

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 992 503**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2019 PCT/AU2019/051034**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2020 WO20061632**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2019 E 19866629 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3857231**

(54) Título: Cuantificación de analitos

(30) Prioridad:

25.09.2018 AU 2018903614

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

13.12.2024

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SYDNEY (100.0%)

15 Broadway Ultimo, New South Wales 2007, AU

(72) Inventor/es:

JIN, DAYONG y HE, HAO

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 992 503 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

Cuantificación de analitos

5 Campo de la divulgación

La presente invención se refiere a métodos para determinar la cantidad de un analito en una muestra usando tiras de flujo lateral que comprenden nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas.

10 Antecedentes de la divulgación

Cualquier análisis de la técnica anterior a lo largo de la memoria descriptiva no debe considerarse de ninguna manera como una admisión de que tal técnica anterior es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

15 Las tiras de flujo lateral son una tecnología prometedora para detectar y cuantificar analitos, tales como biomarcadores en una muestra. Las tiras de flujo lateral a base de papel son generalmente económicas, pero las técnicas de ensayo actuales no proporcionan suficiente sensibilidad para la detección y cuantificación de analitos presentes en bajas concentraciones, por ejemplo, biomarcadores usados para el diagnóstico de cáncer en estadio temprano. Se han realizado varios intentos para mejorar las técnicas de ensayo conocidas, sin embargo, tales intentos no han tenido éxito en gran medida.

20 En este contexto, existe la necesidad de ensayos mejorados basados en tiras de flujo lateral que sean capaces de detectar y cuantificar analitos presentes en muestras a bajas concentraciones.

25 El documento de Liang Zhiqin *et al.* "Upconversion Nanocrystals Mediated Lateral-Flow Nanoplatform for in Vitro Detection", Applied Material & Interfaces, vol. 9, n.º 4, 19 de enero de 2017, páginas 3497-3504, da a conocer la preparación de nanocristales de conversión ascendente de β -Na₂YF₄:Yb³⁺, Er³⁺ dopados de manera conjunta con Li⁺ y K⁺, mostrando altas intensidades de conversión ascendente y pequeño tamaño. La concentración de Er³⁺ es del 2 %.

30 El documento de Zhao Peng *et al.*, "Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of Vibrio anguillarum", Nanoscale, vol. 6, n.º 7, 1 de enero de 2014, páginas 3804-3809, da a conocer un sensor de tira fluorescente de conversión ascendente basado en nanopartículas de NaYF₄:Yb, Er y el ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (LFIA) y la síntesis de NPS de β -Na₂YF₄:Yb, Er modificadas con carboxilo. La concentración de Er³⁺ es del 2 %.

35 El documento CN 108 196 044 A da a conocer un método de detección de papel reactivo de corriente lateral basado en aptámeros fluorescente de conversión ascendente y nanopartículas fluorescentes de conversión ascendente dopadas con tierras raras que contienen NaYF₄, Er, Yb o Tm.

40 Sumario de la divulgación

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para determinar la cantidad de al menos un analito en una muestra, como se describe en la reivindicación 1 adjunta. Realizaciones preferidas del método según la invención se definen en las reivindicaciones dependientes 2 a 12.

45 Las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas pueden tener un tamaño entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm.

50 Las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas pueden tener un tamaño de aproximadamente 50 nm.

Las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas pueden estar pasivadas con cubierta inerte.

55 La porción de captura y/o la porción de detección pueden incluir uno o más de: un anticuerpo, un aptámero, un epítopo, un ácido nucleico o un polímero de impresión molecular.

El área irradiada puede ser de entre aproximadamente 1 μm^2 y aproximadamente 10000000 μm^2 .

60 El dispositivo de prueba puede comprender además una lente o una matriz de lentes interpuestas entre la fuente de luz de excitación y la tira de flujo lateral para enfocar el haz de luz sobre la tira de flujo lateral.

El dispositivo de prueba puede comprender además una lente o una matriz de lentes interpuestas entre la tira de flujo lateral y el detector para enfocar la señal sobre el detector.

65 La lente puede ser una lente hemisférica.

El dispositivo de prueba puede comprender además un filtro de paso corto, un filtro de paso largo o un filtro de paso de banda para minimizar o evitar la dispersión láser.

El filtro puede ser en forma de vidrio absorbente de calor, por ejemplo, vidrio absorbente de calor KG-3.

5

El detector puede ser una cámara, tal como, por ejemplo, una cámara de teléfono inteligente.

El detector puede ser un detector de elemento único, tal como, por ejemplo, un diodo fotónico.

10 La señal detectable puede ser luz visible o luz infrarroja.

La fuente de luz de excitación puede ser un diodo láser o una fuente de luz de IR cercano, tal como una fuente de luz de LED de IR cercano.

15 El diodo láser puede ser un diodo láser de 300 mw a 980 nm, un diodo láser de 100 mw a 790 nm, o un diodo láser de 100 mw a 1550 nm.

20 El haz de luz puede tener una densidad de potencia de al menos aproximadamente 0,001 MW/cm², o al menos aproximadamente 0,01 MW/cm², o al menos aproximadamente 0,05 MW/cm², o al menos aproximadamente 0,1 MW/cm², o al menos aproximadamente 0,5 MW/cm², o al menos aproximadamente 1,0 MW/cm², o al menos aproximadamente 1,5 MW/cm².

25 El haz de luz puede tener una densidad de potencia entre aproximadamente 0,001 MW/cm² y aproximadamente 1,5 MW/cm², o entre aproximadamente 0,01 MW/cm² y aproximadamente 1,5 MW/cm².

25

La muestra puede ser una muestra biológica.

La muestra puede ser un fluido corporal, tales como, por ejemplo, orina, sudor, sangre o saliva.

30 La muestra puede ser una muestra de líquido o una muestra de gas.

La muestra de gas puede ser aliento.

35 El analito puede ser un biomarcador.

35 El analito puede ser un biomarcador usado para el diagnóstico del cáncer o la evaluación de la función cardíaca.

40 El analito puede ser un receptor de estrógenos, receptor de progesterona, PSA, EphA2, proteína HER-2, EGFR, KRAS, UGT1A1, EML4, AL, TGF-β, IDH1, AFP, CEA, BCR-ABL, CEBPA, FLT3, KIT, NPM1, PML-RARα, CD20, JAK2, CD25, BRAF, NMP22, CA-125, HE4, HGF, CK-MB, LDH, AST, Mb, IMA, BNP o MET, o cualquier combinación de los mismos.

45 El método puede comprender determinar la cantidad de una pluralidad de analitos.

45 La tira de flujo lateral puede ser una tira de flujo lateral a base de papel o un dispositivo microfluídico.

El dispositivo de prueba puede comprender un alojamiento de plástico.

50 El alojamiento de plástico puede producirse mediante impresión 3D.

50 La cantidad del al menos un analito en la muestra puede determinarse ajustando la intensidad de una imagen capturada por el detector con una curva de intensidad-concentración preestablecida para el analito.

Breve descripción de dibujos

55

Figura 1: fotografías TEM de A) UCNP de 2 % de Er/20 % de Yb, B) UCNP de 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄, C) UCNP de 0,5 % de Tm/20 % de Yb, y D) UCNP de 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF₄. Barra de escala: 100 nm.

60 Figura 2: Espectro de absorción de UV de UCNP recubiertas con cPEG y modificadas con IgG. A) 2 % de Er/20 % de Yb no según la invención; B) 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄ C) 0,5 % de Tm/20 % de Yb no según la invención, y D) 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF₄.

65 Figura 3: (no según la invención) Espectros dependientes de la potencia de 2 % de Er/20 % de Yb (izquierda) y 0,5 % de Tm/20 % de Yb (derecha) bajo potencia de excitación baja y alta.

65

Figura 4: Diseño óptico del sistema de prueba de tira basado en detector de recuento de fotón único.

5 Figura 5: A) Ilustración esquemática de un lector basado en teléfono móvil con diseño óptico. B) Estructura de las
UCNP de núcleo-cubierta altamente dopadas con Er³⁺ con la imagen TEM correspondiente. C) Estructura de las UCNP
de núcleo-cubierta altamente dopadas con Tm³⁺ con la imagen TEM correspondiente. D) Ensayos de LFS de dos
colores para analitos de PSA y EphA2.

10 Figura 6: A) Perfiles de intensidad de emisión dependientes de la potencia de indicadores de UCNP altamente dopadas
individuales y UCNP menos dopadas. La flecha roja indica la densidad de potencia a 0,5 MW/cm². B) Espectros de
emisión de indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ bajo potencias de excitación alta (0,5 MW/cm²) y baja
(0,01 MW/cm²). C) Espectros de emisión de indicadores de UCNP altamente dopadas con Tm³⁺ bajo potencias de
excitación alta (0,5 MW/cm²) y baja (0,01 MW/cm²). D) Intensidades de señal de fluorescencia del área de prueba
sobre tiras cuando se detectan diferentes concentraciones de PSA diana usando indicadores de UCNP altamente
dopadas con Er³⁺ y UCNP menos dopadas. Las estrellas marcan los LOD.

15 Figura 7: A) Fotografías de una caja impresa en 3D para alojar óptica (izquierda) y el estado de funcionamiento del
dispositivo de LFS basado en teléfono (derecha). B) Respuesta espectral (líneas coloreadas) de la cámara de teléfono
CMOS (Sony IMX-214) y la curva de transmisión (línea gris) del vidrio absorbente KG-3. C) Resultado representativo
de un ensayo de PSA típico que muestra las señales del área de prueba, fondo y área de control. D) Detección de
20 diferentes concentraciones de PSA diana sobre tiras usando indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ y
UCNP menos dopadas. Las estrellas marcan los LOD.

25 Figura 8: A) Fotografías del ensayo de LFS de dos colores para someter a prueba diferentes concentraciones de PSA
y EphA2. B) Intensidades de fluorescencia del área de prueba de PSA para detectar diferentes concentraciones de
PSA. C) Intensidades de fluorescencia del área de prueba de EphA2 para detectar diferentes concentraciones de
EphA2. D) Evaluación de especificidad de LFS de dos colores para 1 ng/ml de PSA, EphA2 y BSA. Las estrellas
marcan los LOD.

Descripción detallada

30 Los términos "comprender", "comprende", "comprendido" o "que comprende", "que incluye" o "que tiene" y similares
en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la
presencia de las características indicadas, pero no excluir la presencia de otras características o características
adicionales.

35 Se entiende que el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de +/- 10 %, preferiblemente +/- 5 % o +/- 1 %
o, más preferiblemente, +/- 0,1 %.

40 El método de la presente invención se basa en el uso de un haz de luz enfocado que activa nanopartículas de
conversión ascendente altamente dopadas presentes en una tira de flujo lateral para producir emisiones muy brillantes.
El brillo de las emisiones abre el camino para la detección ultrasensible y la cuantificación de analitos presentes en
muy baja abundancia.

45 Los métodos descritos en el presente documento permiten el análisis rápido, cuantitativo y de bajo coste de analitos
presentes en una gama de muestras y son particularmente adecuados para aplicaciones de pruebas en el punto de
atención, y en particular diagnósticos. En algunas realizaciones, el método puede usarse en la detección y
cuantificación de biomarcadores usados para el diagnóstico en estadio temprano de enfermedades tales como cáncer.
Los inventores han mostrado que los biomarcadores presentes en cantidades de pg/ml pueden detectarse y
cuantificarse con éxito usando el presente método.

50 Las tiras de prueba de flujo lateral se han utilizado durante muchos años en la detección de analitos en campos que
incluyen biomedicina, agricultura, ciencias alimentarias y ambientales y pueden adoptar una serie de formas diferentes.
En un tipo, la tira de prueba se divide en cuatro dominios, que pueden estar hechos de un solo tipo de material o varios
tipos diferentes de material (por ejemplo, hasta cuatro tipos diferentes de materiales). El primer dominio es para adición
de muestra. Este dominio funciona para retirar cualquier material viscoso o particulado que puede estar presente en
la muestra y también para acondicionar la muestra para reacciones que se producen en los siguientes dominios. El
segundo dominio es una fase móvil con un conjugado de color hecho de conjugación entre un marcador de color
visible (por ejemplo, perlas coloreadas, oro coloidal, colorantes fluorescentes, etc.) y una porción de detección, tal
como un anticuerpo. La porción de detección es capaz de unirse a un analito específico en la muestra (tal como un
antígeno) y forma un complejo de conjugado de analito-color. El tercer dominio es una fase sólida con una porción de
captura inmovilizada. La porción de captura puede unirse al analito del complejo de conjugado de analito-color para
formar un elemento intercalado de complejo de conjugado de porción de captura-analito-color capturado. El cuarto
dominio es para absorción de disolución y atrae la disolución de muestra hacia el mismo continuamente.

65 Las tiras de flujo lateral adecuadas para su uso en el presente método pueden prepararse mediante métodos estándar
conocidos por los expertos en la técnica. La tira de flujo lateral incluye un conjugado que comprende una porción de
detección (tal como, por ejemplo, un anticuerpo) que es capaz de unir el al menos un analito (tal como, por ejemplo,

- un antígeno) y nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas. La tira de flujo lateral también incluye una porción de captura que sirve para inmovilizar el conjugado sobre la tira de flujo lateral a través de la interacción con el analito una vez que se une al conjugado. La presencia del analito se detecta luego usando la emisión de las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas. Normalmente, la tira de flujo lateral es una tira de flujo lateral a base de papel.
- Las tiras de flujo lateral pueden adaptarse para someter a ensayo una gama de diferentes tipos de analitos. Por ejemplo, se pueden usar tiras de flujo lateral para pruebas de biomarcadores, pruebas de glucosa en sangre, pruebas metabólicas (tal como la hormona estimulante de la tiroides), análisis de gases y electrolitos en sangre, pruebas de coagulación rápida, diagnóstico rápido de marcadores cardíacos, detección de drogas de abuso, pruebas de orina, prueba de embarazo, análisis de sangre oculta en heces, detección de patógenos alimentarios, recuento sanguíneo completo, diagnóstico de hemoglobina, pruebas de enfermedades infecciosas (por ejemplo, una prueba de diagnóstico rápido de múltiples analitos para detectar infección por malaria), detección de colesterol y pruebas hormonales.
- En algunas realizaciones, el analito puede ser un biomarcador. Un biomarcador puede ser un fármaco o metabolito de fármaco, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un hapteno, una proteína o péptido, un aminoácido, un receptor, un esteroide, una vitamina, un antibiótico, un azúcar, una hormona, un antígeno, un ácido nucleico tal como ARN o ADN, un carbohidrato, una glicoproteína, un lípido, un polisacárido, un proteoglicano, un marcador específico de tejido, un marcador específico de célula o tipo celular, un metabolito, un virus o un marcador viral, una bacteria o un marcador bacteriano, un hongo o un marcador fúngico, una toxina, un alérgeno, etc.
- En algunas realizaciones, el biomarcador es un biomarcador usado para el diagnóstico de cáncer o la evaluación de función cardíaca.
- En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser, por ejemplo, un receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), PSA, EphA2, proteína HER-2, EGFR, KRAS, UGT1A1, EML4, AL IDH1, AFP, CEA, BCR-ABL, CEBPA, FLT3, KIT, NPM1, PML-RAR α , CD20, JAK2, CD25, BRAF, NMP22, CA-125, HE4, HGF, CK-MB, LDH, TGF- β AST, Mb, IMA, BNP o MET.
- Se pueden seleccionar porciones de captura y detección apropiadas basándose en el analito o analitos que se van a cuantificar. En algunas realizaciones, las porciones de captura y detección son anticuerpos, aptámeros, epítopos, ácidos nucleicos y/o polímeros de impresión molecular.
- En algunas realizaciones, las tiras de flujo lateral pueden adaptarse para la detección de una pluralidad de analitos en una sola muestra. Esto se puede lograr incluyendo múltiples conjugados que tienen porciones de detección para los diferentes analitos y las múltiples porciones de captura correspondientes. Cada conjugado incluye diferentes nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas que emiten diferentes colores. La figura 5 muestra una tira de flujo lateral adaptada para detectar y cuantificar PSA y EphA2 simultáneamente en un ensayo multiplexado. La detección y cuantificación de múltiples analitos en una sola muestra puede ser de particular interés en el diagnóstico temprano de cáncer, donde es útil someter a prueba la presencia de una pluralidad de biomarcadores que son indicativos de células malignas.
- Normalmente, la muestra es una muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra es un fluido corporal, tal como orina, sudor, sangre, bilis, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo, linfa, esputo, líquido sinovial, lágrimas, fluido peritoneal, fluido pleural, moco o cualquier combinación de los mismos. La muestra puede aplicarse a la tira de flujo lateral en forma de líquido, pero alternativamente se puede aplicar como un gas. El gas puede ser el aliento.
- El material huésped es un fluoruro alcalino, un óxido o un oxisulfuro. Los materiales huésped adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoruros alcalinos, tal como NaGdF₄, Ca₂F, NaYF₄, LiYF₄, NaLuF₄ y LiLuF₄, KMnF₃, y óxidos, tales como Y₂O₃. También se contemplan mezclas de estos materiales. En una realización, el material huésped es NaYF₄. Cuando las partículas son cristalinas, el NaYF₄ puede ser una fase hexagonal, o cualquier otra fase cristalina.
- En otras realizaciones, el sensibilizador, el activador y el material huésped están protegidos contra agentes de desactivación de superficie por una cubierta, de modo que las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas son partículas de núcleo-cubierta en las que el núcleo comprende el activador, el sensibilizador y el material huésped, y la cubierta comprende, o consiste en, un material que evita, retarda o inhibe la desactivación de superficie. La cubierta puede encapsular parcial o completamente el núcleo. Preferiblemente, la cubierta comprende o consiste en el mismo material que el material huésped, pero sin los dopantes metálicos de tierras raras. En el caso de cristales, esto evita la necesidad de coincidencia de fase.
- En algunas realizaciones, las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas son 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄, 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF₄ o 40 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄.
- El método también incluye la provisión de un dispositivo de prueba para la tira de flujo lateral. El dispositivo de prueba incluye la fuente de luz de excitación, que produce un haz de luz para provocar una señal detectable de las

nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas, y puede incluir óptica de captación para enfocar el haz y la señal detectable. La fuente de luz de excitación puede ser cualquier fuente de luz que sea capaz de provocar una señal detectable desde las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas. En algunas realizaciones, la fuente de luz de excitación es un diodo láser o una fuente de luz de IR cercano, tal como una fuente de luz de LED de IR cercano. La señal detectable puede ser luz visible o luz infrarroja.

5 El dispositivo de prueba puede adaptarse para su uso con un detector, tal como, por ejemplo, una cámara o un detector de elemento único. En algunas realizaciones, el detector es una cámara de teléfono inteligente.

10 El haz de luz puede tener una densidad de potencia de al menos aproximadamente 0,001 MW/cm².

En algunas realizaciones, el área irradiada puede ser de entre aproximadamente 1 μm² y aproximadamente 10000000 μm². La irradiación de un área pequeña de la tira de flujo lateral puede servir para minimizar la dispersión de luz y/o la autofluorescencia y, por lo tanto, optimizar la sensibilidad al analizar pequeños volúmenes de muestra.

15 La figura 5 muestra un dispositivo de prueba que puede usarse en el método de la invención. En esta realización, se proporciona un alojamiento de plástico impreso en 3D que encierra un diodo láser de bajo coste de 980 nm y óptica de captación. La óptica de captación incluye un par de lentes hemisféricas, una interpuesta entre el diodo láser y la tira de flujo lateral, y la otra interpuesta entre la tira de flujo lateral y el detector. También se incluye vidrio absorbente de calor KG-3 que actúa como un filtro de paso corto para eliminar la dispersión de láser. El alojamiento también puede incluir una abertura (no mostrada) a través de la cual se puede insertar la tira de flujo lateral. Convenientemente, este dispositivo de prueba se puede producir por menos de 100 A\$. Se usa un teléfono inteligente como detector ya que la emisión desde las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas es de suficiente brillo para detectarse por una cámara. Como tal, no se requiere un detector de recuento de fotón único costoso lo que reduce sustancialmente el coste de una simplicidad de realización del método.

20 La cantidad del al menos un analito en la muestra puede determinarse ajustando la intensidad de la imagen capturada por el detector con una curva de intensidad-concentración preestablecida para el analito. Vídeos de una serie de imágenes que registran la intensidad de la señal detectable por encima del área de prueba, el área de fondo y el área de control pueden transferirse desde el teléfono inteligente a un ordenador para su análisis adicional utilizando el software MATLAB. La intensidad de cada imagen se calcula sumando las intensidades de cada píxel desde el canal de color correspondiente que luego se promedia adicionalmente a partir de al menos tres fotogramas en ese grupo. Este proceso de análisis de datos puede programarse en una aplicación para que los teléfonos inteligentes puedan informar directamente de la concentración de analito basándose en la intensidad de cada imagen.

35 Ejemplos

40 En los siguientes ejemplos, las nanopartículas de conversión ascendente (UCNP) altamente dopadas con iones Er³⁺ para emitir emisiones de conversión ascendente amarillentas y los iones Tm³⁺ para emitir emisiones de conversión ascendente moradas se aplicaron como indicadores de múltiples colores en tiras de flujo lateral (LPS). Se imprimió un soporte de plástico que alinea un diodo láser de excitación de bajo coste y óptica de captación. Se apreciará que el haz de excitación puede enfocarse de manera estrecha para iluminar específicamente una pequeña región en el sustrato de papel, que desbloquea el brillo de las UCNP altamente dopadas, permitiendo que proporcionen detección de alta sensibilidad usando pequeños volúmenes de muestras. Como se demuestra a continuación, las UCNP altamente dopadas proporcionan un brillo significativamente mayor en comparación con las UCNP convencionales, permitiendo la detección sensible en un ensayo multiplexado cuantitativo sin interferencia.

1. Síntesis de UCNP

50 Nanocristales de NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺/Tm³⁺ con diferentes niveles de dopaje (2 % de Er/20 % de Yb (no según la invención), 8 % de Er/60 % de Yb, 0,5 % de Tm/20 % de Yb (no según la invención) y 8 % de Tm/60 % de Yb) se sintetizaron como se describe en el documento de Jin *et al.* Nature Communications 2018, 9 3290. En un experimento típico, se añadió 1 mmol de RECl₃•6H₂O (RE = Y, Yb, Tm) con la relación molar deseada a un matraz que contenía 6 ml de OA y 15 ml de ODE. La mezcla se calentó a 160 °C bajo flujo de argón durante 30 min para obtener una disolución clara y luego se enfrió a aproximadamente 50 °C. Se añadieron después 5 ml de disolución de metanol de NH₄F (4 mmol) y NaOH (2,5 mmol) y la disolución se agitó durante 30 min. La mezcla se calentó a 150 °C bajo flujo de argón durante 20 min para expulsar metanol, y luego se calentó adicionalmente a 310 °C durante otros 90 min. Finalmente, la disolución de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Los productos se precipitaron usando etanol, se centrifugaron a 9000 r. p. m. durante 5 min, y se lavaron 3 veces con ciclohexano, etanol y metanol para obtener las nanopartículas.

60 Se empleó crecimiento epitaxial capa por capa para producir nanopartículas que tienen una estructura de núcleo-cubierta. El procedimiento para preparar precursores de cubierta es similar al procedimiento usado con respecto a las nanopartículas de núcleo, hasta la etapa en la que la disolución de reacción se calienta lentamente a 150 °C y se mantiene durante 20 min. En lugar de calentar adicionalmente a 300 °C para desencadenar el crecimiento de nanocristales, la disolución se enfrió a temperatura ambiente. En esas condiciones, se produjeron los precursores de

cubierta. Para el crecimiento epitaxial, se añadieron 0,15 mmol de nanocristales de núcleo preparados de ese modo a 6 ml de OA y 6 ml de ODE. La mezcla se calentó a 170 °C en atmósfera de argón durante 30 min, y luego se calentó adicionalmente a 300 °C. A continuación, se inyectaron 0,25 ml de precursores de cubierta preparados de ese modo en la mezcla de reacción y se maduraron a 300 °C durante 4 min. Los mismos ciclos de inyección y maduración se realizaron varias veces para obtener nanocristales que tenían el tamaño deseado. Finalmente, la suspensión se enfrió a temperatura ambiente y los nanocristales formados se purificaron usando el mismo procedimiento que se usó para obtener los nanocristales de núcleo.

2. Bioconjugación de UCNP con anticuerpos

El intercambio de ligandos se usó para convertir las UCNP recubiertas con OA en productos recubiertos con cPEG (polietilenglicol modificado con un grupo carboxilo). Se precipitaron 1,5 ml de 20 mg/ml de UCNP en ciclohexano usando etanol, y después de la centrifugación, las UCNP se dispersaron de nuevo en 3 ml de THF mediante agitación de vórtice y sonicación. Luego se añadieron 1,5 ml de 200 mg de cPEG en disolución de THF, y la disolución mezclada se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se añadieron 3 ml de agua MiliQ y se mezcló con agitación. La disolución se extrajo luego usando 1 ml de hexano para retirar las moléculas de OA. Después de retirar la fase oleosa, la disolución se colocó al vacío durante la noche para evaporar los disolventes orgánicos. La disolución se dializó luego en 1 l de agua MiliQ durante 24 h para retirar el exceso de PEG.

Después de la conversión, las cPEG-UCNP se cambiaron a tampón MES (pH 4,5) usando centrifugación hasta una concentración final de 1 mg/ml. Se mezclaron 10 µl de cPEG-UCNP, 100 µg de EDC y 100 µg de NHS en 90 µl de tampón MES (pH 4,5). Después de 2 h de agitación suave, la muestra se lavó con el tampón MES dos veces (centrifugado a 14.000 r. p. m. durante 20 min). Después de la etapa final de centrifugación, el precipitado se suspendió en tampón MES 50 µl. Después, la disolución se mezcló con 50 µl de anticuerpo IgG (0,1 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-PSA producido en conejo/anticuerpo monoclonal anti-EphA2 producido en conejo; Sigma) y se incubaron en un agitador a 37 °C durante la noche. Después de dos lavados con tampón MES (centrifugado a 14.000 r. p. m. durante 20 min), la muestra se suspendió en 100 µl de tampón MES y se sometió a sonicación durante 5 s.

3. Caracterización de TEM

UCNP de 2 % de Er/20 % de Yb (no según la invención), 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄, 0,5 % de Tm/20 % de Yb (no según la invención) y 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF₄ se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión. Como se muestra en la figura 1, las UCNP fueron altamente uniformes.

4. Espectro de absorción de UV y dispersión de luz dinámica

Se usó un Nanodrop2000 para determinar el espectro de absorción de UV de las UCNP recubiertas con cPEG y las UCNP conjugadas con IgG para confirmar que los anticuerpos se conjugaron con la superficie de las UCNP (figura 2).

Se usó dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar la distribución de tamaños de cada muestra en el tampón MES (pH 6,8). Los resultados también confirmaron la presencia de IgG sobre las superficies de las UCNP (tabla 1).

Tabla 1

	cPEG-UCNP	IgG-cPEG-UCNP
2 % de Er/20 % de Yb (no según la invención)	50,6 nm	64,4 nm
8 % de Er/60 % de Yb	58,1 nm	75,1 nm
0,5 % de Tm/20 % de Yb (no según la invención)	52,4 nm	66,8 nm
8 % de Tm/60 % de Yb	60,4 nm	76,2 nm

5. Espectros dependientes de potencia

6. Fabricación de tira a base de papel

La estructura de tira comprende una almohadilla trasera de PVC adhesiva, una membrana de nitrocelulosa (membrana FF120HP, GE Life Science), una almohadilla de muestra (CF4, GE Life Science) y una almohadilla absorbente (CF5, GE Life Science). La almohadilla de muestra, la membrana de nitrocelulosa y la almohadilla absorbente se montaron en la almohadilla trasera de PVC con una superposición de 2 mm. Las almohadillas ensambladas se cortaron para dar tiras que tenían una anchura de 3 mm. El área de prueba y el área de control se recubrieron por separado con 0,5 µl de 0,2 mg/ml de anticuerpos polyclonales anti-PSA/EphA2 producidos en ratón (Sigma) y 0,5 µl de 2 mg/ml de anticuerpos anti-IgG de conejo (Sigma) y se incubaron durante la noche a menos de 4 °C.

7. Ensayo de detección de diana de tira de flujo lateral

Los indicadores de UCNP se transfirieron a un tampón de trabajo (tampón MES de pH 6,8, tween 20 al 0,5 % p/v, BSA al 1 % p/v). Después de la mezcla, se aplicaron disoluciones de muestra con indicadores de UCNP a la almohadilla de muestra de la tira. Después de 10 min, se añadió tampón de lavado (tampón MES de pH 6,8, tween 20 al 0,5 % p/v) a la almohadilla de muestra. Después de 20 min, la tira fue detectada por el lector.

8. Sistema de prueba de tira basado en detector de avalancha de fotón único

10 Para leer la señal de emisión de los indicadores de UCNP sobre las tiras, se construyó un sistema confocal de barrido especialmente construido (figura 4). Se usó un láser de 976 nm para excitar las UCNP, con una unidad de control de potencia construida internamente que incluye una placa de media onda y un polarizador. La emisión de las UCNP se captó por una lente objetivo (60X, NA 0,85 Edmund), y luego se enfocó por una lente de tubo a una fibra óptica, que estaba vinculada a un detector de avalancha de fotón único (SPAD). El movimiento x-y de la platina se usó para leer 10 puntos diferentes de un área de prueba.

9. Cálculo de LOD

20 Se usaron métodos 3σ para calcular el LOD del sistema de prueba de tira. El ruido N = fondo + 3 D. E. (del inglés, *standard deviation SD*) (fondo) y el ajuste lineal de S/N se establecieron con concentraciones diana. El LOD es la concentración cuando S/N = 1.

Ejemplo 1

25 Para obtener UCNP más pequeñas y brillantes, se sintetizaron dos tipos de UCNP pasivadas con cubierta inerte altamente dopadas con Er³⁺ y Tm³⁺ (es decir, 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF₄ y 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF₄), y su rendimiento se evaluó frente a otras UCNP del mismo tamaño y no según la invención (es decir, 2 % de Er/20 % de Yb y 0,5 % de Tm/20 % de Yb). El intercambio de ligandos se usó para modificar las superficies de las UCNP con grupos carboxilo, seguido de una técnica de EDC/NHS para conjugar anticuerpos. La uniformidad de cada muestra de UCNP se confirmó mediante caracterización TEM (figuras 1, 5B y 5C). La conjugación exitosa de anticuerpos se confirmó mediante espectros de absorción de UV que tienen una apariencia de pico característico a 280 nm (figura 2), y por dispersión de luz dinámica que reveló un ligero aumento de tamaño (tabla 1).

35 Las propiedades dependientes de potencia de los indicadores de UCNP preparados de ese modo se sometieron a prueba con respecto a sus intensidades de emisión y perfiles de espectro usando un sistema de caracterización de única nanopartícula (Wang *et al.* (2018) *Light Sci & Amp Appl* 2018; 7, 18007). Con el aumento de densidad de potencia de excitación, el brillo de las UCNP altamente dopadas aumentó más sustancialmente que las UCNP menos dopadas, que no son según la invención (figura 6A). Las relaciones de potenciación del brillo de emisión para las UCNP dopadas altamente con Er³⁺ y Tm³⁺ fueron 5 veces y 12 veces mayores que las de las UCNP menos dopadas cuando la potencia excede 0,5 MW/cm². Como se muestra en la figura 6B, el espectro de emisión de indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ emite sustancialmente más rojo a alrededor de 650 nm bajo mayor potencia de excitación, dando como resultado una emisión amarillenta brillante. Este efecto de mezcla de pintura también se produce en los indicadores de UCNP altamente dopadas con Tm³⁺, con apariencia en morado desde la cámara de teléfono (los perfiles de espectro dependientes de potencia de los indicadores de UCNP menos dopadas se muestran en la figura 3).

Ejemplo 2

50 Los indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ se compararon con las UCNP menos dopadas detectando diferentes concentraciones de PSA diana sobre tiras de flujo lateral. A una densidad de potencia de excitación de 0,5 MW/cm², las señales desde el área de prueba y el área de fondo se registraron mediante un detector de recuento de fotón único. Como se muestra en la figura 6D, la señal desde los indicadores de UCNP altamente dopadas fue mucho mayor que la señal desde las UCNP menos dopadas, y la relación de potenciación de brillo fue consistente con los resultados de caracterización de nanopartícula individual. A pesar de la diferencia de brillo, ambos indicadores muestran el mismo límite de detección de PSA (LOD) de 50 pg/ml. Solo los indicadores de UCNP altamente dopadas proporcionan suficiente brillo para una cámara de teléfono normal.

Ejemplo 3

60 Se construyó un dispositivo compacto encerrado por un pequeño alojamiento impreso en 3D como se muestra en la figura 5A y la figura 7A. El dispositivo usó un diodo láser de 300 mw de 980 nm como fuente de luz, dos lentes hemisféricas (una para enfocar el haz de luz de excitación a la tira y la otra para captar la señal de emisión a la cámara de teléfono) y un vidrio absorbente de calor KG-3 de bajo coste como filtro de paso corto para eliminar la dispersión láser. La respuestapectral de la cámara de teléfono CMOS (Sony IMX-214) y la curva de transmisión del vidrio KG-3 indica que la cámara de teléfono puede leer la mayoría de las señales de emisión visibles de los indicadores de UCNP altamente dopadas con solo una cantidad insignificante de luz de dispersión de excitación detectada (figura 7B).

Con fines de demostración, la configuración de la óptica y de la cámara fueron fijas, pero la tira se movió de un lado a otro a una velocidad constante de modo que los valores promedio de intensidad de fluorescencia del área de prueba, el área de control y el área de fondo podrían extraerse de los análisis de vídeo (figura 7C). Con referencia a la figura 7D,

5 los indicadores de UCNP altamente dopadas proporcionaron señales detectables cuando la concentración diana era baja, mientras que las UCNP menos dopadas no lo hicieron. El LOD para PSA usando indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ fue de 61 pg/ml, mientras que el LOD usando las UCNP menos dopadas fue 8,5 ng/ml.

Ejemplo 4

- 10 A continuación, se usaron indicadores de UCNP altamente dopadas con Er³⁺ y Tm³⁺ en una sola tira para pruebas simultáneas de analitos diana de PSA y EphA2. Para este fin, las UCNP altamente dopadas con Er³⁺ se modificaron con anticuerpos anti-PSA, y las UCNP altamente dopadas con Tm³⁺ se modificaron con anticuerpos anti-EphA2. La figura 8A muestra los resultados de someter a prueba dos dianas. Los colores amarillo y morado indican la presencia de PSA y EphA2, respectivamente, y el brillo aumenta con el aumento de la concentración diana. El sistema de LFS de dos colores logró un LOD de 89 pg/ml para PSA (figura 8B), demostrando que el sistema mantiene la alta sensibilidad que se logró a partir del sistema de un único color. El LOD para EphA2 fue de 400 pg/ml (figura 8C). Como la energía de emisión de indicadores de UCNP altamente dopadas con Tm³⁺ es de alrededor de 800 nm (figura 6C), que está más allá del rango de la óptica de detección y la cámara de teléfono (figura 7B), la intensidad de señal es menor. La especificidad de un sistema de LFS de dos colores se evaluó adicionalmente sometiendo a prueba dos dianas, PSA y EphA2 por separado, con BSA como analito de interferencia. En comparación con los grupos de control, todos los grupos positivos mostraron una intensidad mucho mayor. Los resultados indican que hay interacciones cruzadas insignificantes.
- 15
- 20
- 25 Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, los expertos en la técnica apreciarán que la invención puede realizarse de muchas otras formas que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la cantidad de al menos un analito en una muestra, comprendiendo el método:
 5 proporcionar una tira de flujo lateral que comprende una porción de captura y un conjugado que comprende una porción de detección capaz de unir el al menos un analito y nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas para visualizar la interacción del al menos un analito y la porción de captura;
- 10 aplicar la muestra a la tira de flujo lateral de manera que el conjugado se une al analito para proporcionar un analito unido que posteriormente se captura por la porción de captura;
- 15 proporcionar un dispositivo de prueba que comprende una fuente de luz de excitación configurada para provocar una señal detectable desde las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas y un detector para capturar la señal detectable, siendo el dispositivo de prueba capaz de recibir la tira de flujo lateral;
- 20 insertar la tira de flujo lateral a la que se ha aplicado la muestra en el interior del dispositivo de prueba;
- 25 irradiar un área de la tira de flujo lateral que comprende las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas con un haz de luz para provocar una señal detectable desde las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas; y
- 30 detectar la señal detectable y determinar la cantidad del al menos un analito en la muestra basándose en la señal detectable,
- 35 2. Método según la reivindicación 1, en el que el material huésped es un fluoruro alcalino, un óxido o un oxisulfuro, preferiblemente NaGdF_4 , Ca_2F , NaYF_4 , LiYF_4 , NaLuF_4 , LiLuF_4 , KMnF_3 o Y_2O_3 , incluyendo combinaciones de los mismos, más preferiblemente NaYF_4 .
- 40 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas están pasivadas con cubierta inerte.
- 45 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las nanopartículas de conversión ascendente altamente dopadas son 8 % de Er/60 % de Yb@NaYF_4 , 8 % de Tm/60 % de Yb@NaYF_4 o 40 % de Er/60 % de Yb@NaYF_4 .
- 50 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la porción de captura y/o la porción de detección incluyen uno o más de: un anticuerpo, un aptámero, un epítopo, un ácido nucleico o un polímero de impresión molecular.
- 55 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el dispositivo de prueba comprende además una lente o una matriz de lentes interpuestas entre la fuente de luz de excitación y la tira de flujo lateral para así enfocar el haz de luz sobre la tira de flujo lateral, o en el que el dispositivo de prueba comprende además una lente o una matriz de lentes interpuestas entre la tira de flujo lateral y el detector para así enfocar la señal sobre el detector.
- 60 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el detector es una cámara, o un detector de elemento único, preferiblemente una cámara de teléfono inteligente.
- 65 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la señal detectable es luz visible o luz infrarroja, y la fuente de luz de excitación es un diodo láser o una fuente de IR cercano.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el haz de luz tiene una densidad de potencia de al menos aproximadamente $0,001 \text{ MW/cm}^2$.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el área irradiada está entre aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$ y aproximadamente $10.000.000 \mu\text{m}^2$.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra es una muestra biológica, preferiblemente un fluido corporal.

ES 2 992 503 T3

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la cantidad del al menos un analito en la muestra puede determinarse ajustando la intensidad de una imagen capturada por el detector con una curva de intensidad-concentración preestablecida para el analito.

5

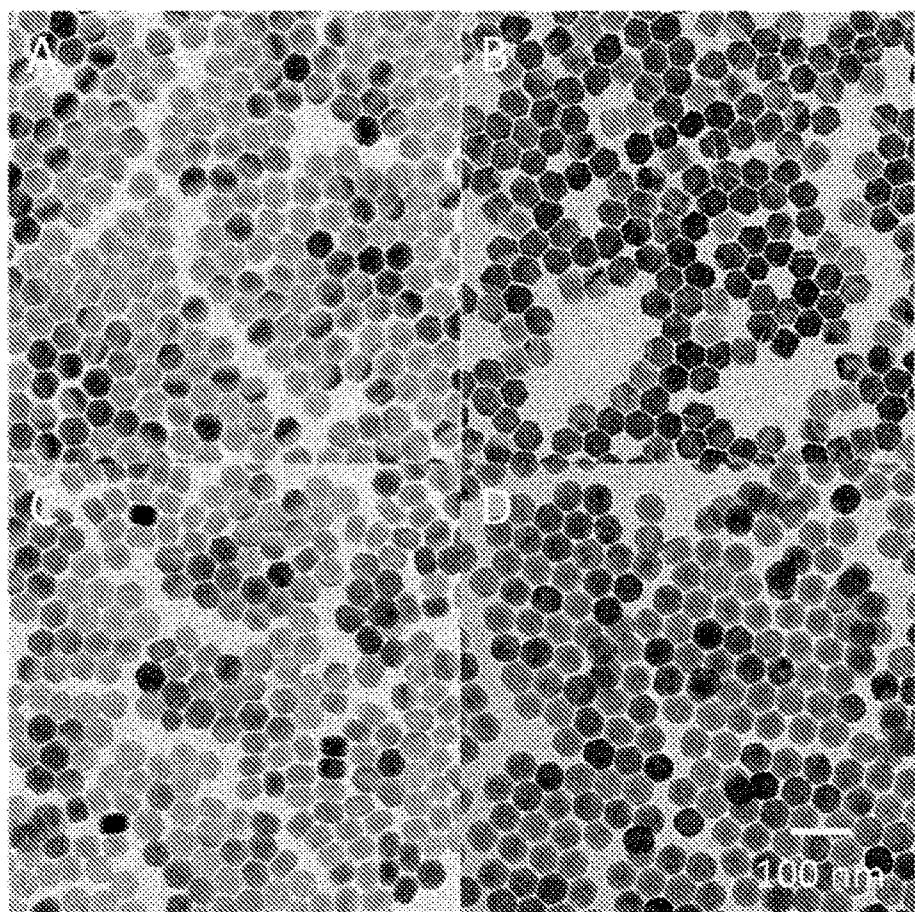


FIGURA 1

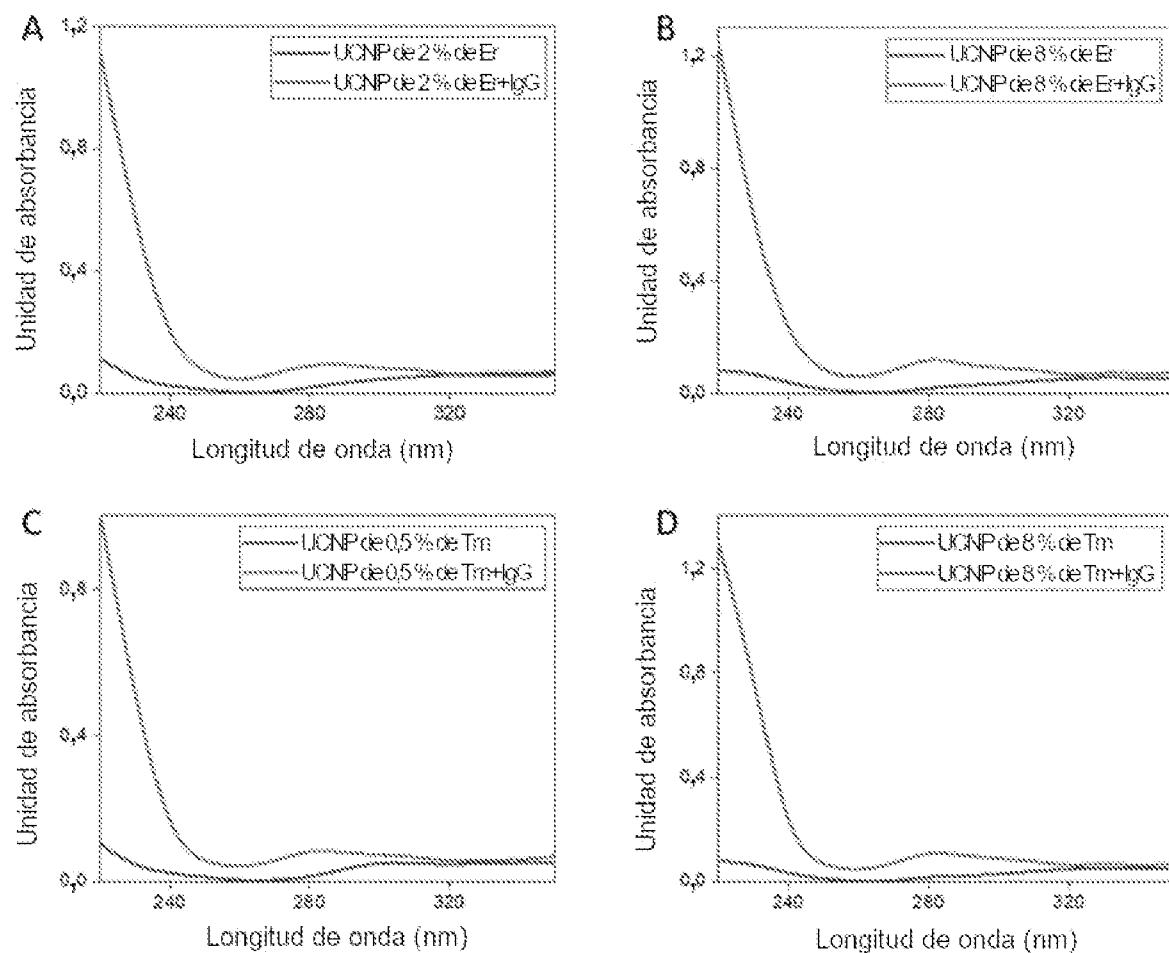


FIGURA 2 (Figuras 2A y 2C no son según la invención)

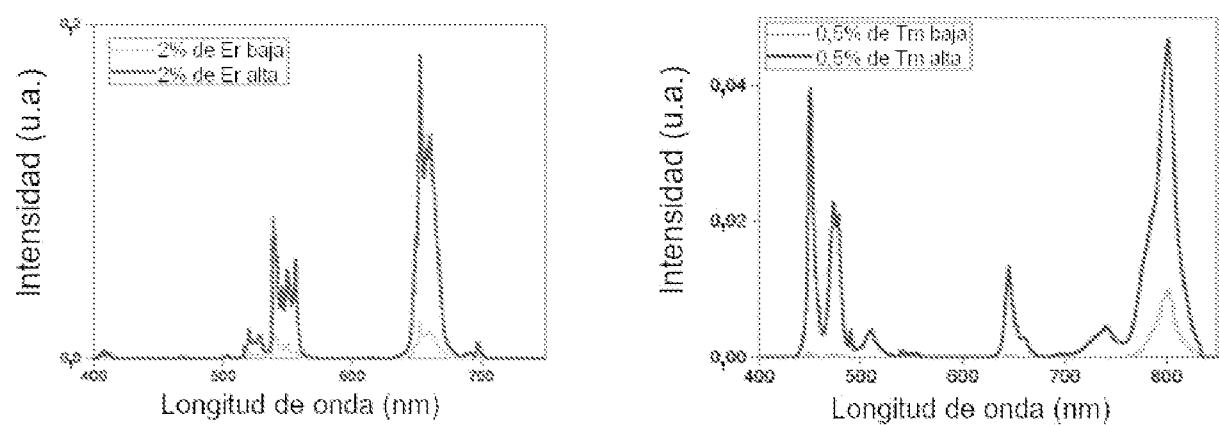


FIGURA 3 (no según la invención)

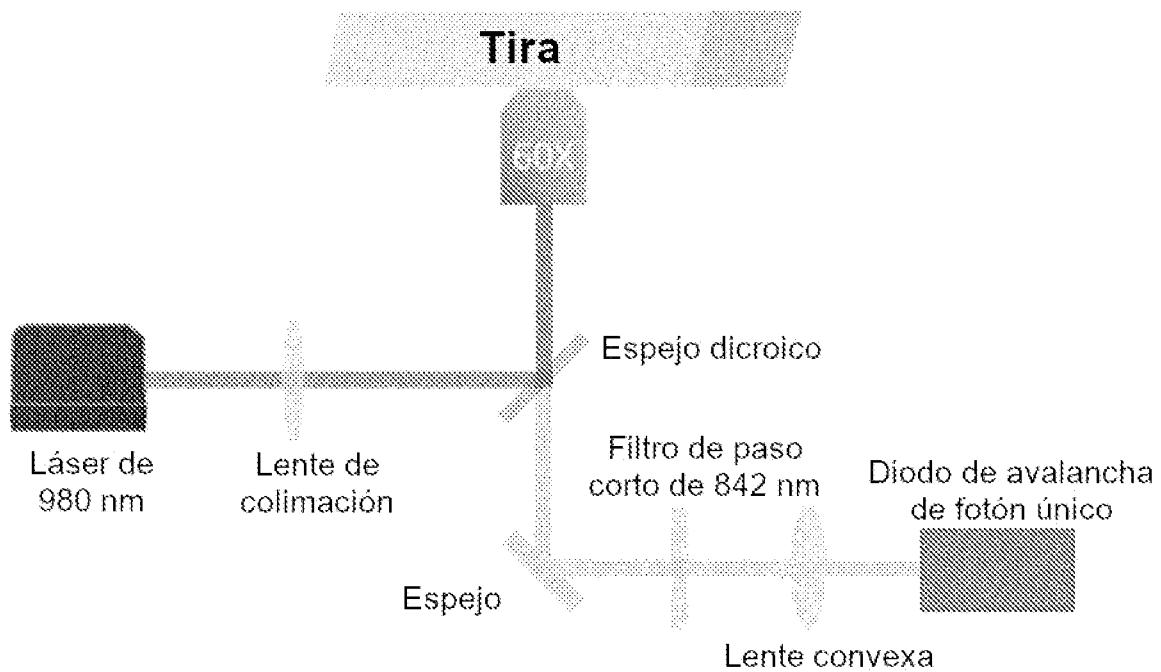
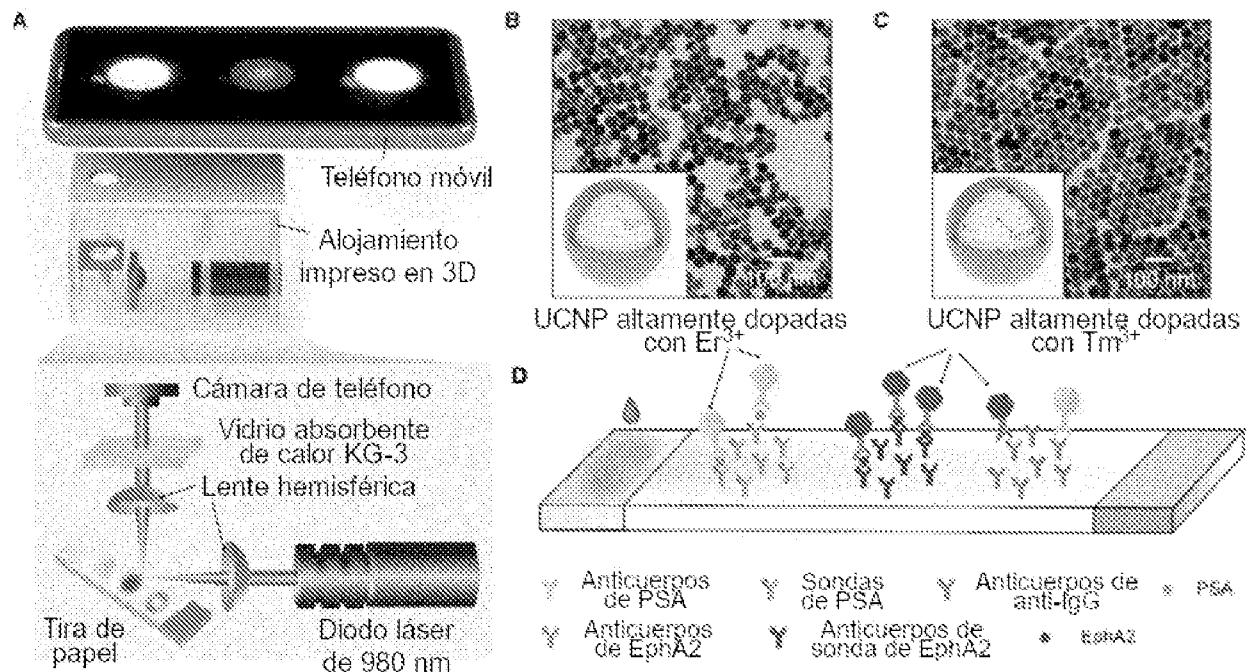
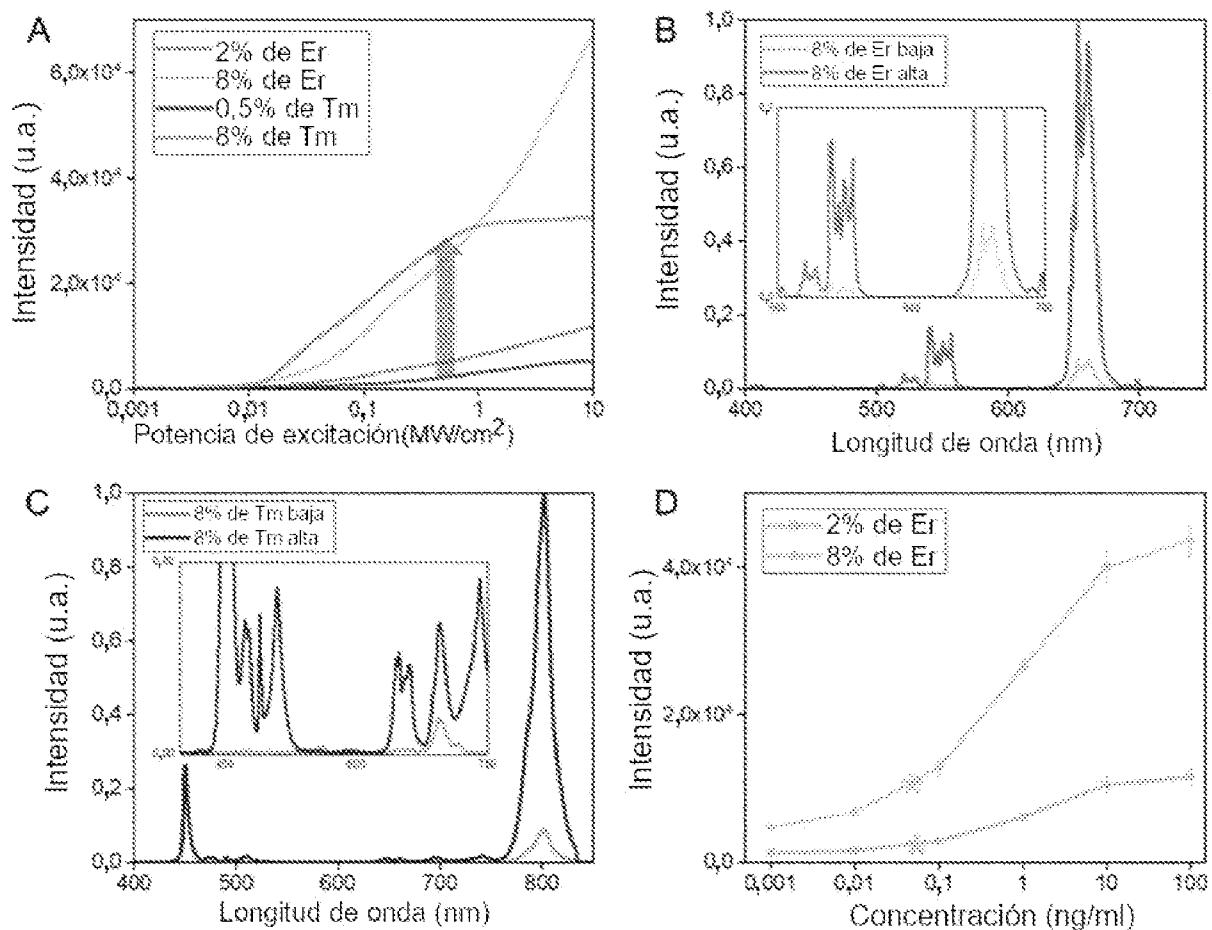


FIGURA 4

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

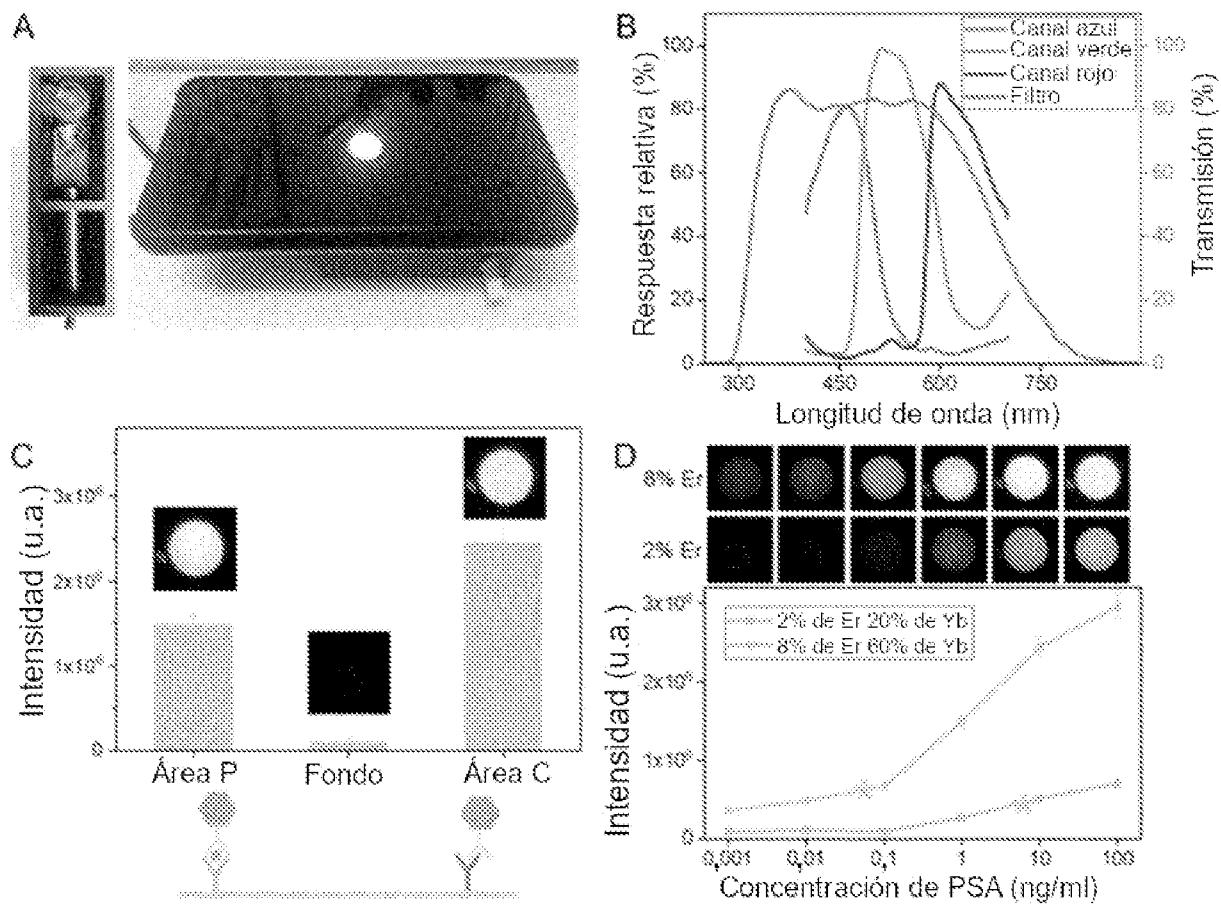


FIGURA 7

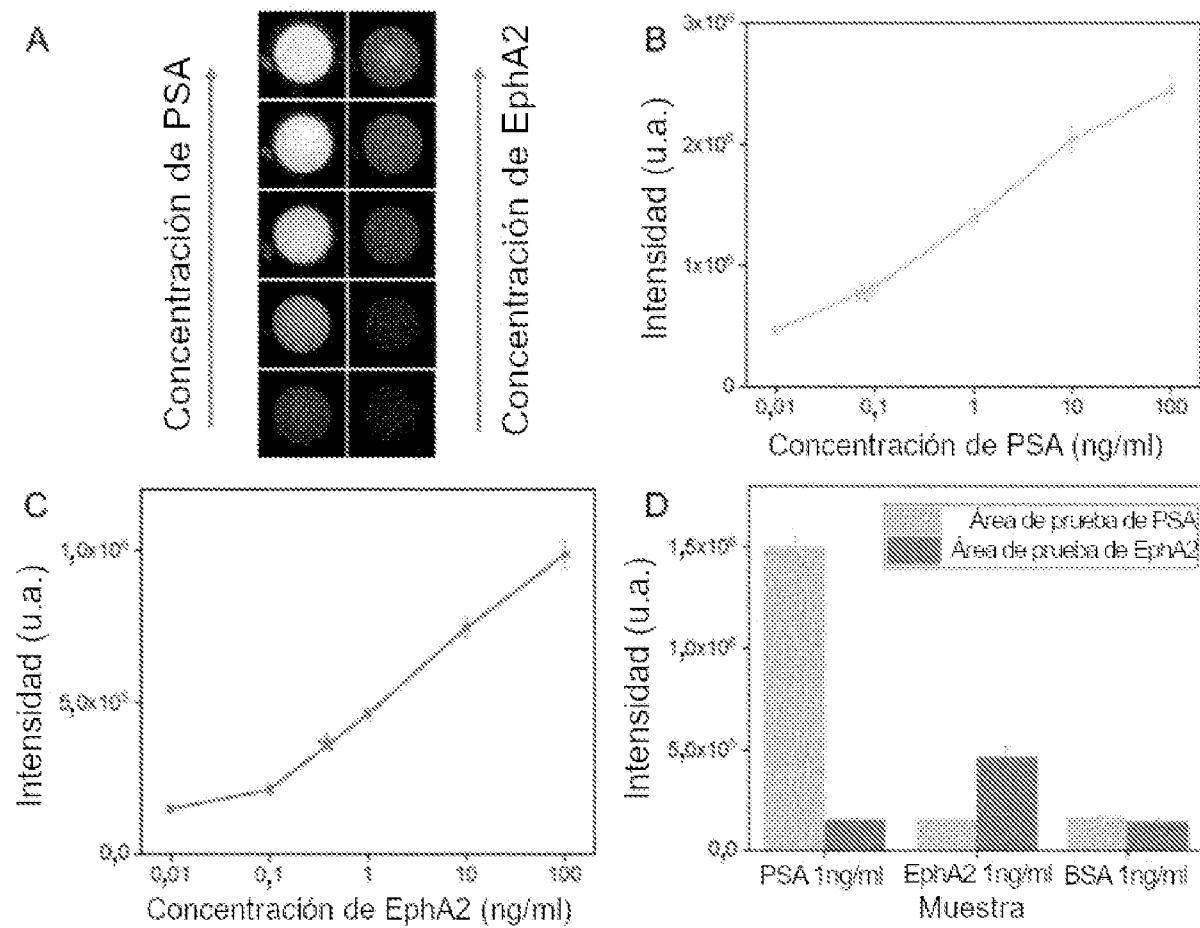


FIGURA 8