura. El cambio en la señal óptica en este tipo de ensayo será el resultado del desplazamiento de las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección desde la superficie de la nanocapa metálica, lo que reducirá proporcionalmente el desplazamiento de la longitud de onda del pico de absorción.

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.

En algunas realizaciones de los procedimientos, la muestra de ensayo se mezcla con la pluralidad de conjugados de detección y la mezcla se pone posteriormente en contacto con la superficie de la nanocapa metálica que contiene las moléculas de captura inmovilizadas. En otras realizaciones, la muestra de ensayo se pone en contacto con la superficie de la nanocapa metálica que contiene las moléculas de captura inmovilizadas y posteriormente se añade la pluralidad de conjugados de detección y la

superficie de la nanocapa metálica que contiene las moléculas de captura inmovilizadas 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 anteriormente.

- 5 Cualquiera de los dispositivos de detección de analitos descritos anteriormente puede utilizarse en los procedimientos de detección de la presente invención. Por consiguiente, las diversas superficies de nanocapas metálicas, las moléculas de captura y los conjugados de detección descritos en la presente memoria son adecuados para uso en los procedimientos de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones de los procedimientos, la superficie que contiene una nanocapa metálica es un chip, un pocillo, una cubeta o una cuenta. En ciertas realizaciones de los procedimientos, la superficie que contiene una nanocapa metálica son las paredes y el fondo de una cubeta incorporada o adaptada para uso con un rotor centrífugo. En estas y otras realizaciones, la nanocapa metálica de la superficie es una película metálica, tal como una película de oro. En otras realizaciones de los procedimientos, la nanocapa metálica en la superficie comprende una pluralidad de nanoestructuras metálicas inmovilizadas en la superficie, tal como nanoestructuras de oro.
- 10 En ciertas realizaciones de los procedimientos de detección, los conjugados de detección comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a elementos de enlace o analitos objetivo. Como se describe en la presente memoria, las nanoestructuras metálicas de composite comprenden al menos dos metales nobles o metales de transición. En algunas realizaciones de los procedimientos, 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 de los procedimientos, 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 nanoestructuras metálicas de composite utilizadas en los procedimientos de la invención pueden incluir un número de geometrías diferentes, tal como nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanotubos, nanovainas, nanovarillas, nanopuntos, nanoislas, nanocables, nanodiscos, nanocubos, o sus combinaciones.
- 15 En ciertas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite 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).
- 20 30 35 40 45 50 55 60
- 25 Los procedimientos de detección de la invención pueden utilizarse para determinar cantidades cualitativas o cuantitativas de un analito objetivo. 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 objetivo puede determinarse estableciendo una curva estándar para el analito particular midiendo los cambios en las señales ópticas de la superficie de la nanocapa metálica como se describe en la presente memoria para las muestras con una cantidad conocida de analito objetivo; 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.
- 30 Los procedimientos de detección de la presente invención proporcionan una técnica altamente sensible para detectar cantidades diminutas de un analito objetivo en una muestra. Como se ha demostrado en los ejemplos de trabajo, la amplificación de las señales en base a la resonancia plasmónica superficial de las nanocapas de oro puede lograrse con conjugados de nanoestructuras de oro, de forma que se pueden detectar cantidades nanométricas del analito objetivo en una muestra. De este modo, en una realización de los procedimientos, se detecta la presencia de cantidades nanométricas de un analito objetivo. Los inventores han descubierto inesperadamente que se puede conseguir una amplificación significativamente mayor de las señales basadas en la resonancia plasmónica superficial de nanocapas de oro con conjugados de nanoestructuras metálicas de composite. El uso de nanoestructuras de plata

revestidas por oro y conjugadas con un anticuerpo específico para el analito permitió detectar cantidades de pictogramas del analito objetivo, lo que supone multiplicar por 1000 la sensibilidad en comparación con la obtenida con los conjugados de nanoestructuras de oro. Véase el Ejemplo 3. 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 nanoestructuras metálicas de composite y/o la superficie de las nanocapas metálicas.

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 para poder aplicar longitudes de onda específicas a la superficie de la nanocapa metálica.

Las propiedades ópticas de las nanocapas y 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 desplaza 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 ej., de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 500 nm) con el aumento del diámetro de la partícula provocando un desplazamiento de $\lambda_{\text{máx}}$ hacia longitudes de onda más largas. Las nanovarillas metálicas 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 470 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 ej., nanoprismas, nanovarillas, nanovainas, etc.) tienen una mayor sensibilidad LSPR en comparación con las esferas. En algunas realizaciones, las propiedades ópticas (por ej., absorción/dispersión en determinadas longitudes de onda) se adaptan a una aplicación concreta variando el tamaño, la forma o la composición de la nanocapa metálica depositada en la superficie o de las nanoestructuras metálicas empleadas en los conjugados de detección.

La interacción entre la luz incidente y la superficie de la nanocapa metálica 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 la nanocapa metálica puede ser una reflexión óptica, un espectro de absorbancia, un espectro de dispersión y/o un espectro de emisión.

El acoplamiento plasmónico entre la nanocapa metálica y las nanoestructuras metálicas en los conjugados de detección, resultante de la formación de complejos entre los elementos de enlace, el analito objetivo y las moléculas de captura, produce un cambio en el espectro de resonancia plasmónica superficial localizada de la nanocapa metálica. 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 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.

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 ej., instrumentos Biacore disponibles en GE Healthcare), analizadores centrífugos de Olympus, Hitachi, etc.

La presente invención también incluye un complejo de ensayo que comprende (i) un conjugado de detección que comprende una nanoestructura metálica compuesta acoplada a un elemento de enlace, (ii) un analito objetivo, y (iii)

5 una cuenta revestida por nanocapa metálica en la que se inmoviliza una molécula de captura, en el que el elemento de enlace en el conjugado de detección se une a un primer epítopo en el analito objetivo y la molécula de captura se une a un segundo epítopo en el analito objetivo, formando así un complejo que comprende el conjugado de detección, el analito objetivo y la molécula de captura. 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.

10 El elemento de enlace y la molécula de captura en el complejo de ensayo pueden ser cualquier tipo de molécula descrita anteriormente, incluidos haptenos y otras moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, macromoléculas biológicas tal como anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ej., Fv, Fab, (Fab)₂, cadena única, CDR, etc.), 15 antígenos, receptores, ligandos, polinucleótidos, aptámeros, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, glucopéptidos, lipoproteínas o nucleoproteínas. En una realización, el elemento de enlace es un anticuerpo y la molécula de captura es un anticuerpo diferente.

15 Las nanocapas metálicas y las nanoestructuras metálicas de composite son descritas en detalle con anterioridad. En una realización, la nanocapa metálica que reviste la cuenta (por ejemplo, de plástico o de vidrio) es una nanocapa de oro. En otra realización, la nanocapa metálica que reviste la cuenta es una nanocapa de plata. La cuenta es preferentemente menor de 0,5 cm, pero mayor de 0,1 mm. En ciertas realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite son nanoestructuras de plata revestidas por oro. En otras realizaciones, las nanoestructuras metálicas de composite son nanoestructuras de cobre revestidas por oro. En otras realizaciones, las nanoestructuras metálicas comprenden oro dopado con plata, iones de cobre o ambos iones.

20 Cualquier tipo de analito objetivo 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 25 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 30 otras realizaciones, el analito objetivo es un marcador o antígeno asociado a un estado fisiológico o patológico particular.

35 En ciertas realizaciones, el analito objetivo es un antígeno patógeno o un anticuerpo contra un antígeno patógeno. Por ejemplo, el antígeno patógeno puede ser un antígeno viral (por ej., el virus de la leucemia felina, el parvovirus canino, el virus de la fiebre aftosa, 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 ej., *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ántrax*, *Salmonella*, *Bacillus*, etc.), un antígeno fúngico, o un antígeno parasitario (por ej., gusano del corazón canino, *Giardia lamblia*, *plasmodium falciparum*, *trypansomiasis africana*, *Trypanosoma brucei*, etc.). 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 40 a, antígenos o marcadores relacionados con el cáncer (por ej., PSA, AFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CEA, NY-ESO-1, MUC1, GM3, GD2, ERBB2, etc.), antígenos o marcadores relacionados con enfermedad cardiovascular (por ej., troponina, proteína C reactiva, péptido natriurético cerebral, CKMB, proteína de enlace 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 ej., autoanticuerpos). En ciertas 45 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).

50 La presente divulgación también describe un procedimiento de preparación de nanoestructuras metálicas de composite. En un caso, el procedimiento comprende 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 solución 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.

55 El polímero utilizado en la preparación de la primera solución puede ser cualquiera de la polivinilpirrolidona, el alcohol polivinílico, el poliacrilato, el polietilenglicol, la polietilenimina, el ácido poliaspártico, el ácido poliglutámico, diversas gomas, la gelatina o polímeros mixtos que comprenden cualquiera de los anteriores. En un caso 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 algunos casos, el polímero tiene un peso molecular inferior a 50.000 Daltons. En otros casos, el polímero tiene un peso molecular inferior a 20.000 Daltons. En ciertos casos, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons.

5 Las características del revestimiento de oro pueden controlarse ajustando la relación de concentración del polímero con ácido cloroaurico. Por ejemplo, la relación de concentración entre polímero y ácido cloroaurico es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1, o de 10 aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 8:1. En algunos casos, la relación de concentración entre polímero y ácido cloroaurico 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 15 de ácido cloroaurico 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 15 solución de revestimiento (es decir, la primera solución). En ciertos casos, el pH de la solución se mantiene en un rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 14. El contenido de haluros de la solución es, en algunos casos, inferior a 150 mM. En otros casos, el contenido de haluro de la solución está en el rango de aproximadamente 0 a 50 mM.

20 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. 2014/01059820 Publicación de Patente de los EE.UU. Núm. 25 2013/0230717. En un caso, 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 30 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 ciertos casos, 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 35 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 40 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 ciertos casos, 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 algunos casos, 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 algunos casos, 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.

45 En algunos casos, el período de incubación de la primera solución con la segunda solución es de al menos 12 horas. En otros casos, 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 50 estabilizado. En ciertos casos, la estabilidad de las nanoestructuras resultantes al cloruro de sodio (por ej., 0,25-1M) se utiliza para indicar un revestimiento adecuado de las nanoestructuras.

55 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 60 ajustarse en función de las propiedades deseadas de las nanoestructuras, pero puede oscilar entre aproximadamente 15 minutos y un día.

En algunos casos, se añade a la mezcla entre 0,1 y 1 partes de ácido ascórbico (*por ej.*, 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.

- 5 En ciertos casos, los procedimientos comprenden además la adición o el dopaje de la mezcla con aproximadamente 1 a aproximadamente 100 partes de cloruro de oro (*por ej.*, aproximadamente 0,001 M a 1M) o nitrato de plata (*por ej.*, aproximadamente 0,001 M a 1M) u otro metal (*por ej.*, 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 10 algunos casos, se añade a la mezcla cloruro de oro, nitrato de plata u otro metal antes de añadir ácido ascórbico a la reacción. En otros casos, 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.

15 Esta invención se ilustra además con los siguientes ejemplos adicionales que no deben interpretarse como limitantes. Los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divultan y seguir obteniendo un resultado similar o parecido sin apartarse del alcance de la invención.

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Amplificación de señales LSPR con analito conjugado con nanopartículas de oro

20 Se preparó un sistema de detección de analitos proporcionando un chip de plástico sobre el que se depositó una nanocapa de oro. Las proteínas IgG humanas (100 µg/ml) se inmovilizaron en la película de nanocapas de oro para crear la superficie del sensor. Se construyó un sensor de control inmovilizando albúmina de suero bovino a la película de nanocapas de oro. Los dos tipos de superficies del sensor se colocaron dentro de un instrumento equipado con 25 fibras emisoras y recolectoras de luz que iluminan la superficie de la nanocapa de oro y recogen la luz reflejada por la superficie.

Se puso en contacto una muestra que contenía proteína A libre (10 µg/ml) con los dos tipos de superficies del sensor y se midieron los cambios en los espectros de reflectancia. Como se muestra en la Figura 1, la introducción de proteína A libre en el sensor que contiene IgG humana inmovilizada no produce un cambio visible significativo en el espectro de reflectancia de la película de nanocapas de oro, medido por un cambio en la longitud de onda del pico.

30 Se regeneraron las superficies del sensor mediante un tratamiento con ácido clorhídrico 1 mM y se puso en contacto con las superficies del sensor una muestra que contenía proteína A conjugada con nanopartículas de oro coloidal (CGC) a dos concentraciones diferentes (3,5 µg/ml y 0,175 µg/ml). El cambio en el espectro de reflectancia de la superficie de la nanocapa de oro se acentuó cuando la proteína A (es decir, el analito objetivo) se conjugó con las nanopartículas de oro coloidal. Específicamente, 3,5 µg/ml de proteína A-CGC produjeron un mayor desplazamiento 35 de la longitud de onda del pico que 10 µg/ml de proteína A sin marcar. La amplificación de la señal de resonancia plasmónica fue lo suficientemente grande como para permitir la detección de concentraciones de nanogramos de proteína A-CGC. Véase la Figura 1, sensor 3. Los cambios en el espectro de reflectancia del sensor de BSA representan la unión no específica de las moléculas de proteína A a la superficie del sensor y son significativamente 40 menores que los cambios inducidos por la unión específica de las moléculas de proteína A a las moléculas de IgG inmovilizadas.

Los resultados de este experimento inicial muestran que se puede lograr una amplificación considerable de los cambios en las señales de resonancia de plasmón superficial localizada inducidos por eventos de enlace en una superficie de nanocapa metálica mediante el acoplamiento del analito objetivo a nanopartículas de oro coloidal. Se observa una mejora de casi 60 veces en la sensibilidad, siendo detectadas cantidades nanométricas de analito.

Ejemplo 2. Amplificación de las señales LSPR en un ensayo de sándwich

Este ejemplo describe una serie de experimentos diseñados para evaluar si la amplificación de las señales de resonancia plasmónica superficial localizada con conjugados de nanopartículas de oro también puede lograrse en un formato de ensayo en sándwich en el que el analito objetivo no está directamente conjugado con las nanopartículas de oro. Se preparó una superficie de chip de nanocapa de oro como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo C7 50 contra la proteína C-reactiva (CRP) (100 µg/ml) se inmovilizó en la nanocapa de oro depositada en la superficie del chip para crear el sensor anti-CRP. El anticuerpo C6, que reconoce un epítopo de PCR distinto y no superpuesto al del anticuerpo C7, se conjugó con nanopartículas de oro coloidal (C6-CGC) para algunos experimentos o se utilizó en forma no marcada para otros.

En una primera serie de experimentos, una muestra que contenía una de tres concentraciones diferentes de CRP (1 ng/ml, 10 ng/ml, o 100 ng/ml) se incubó con el sensor anti-CRP durante 15 a 20 minutos y se monitorizaron los cambios 55 en el espectro de reflectancia de la nanocapa de oro. Como se muestra en la Figura 2, se observó un desplazamiento

mínimo de los picos al unirse la PCR al anticuerpo C7 anti-CRP inmovilizado en la superficie del sensor. La posterior exposición de la superficie del sensor al anticuerpo C6 anti-CRP no marcado (1 µg/ml) no generó nuevos desplazamientos significativos de los picos. Véase la Figura 2. Del mismo modo, la posterior exposición de la superficie del sensor a 3 µg/ml de C6-CGC no produjo más cambios en el espectro de reflectancia, lo que indica que las moléculas de CRP unidas estaban probablemente saturadas con el anticuerpo C6 no marcado. Véase la Figura 2.

En una segunda serie de experimentos, una muestra que contenía una de las tres concentraciones diferentes de CRP (1 ng/ml, 10 ng/ml, o 100 ng/ml) se incubó con el sensor anti-CRP durante 15 a 20 minutos. Posteriormente se introdujeron dos concentraciones diferentes de C6-CGC (1 µg/ml y 3 µg/ml) y se midieron los cambios en el espectro de reflectancia (Figuras 3 y 4A). Los resultados muestran que la conjugación del anticuerpo C6 anti-CRP con las nanopartículas de oro amplifica el desplazamiento de la longitud de onda del pico en comparación con el anticuerpo C6 no marcado. Las concentraciones crecientes de C6-CGC producen un desplazamiento de la longitud de onda del pico que depende de la dosis. Sin embargo, la diferencia de señal entre 1 ng/ml y 10 ng/ml fue pequeña (Figura 4B).

En una tercera serie de experimentos, se evaluó el efecto del tiempo de incubación del analito en el desarrollo de la señal. El sensor anti-CRP se puso en contacto con una muestra que contenía 0 ng/ml, 10 ng/ml o 100 ng/ml de CRP y se introdujo inmediatamente 3 µg/ml de C6-CGC sin ningún tiempo de incubación del analito ni de lavado. Como se muestra en las Figuras 5 y 6, un menor tiempo de incubación del analito da lugar a menores desplazamientos de la longitud de onda de los picos.

Los resultados de estos tres conjuntos de experimentos muestran que la amplificación de las señales de LSPR puede lograrse con conjugados de nanopartículas de oro en un formato de ensayo de sándwich. Se observa un mayor desplazamiento de la señal cuando el anticuerpo detector está marcado con partículas de oro coloidal en comparación con el anticuerpo no marcado, lo que permite la detección de concentraciones nanométricas de analito.

Ejemplo 3. Amplificación mejorada de la señal con nanoestructuras de plata revestidas por oro

Para examinar si la variación del tipo de metal utilizado para etiquetar los elementos de enlace afectaba a la amplificación de las señales LSPR, se prepararon nanoestructuras metálicas de composite. Específicamente, se prepararon nanoestructuras de plata revestidas por oro de la siguiente manera. Las nanoestructuras de plata se prepararon añadiendo 50,0 ml de H₂O desionizado, 500,0 µL de citrato trisódico (75mM), 200 µL de AgNO₃ (200mM) y 500,0 µL de H₂O₂ (27%) mientras se agitaba vigorosamente a temperatura ambiente. A continuación, se inyectó rápidamente una alícuota de 500 µL de NaBH₄ (200mM) en la solución acuosa, provocando un cambio de color a amarillo claro. A lo largo de varios minutos, el color continuó cambiando de amarillo oscuro a rojo y a púrpura, y finalmente se estabilizó en azul. Los espectros UV/Vis determinaron que el pico de absorbancia de la solución se encontraba a 604,5 nm.

Se añadió un revestimiento de oro a las nanoestructuras de plata añadiendo 5,0 ml de la solución azul a una mezcla de 50 µL de polivinilpirrolidona (PVP MW ≈ 10.000 20% en etanol) y 50 µL de HAuCl₄ (20mM). Tras 72 horas de incubación, la muestra adquirió un color rojo oscuro y presentó un pico de absorbancia a 534,5 nm. Las nanopartículas se lavaron dos veces por centrifugación a 20.000 rpm durante 20 minutos y se resuspendieron en 2,0 ml de H₂O desionizada. La solución tenía un color rojo intenso, un pico de absorción a 530,3 nm y una absorbancia total de 15,0 unidades OD.

La conjugación de las nanoestructuras de plata revestidas por oro (Au@AgNPs) con el anticuerpo C6 anti-CRP se realizó añadiendo 600,0 µL de Au@AgNPs y 20,0 µL de anticuerpo C6 anti-CRP (8,0 mg/ml) a 880,0 µL de H₂O desionizada, con lo que la concentración final del anticuerpo fue de 17,8 µg/ml/OD. Tras un período de incubación de 2 horas a 4 °C, la muestra se centrifugó a 30.000 g durante 20 minutos y se resuspendió en 1,5 ml de una solución de bloqueo que contenía BSA (10 mg/ml) en PBS. Las Au@AgNPs conjugadas con el anticuerpo anti-CRP C6 se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

El sensor de nanocapas de oro anti-CRP se preparó como se describe en el Ejemplo 2 y tuvo un pico de absorción a 530 nm. También se preparó un sensor de control que contenía la nanocapa de oro sin ningún anticuerpo inmovilizado. Los sensores se equilibraron con 100 µL de PBS.

100 µL de anticuerpo C6 anti-CRP conjugado con Au@AgNPs diluido a 1,5 OD en PBS se premezcló durante 1 minuto con 1, 10 o 500 pg/ml de antígeno CRP. A continuación, la mezcla se puso en contacto con la superficie del sensor anti-CRP o de control y se midieron los cambios en el espectro de reflectancia de la superficie de la nanocapa de oro. Los resultados muestran que las nanoestructuras de plata revestidas por oro mejoraron el desplazamiento de la longitud de onda del pico inducido por la unión del complejo PCR-anticuerpo a la superficie del sensor (Figura 7). La detección de 1 pg/ml de antígeno de PCR fue posible con las nanoestructuras de plata revestidas por oro, lo que supone una mejora de 1000 veces en la sensibilidad en comparación con la obtenida con las nanopartículas de oro. A mayores concentraciones de antígeno los sitios de enlace se saturan y no se producen más desplazamientos.

Los resultados de este experimento demuestran la amplificación significativamente mejorada de las señales LSPR de una superficie de nanocapa metálica lograda cuando se utilizan nanoestructuras de composite, como las nanoestructuras de plata revestidas por oro, para etiquetar a los elementos de enlace del analito.

Ejemplo 4. Síntesis de nanoestructuras de alta densidad óptica

Las nanopartículas de oro se prepararon mezclando los siguientes reactivos en un volumen final de 1 ml en el orden indicado: 0,1 ml de PVP-10 al 1% (peso/peso), 0,2 ml de cloruro de oro 0,1M, 0,1 ml de NaOH 5N, 0,4 ml de agua y 0,2 ml de ácido ascórbico 1M. La mezcla de reacción se mezcló después de cada adición. Las mediciones

5 espectroscópicas indicaron que la reacción se había completado en su mayor parte tras 24 horas a temperatura ambiente. Con este protocolo se obtuvieron nanopartículas de oro esféricas que presentaban el pico LSPR alrededor de 535 nm y la correspondiente densidad óptica de aproximadamente 80 por ml. La estratificación con oro o plata adicional se realizó añadiendo nitrato de plata o cloruro de oro a las nanopartículas de oro preformadas. El exceso de reactivos se eliminó por centrifugación a 30.000 g durante 1-2 horas.

10 En una reacción separada, se mezclaron 0,05 ml de PVP al 20% (peso/peso) con 0,25 ml de agua, 0,1 ml de NaOH 5N, 0,1 ml de citrato de sodio 1 M, 0,5 ml de cloruro de oro 0,1M y 1 ml de ácido ascórbico 1M. Este protocolo dio lugar a la formación inmediata de partículas de oro coloidal a una DO de aproximadamente 90/ml con un pico de LSPR a ~525 nm. Se observó una correspondencia lineal entre la DO final y la concentración de oro entre 2,5 mM de oro y 25 mM de oro en la mezcla de reacción final.

15 Se comprende que la invención divulgada no se limita a la metodología, los protocolos y los materiales particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También se comprende que la terminología utilizada en la presente memoria es para los propósitos de describir las realizaciones particulares solamente y no está destinado a limitar el alcance de la presente invención, que será limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

20 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Se pretende abarcar dichos equivalentes en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de detección de analitos para detección en base a resonancia plasmónica superficial localizada, comprendiendo el dispositivo:
 - 5 una pluralidad de conjugados de detección, en el que los conjugados comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a elementos de enlace que son anticuerpos capaces de unirse específicamente a un primer epítopo de un analito objetivo, en el que las nanoestructuras metálicas de composite comprenden un revestimiento de oro y un núcleo de plata;
 - una superficie que contiene una nanocapa metálica; y
 - 10 una pluralidad de moléculas de captura inmovilizadas en la nanocapa metálica, en el que las moléculas de captura son anticuerpos capaces de unirse específicamente a un segundo epítopo del analito objetivo.
2. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que las nanoestructuras metálicas de composite son nanopartículas esféricas y tienen un diámetro de 5 nm a 200 nm o de 10 nm a 100 nm; o en el que las nanoestructuras metálicas de composite son nanoplacas con una longitud de borde de 10 nm a 800 nm y un espesor de 1 nm a 100 nm.
- 15 3. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de conjugados de detección está en forma de un microgránulo o cuenta liofilizada.
4. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que la superficie es un chip, un pocillo, una cuenta, o una pared, revestimiento y/o fondo de una cubeta.
- 20 5. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que la nanocapa metálica es una película metálica; o en el que la nanocapa metálica comprende una pluralidad de nanoestructuras metálicas inmovilizadas en la superficie.
6. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que las nanoestructuras de composite tienen una geometría seleccionada de nanopartículas esféricas, nanopartículas piramidales, nanopartículas hexagonales, nanovainas, nanotubos, nanovarillas, nanopuntos, nanoislas, nanocables, o sus combinaciones.
- 25 7. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que el analito objetivo es un marcador o antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, estado fisiológico o afección patológica, o en el que el analito objetivo es el gusano del corazón canino, el virus de la leucemia felina, el parvovirus canino, proteína C reactiva, *Giardia lamblia*, antígeno o anticuerpo de *Ehrlichia*, antígeno o anticuerpo de *Borrelia*, antígeno o anticuerpo de *Anaplasma*, un antígeno de cáncer, un antígeno marcador cardíaco, hormona estimulante de la tiroides, tiroxina, troponina o péptido natriurético cerebral.
- 30 8. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que las nanoestructuras metálicas de composite tienen un pico de absorbencia de 515 nm a 670 nm o de 520 nm a 560 nm.
9. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 1, en el que el dispositivo proporciona una mejora significativamente mayor en la sensibilidad en comparación con un segundo dispositivo que es igual que el dispositivo excepto que las nanoestructuras metálicas de composite consisten en oro.
- 35 10. Un procedimiento de detección de un analito objetivo en una muestra en base a la resonancia de plasmón superficial localizada utilizando el dispositivo de detección de analitos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el procedimiento:
 - 40 mezclar la muestra con la pluralidad de conjugados de detección, en el que los conjugados comprenden nanoestructuras metálicas de composite acopladas a elementos de enlace que son anticuerpos capaces de unirse específicamente al primer epítopo del analito objetivo si está presente en la muestra para formar complejos de conjugado de detección de analito, en el que las nanoestructuras metálicas de composite comprenden un revestimiento de oro y un núcleo de plata;
 - 45 poner en contacto la mezcla con la superficie que contiene la nanocapa metálica con la pluralidad de moléculas de captura inmovilizadas en ésta, en el que las moléculas de captura son anticuerpos capaces de unirse específicamente al segundo epítopo del analito objetivo;
 - exponer la superficie a una fuente de luz en un intervalo de longitud de onda dentro del espectro ultravioleta-visible-infrarrojo; y
 - 50 medir una señal óptica de la superficie, en el que un cambio en la señal óptica indica la presencia del analito objetivo en la muestra.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que

- a) la señal óptica es una reflectancia, un espectro de absorbencia, un espectro de dispersión o un espectro de emisión;
- b) el cambio en la señal óptica comprende un desplazamiento de la longitud de onda del pico espectral;
- c) se detecta la presencia de cantidades de nanogramos, picogramos o femtogramos del analito objetivo; o
- 5 d) la superficie son las paredes y el fondo de una cubeta incorporada en un rotor centrífugo.

12. Un complejo para realización de un ensayo de detección en base a resonancia plasmónica superficial localizada, que comprende:

10 un conjugado de detección que comprende una nanoestructura metálica compuesta acoplada a un elemento de enlace que es un anticuerpo, en el que la nanoestructura metálica compuesta comprende un revestimiento de oro y un núcleo de plata;

un analito objetivo que tiene un primer epítopo y un segundo epítopo; y

15 una cuenta metálica revestida de nanocapas sobre la que se inmoviliza una molécula de captura, en el que:
(a) la molécula de captura es un anticuerpo que es un anticuerpo diferente del anticuerpo del elemento de enlace, y (b) el elemento de enlace en el conjugado de detección está unido al primer epítopo del analito objetivo y la molécula de captura está unida al segundo epítopo del analito objetivo, formando así el complejo que comprende la molécula de detección, el analito objetivo y la molécula de captura.

13. El complejo de la reivindicación 12, en el que

a) la nanocapa metálica es una película metálica; o

b) la nanocapa metálica comprende una pluralidad de nanoestructuras metálicas inmovilizadas en la cuenta.

20 14. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 5 o el complejo de la reivindicación 13, en el que la película metálica comprende oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio, zinc o un composite de los mismos.

15. El dispositivo de detección de analitos de la reivindicación 5 o el complejo de la reivindicación 13, en el que la pluralidad de nanoestructuras metálicas comprende oro, plata, cobre, platino, paladio, cadmio, zinc o un composite de los mismos.

25 16. El dispositivo, procedimiento o complejo de detección de analitos de la reivindicación 1, 10 o 12, en el que el dispositivo, procedimiento o ensayo del complejo tiene una sensibilidad de detección de cantidades de picogramos del analito objetivo.

FIGURA 1 Cambio [nm] & 3 más vs. Tiempo Adq. [seq]

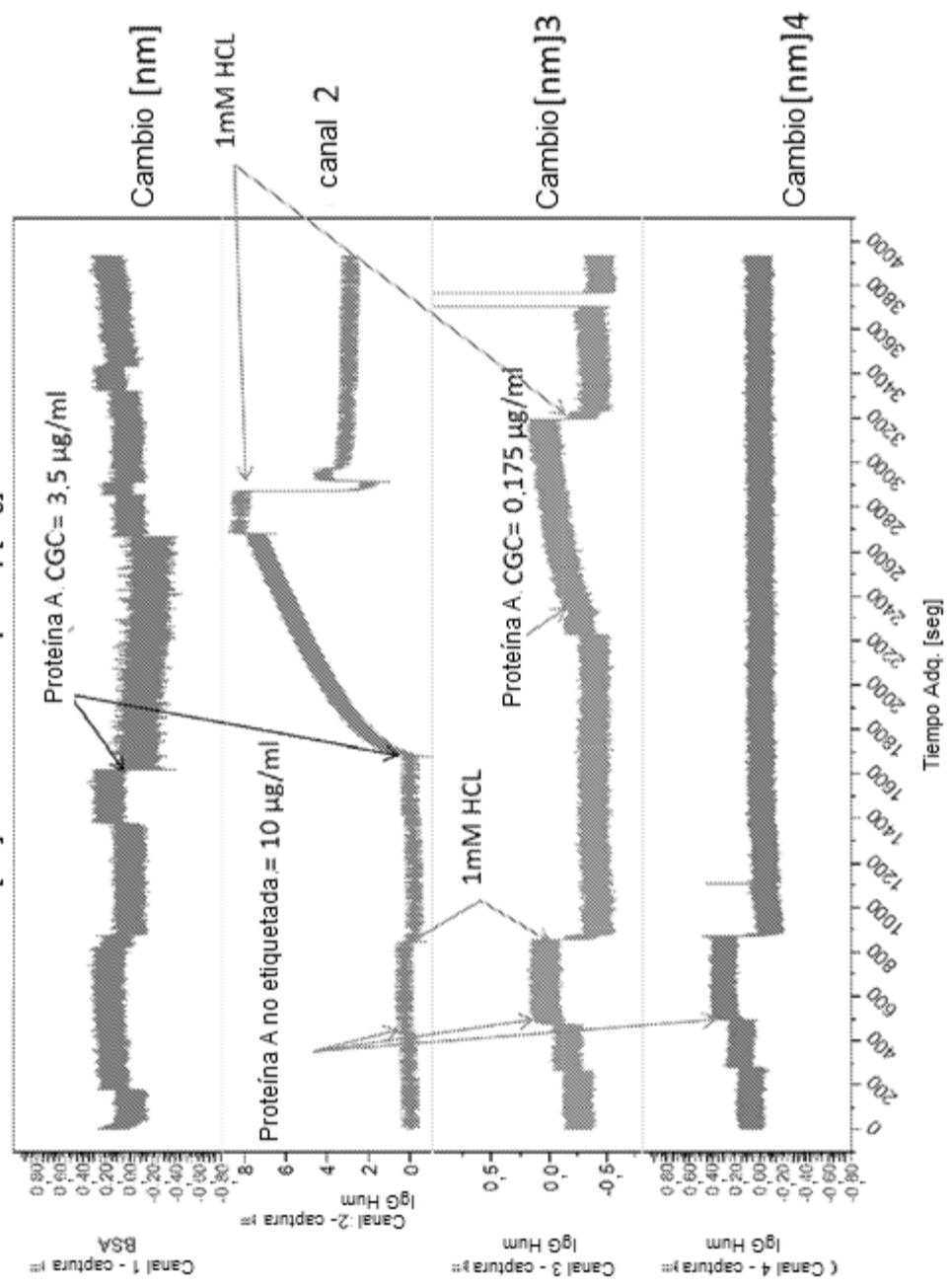


FIGURA 2

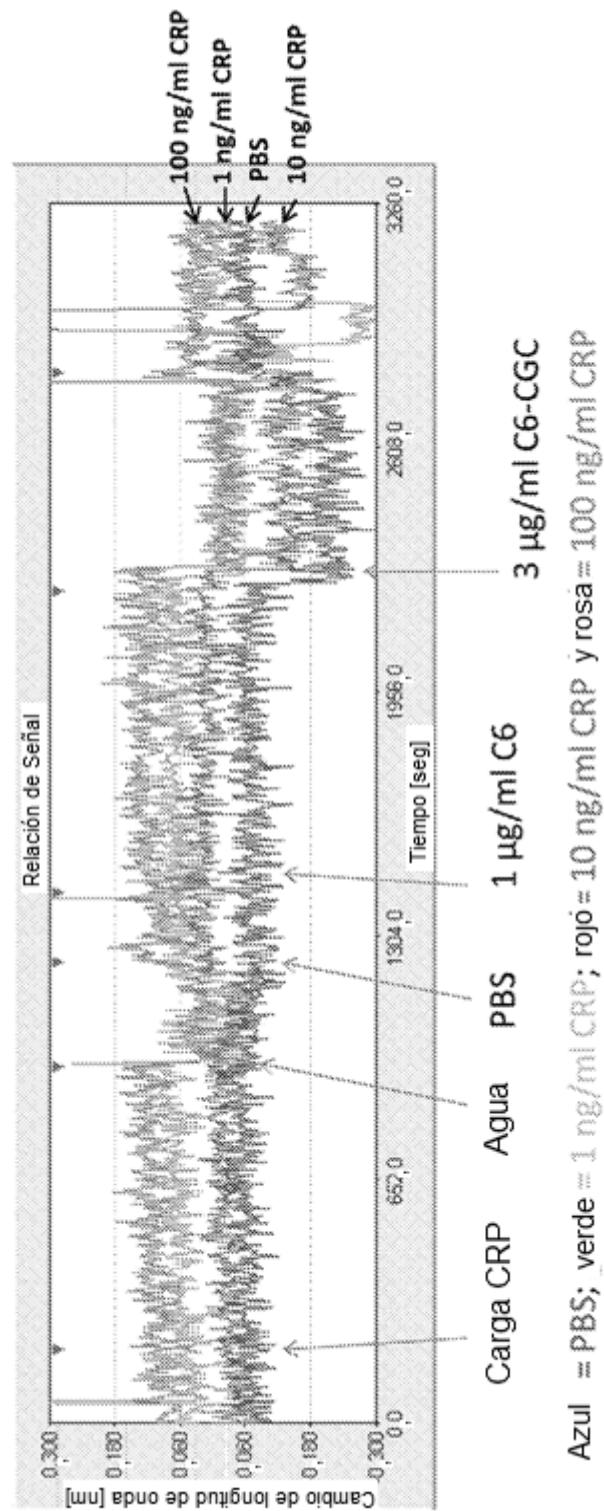
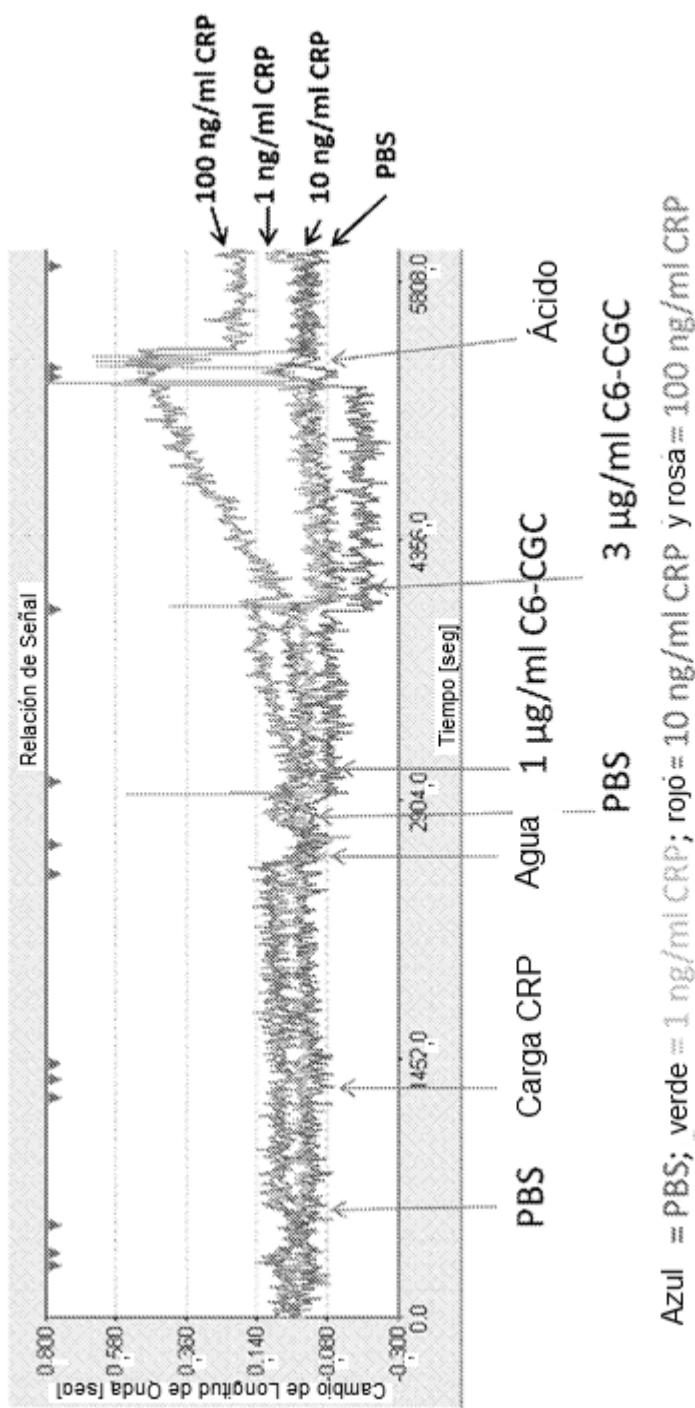


FIGURA 3



Azul = PBS; verde = 1 ng/ml CRP; rojo = 10 ng/ml CRP y rosa = 100 ng/ml CRP

ES 2 888 230 T3

FIGURA 4

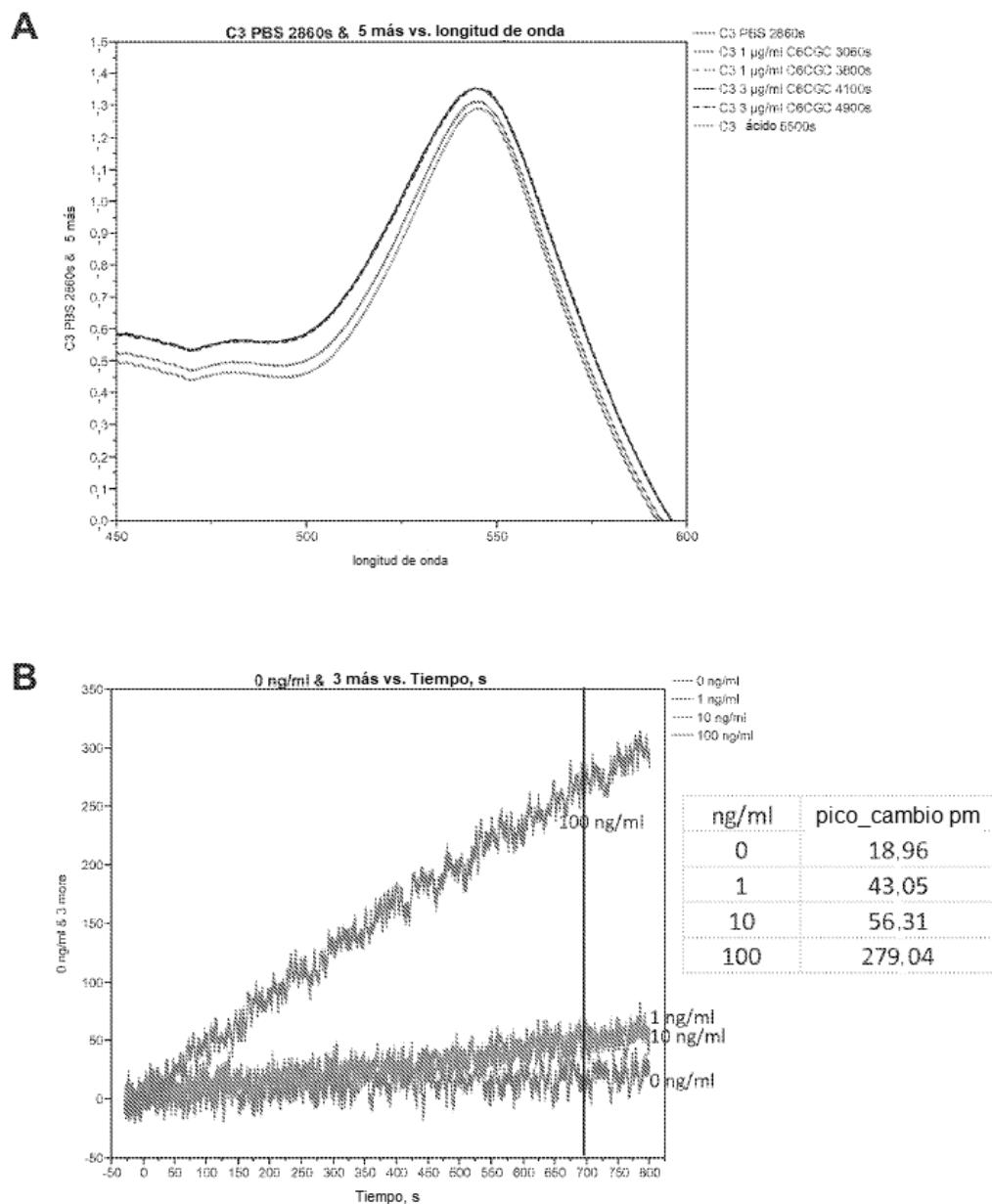
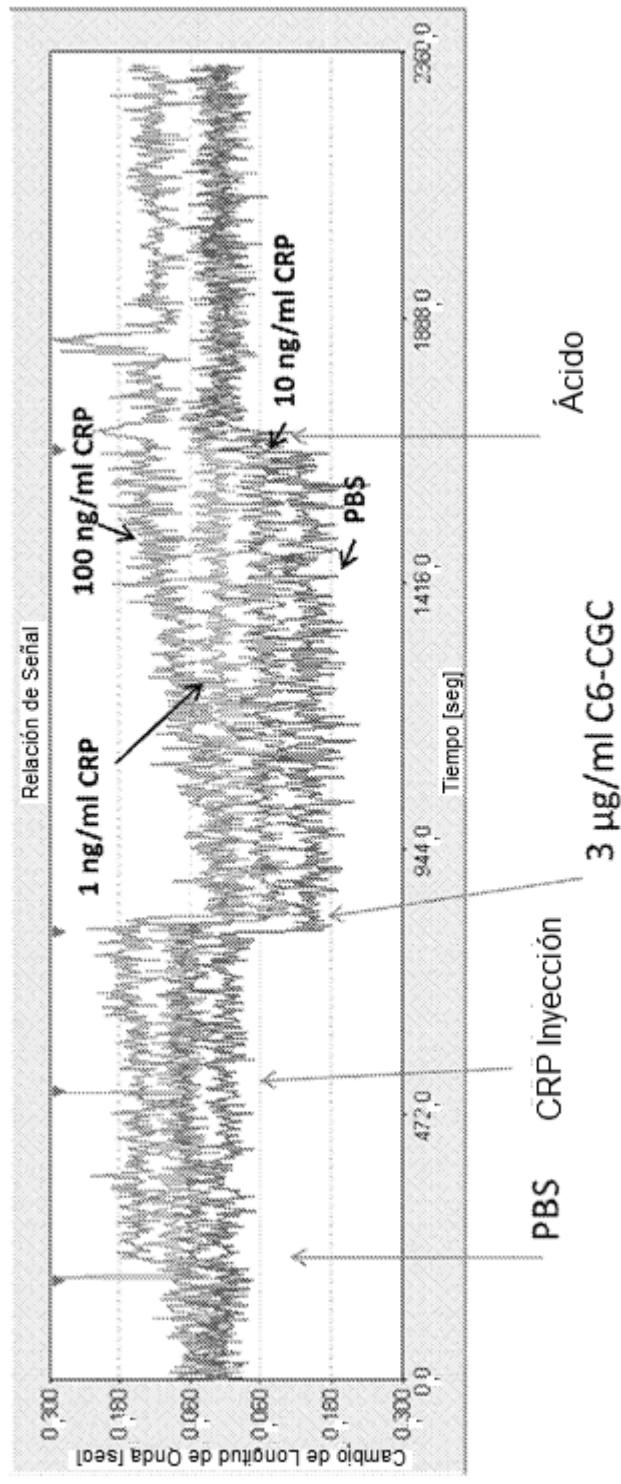


FIGURA 5



Azul = PBS; verde = 1 ng/ml CRP; rojo = 10 ng/ml CRP y rosa = 100 ng/ml CRP

FIGURA 6

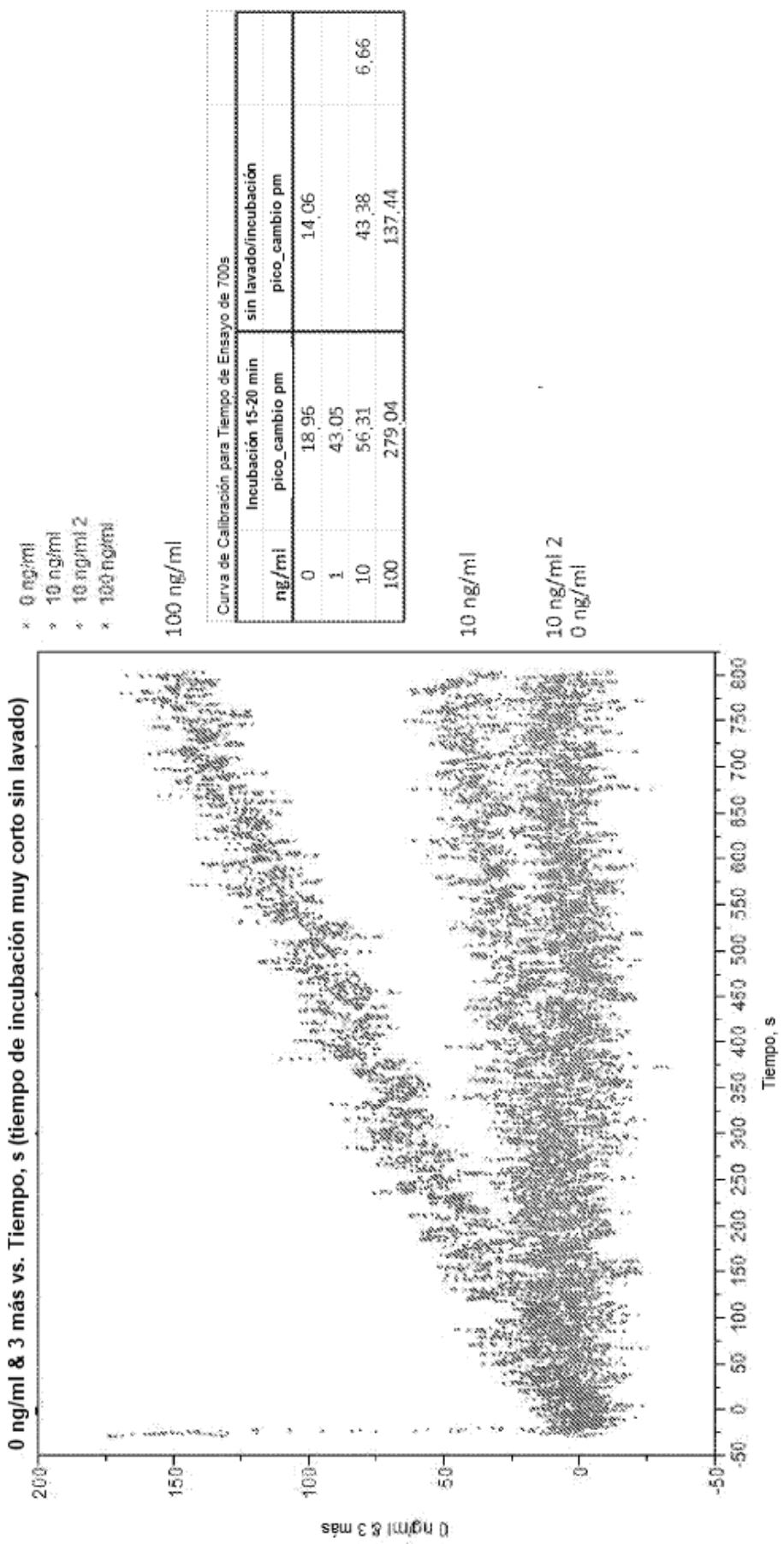


FIGURA 7

