



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0809138-2 B1



(22) Data do Depósito: 20/03/2008

(45) Data de Concessão: 02/07/2019

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU QUANTIDADE DE UM OU MAIS ANALITOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA

(51) Int.Cl.: G01N 33/58; G01N 33/543; G01N 21/65.

(30) Prioridade Unionista: 14/12/2007 US 61/013.740; 20/03/2007 US 60/895.807; 28/09/2007 US 60/976.015.

(73) Titular(es): BECTON, DICKINSON AND COMPANY.

(72) Inventor(es): KRISTIN WEIDEMAIER; CHRISTIAN SANDMANN; W. SHANNON DILLMORE; JAMES L. SCHRAM; W. WILLIAM STEWART; ROBERT E. PEARSON; HELEN HSIEH; STEVEN KEITH; RAJENDRA R. BHAT; ANDREA LIEBMANN-VINSON; ADAM CRAIG CURRY; ALEXANDER G. LASTOVICH.

(86) Pedido PCT: PCT US2008057700 de 20/03/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/116093 de 25/09/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/09/2009

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU QUANTIDADE DE UM OU MAIS ANALITOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA Aqui são revelados ensaios diagnósticos utilizando partículas ativas espectroscopia Raman aumentada pela superfície (SERS), incluindo ensaios baseados em líquido; ensaios de captura magnéticas; estruturas satélites de micropartículas-nanopartículas para amplificação de sinal em um ensaio; partículas ativas composto SERS úteis para detecção aumentada de alvos; e tubos de amostras e processos para uso dos mesmos.

“MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA OU QUANTIDADE DE UM OU MAIS ANALITOS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA”

CAMPO TÉCNICO

[001]A matéria presentemente revelada relaciona-se a ensaios diagnósticos utilizando partículas ativas – Espectroscopia Raman Aumentada pela Superfície (SERS), incluindo ensaios baseados em líquidos; ensaios de captura magnética; estruturas satélites micropartícula-nanopartícula para amplificação de sinal em um ensaio; partículas ativas – composto SERS úteis para detecção aumentada de alvos; e tubos de amostras e processos para uso dos mesmos.

ANTECEDENTE

[002]Várias técnicas têm sido desenvolvidas para detectar a presença de um ou mais analitos em um ensaio. Por exemplo, técnicas fluorescentes, luminescentes, quimioluminescentes ou eletroquimioluminescentes têm sido utilizadas para detectar analitos dentro de uma amostra biológica. Em muitos ensaios biológicos, incluindo ensaios onde micro- ou nanopartículas são utilizadas para detectar a presença e/ou quantidade de um ou mais analitos em uma amostra biológica, a geração de um evento sinalizante é utilizado para detectar a presença do analito. Tais ensaios biológicos conhecidos na técnica, entretanto, têm limitações. Então, pode ser vantajoso prover um ensaio tendo uma ou mais características, incluindo, mas não limitados à, sensibilidade aumentada, especificidade, acurácia, repetibilidade, e combinações dos mesmos.

BREVE RESUMO

[003]Em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê ensaios baseados em líquido incluindo partículas de captura magnéticas tendo ligadas à elas nanopartículas ativas – SERS, também tendo ligadas à elas um membro de ligação tendo uma afinidade para o mesmo ou mais analitos de interesse. Quando em contato com uma amostra biológica contendo um ou mais analitos, um complexo partícula – analito – SERS - nanopartícula partícula é

formado. As propriedades magnéticas das partículas de captura magnéticas podem ser utilizadas para localizar o complexo partícula – analito – SERS – nanopartícula ativa em uma área pré-determinada dentro de um recipiente de ensaio para detectar o sinal SERS.

[004]Em outras modalidades, a matéria presentemente revelada provê um ensaio baseado em captura magnética / líquido incorporando um padrão de referência. Em tais modalidades, partículas magnéticas utilizadas para a força magnética são marcadas com um marcador de referência capaz de produzir um sinal detectável, em adição ao membro de ligação específico para o analito de interesse. O sinal emitido pela nanopartícula ativa – SERS do complexo partícula – analito – SERS – nanopartícula ativa pode ser referenciado àquele marcador de referência ligado à partícula de captura magnética para compensar variações no tamanho do concentrado, forma ou posicionamento.

[005]Em uma modalidade adicional, um reagente de lise pode ser utilizado em um ensaio, tal como um ensaio baseado em líquido, com ou sem força magnética. O uso de um reagente de lise pode prover um sinal aumentado e/ou limite melhorado de detecção para analitos de interesse, por exemplo, em matrizes biológicas, tais como sangue humano, plasma, ou soro, ou em células.

[006]Em ainda outra modalidade, um método para amplificar um sinal em um ensaio baseado em líquido é provido. Tais métodos incluem adição de uma segunda alíquota de uma molécula repórter tendo as mesmas capacidades produtoras de sinal como a molécula repórter, por exemplo, uma nanopartícula ativa – SERS, já presente na solução do ensaio antes de complexos de captura magnéticos são localizados. Esta segunda alíquota da molécula repórter tem ligada a ela um ou mais membros de ligação tendo uma afinidade para o membro de ligação da molécula repórter presente na solução de ensaio. A segunda molécula repórter assim pode se

ligar à primeira molécula repórter, resultando em um sinal maior por complexo partícula de captura magnética – analito – molécula repórter.

[007]Em outras modalidades, métodos para melhorar o espectro de referência Raman e análises espectrais em ensaios baseados em captura magnética/líquido são providos. Em uma modalidade, o espectro de referência de um ou mais analitos de interesse são obtidos com o analito revelado em um concentrado magnetizado, como oposto para uso de espectro de referência do analito obtido em solução. Em outra modalidade, métodos são providos para melhorar a análise espectral SERS, incluindo seleção da região do comprimento de onda dentro do qual a análise é feita e selecionando os componentes do procedimento ajustados de espectro, por exemplo, mínimos quadrados se encaixando à técnica, baseados em resultados a partir de uma análise inicial.

[008]Em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê compostos nanoestruturas, incluindo um composto estrutura, referido aqui como uma estrutura “satélite”, compreendendo uma pluralidade de partículas dando sinais, por exemplo, nanopartículas, ligadas a uma partícula núcleo. Em outras modalidades, um composto estrutura, referido aqui como estrutura “envoltório-núcleo”, que inclui uma partícula núcleo, um material ativo, tal como um material ativo – Raman, envolvendo o núcleo da partícula, e um ou mais envoltórios, tal como envoltório metal, envolvendo o material ativo é provido. As estruturas-satélite e envoltório-núcleo presentemente revelados podem ser utilizados para amplificar ou de outra forma aumentar um sinal em um ensaio, tal como um ensaio SERS.

[009]Em algumas modalidades, um tubo amostra designado para formar um concentrado de partícula magnética tendo um tamanho consistente, forma, e densidade é provido, em que a amostra tubo tem dimensões para fisicamente forçar um concentrado de partícula magnética para um tamanho desejado. O tubo amostra pode incluir uma janela óptica permitindo a detecção de sinais ópticos gerados a

partir de concentrado de partícula magnética. Um sistema é provido para formar um concentrado de partícula magnética que usam um magneto posicionado adjacente e abaixo do tubo amostra. O sistema pode ser utilizado em um ensaio de captura magnético. A matéria presentemente revelada ainda relata um método de formar confiavelmente um concentrado de partícula magnética menor e mais densa em um tubo amostra.

[010] Também provido aqui, são sistemas representativos e instrumentação adequada para realizar os ensaios presentemente revelados.

[011] Certos aspectos da matéria presentemente revelada tendo sido expressos aqui abaixo, que são endereçados total ou em parte por matéria presentemente revelada, outros objetos se tornarão evidentes como a descrição procede quando tomado em conexão com os Exemplos e Desenhos acompanhantes como melhor descrito aqui abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DE VÁRIAS VISÕES DO(S) DESENHO(S)

[012] Tendo então descrito a matéria presentemente revelada em termos gerais, referência agora será feita para os desenhos acompanhantes, que não são necessariamente desenhados para escala, e em que:

[013] Figura 1 é um diagrama esquemático de um ensaio de captura magnética presentemente revelado;

[014] Figura 2 é um diagrama esquemático descrevendo o uso de um marcador de referência, por exemplo, uma nanopartícula ativa – SERS, como uma referência em uma partícula de captura magnética;

[015] Figura 3 é uma representação gráfica de uma comparação de um sinal não referenciado e um sinal referenciado. O sinal não referenciado (B) é um pico de intensidade a 1590cm^{-1} de um repórter Raman trans-1,2-bis(4-pirridil)etileno (BPE) e o sinal de referência (A) é a proporção das intensidades do pico a 1590 cm^{-1} e 1180 cm^{-1} , que é a intensidade do pico correspondente a um repórter 4,4'-dipiril (DPI).

Notas na escala da lateral esquerda dos gráficos correspondem ao sinal referenciado (A), enquanto a escala do lado direito do gráfico corresponde ao sinal não referenciado (B);

[016]Figura 4 é um diagrama esquemático de um exemplo de um sistema óptico adequado para uso com os ensaios presentemente revelados;

[017]Figuras 5A-5D são representações esquemáticas para formação de concentrado por rotação do tubo de amostra;

[018]Figura 6 é uma representação gráfica de uma comparação do sinal repórter 4,4'-dipiridil (DPI) em tampão, plasma, e sangue lisado com e sem reagentes de lise (rgts);

[019]Figura 7 é um diagrama esquemático representativo de um ensaio presentemente revelado utilizando um método de amplificação de sinal;

[020]Figuras 8A e 8B são uma comparação de imunoensaios baseados em líquido corridos com reagentes idênticos em ausência do (8A) e a presença do (8B) método de amplificação de sinal presentemente revelado;

[021]Figura 9 é um diagrama esquemático representativo do método de amplificação presentemente revelado em um formato de detecção de polinucleotídeo;

[022]Figuras 10A e 10B apresentam resultados a partir de um ensaio de hibridização de DNA na ausência do (10A) e presença do (10B) o método de amplificação de sinal presentemente revelado;

[023]Figuras 11A e 11B mostram que um sinal aleatório pode ser erroneamente determinado para entrada de variáveis devido a alinhamento falso de características. Ruído aleatório normalmente distribuído com um desvio padrão de 10.000 foi ajustado utilizando uma rotina de mínimos quadrados. Neste exemplo, marcador 4 foi determinado um peso de 0,5 para balancear pesos negativos de outros marcadores;

[024]Figuras 12A e 12B mostra espectro de referência representativo obtido na solução (A) e em um concentrado de partícula magnética (B). O pico 5 marcador (perto de 865 nm) relativo ao marcador 1 é mais alto no concentrado, e a forma do pico a 880 nm é levemente diferente.

[025]Figura 13 é uma representação gráfica da concentração estimada para um de cinco marcadores em um experimento multiplexante. Nível de concentração 20 corresponde a $2,5E8$ partículas marcadoras/mL. Estimativas utilizando espectro de referência baseados em concentrado (diamantes fechados) mostram melhor acurácia e precisão, especialmente em concentrações mais baixas, que o espectro de referência baseado na solução (círculos abertos). A linha reta mostra uma relação 1:1. (Pontos de dados baseados em soluções são compensados a partir de pontos baseados no concentrado no eixo x para clareza.);

[026]Figura 14 mostra uma micrografia eletrônica de transmissão (MET) de uma estrutura satélite de acordo com uma das modalidades da matéria presentemente revelada;

[027]Figura 15 ilustra um ensaio sanduíche utilizando estrutura satélite para amplificar um sinal analito de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada;

[028]Figura 16A demonstra um ensaio sanduíche utilizando uma estrutura satélite para amplificar um sinal analito de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada; e figura 16B mostra o ensaio sanduíche da Figura 16A seguindo a aplicação de um campo magnético;

[029]Figura 17 ilustra uma seção cruzada de uma partícula composto de núcleo em envoltório de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada;

[030]Figura 18A é um desenho mostrando uma visão lateral de um tubo de amostra de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada;

[031]Figura 18B é um desenho mostrando uma visão lateral seccional cruzada tomada ao longo da Seção A-A do tubo amostra mostrado na Figura 18A;

[032]Figura 18C é um desenho mostrando uma visão do fundo do tubo da amostra mostrada na Figura 18A;

[033]Figura 19A é um desenho mostrando uma visão lateral de um magneto posicionado adjacente e abaixo de um tubo amostra de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada;

[034]Figura 19B é um desenho mostrando uma visão de cima do magneto e tubo de amostra mostrado na Figura 19A; e

[035]Figura 20 é um gráfico ilustrando uma curva de ligação de ensaio de hormônio estimulante da tireóide (TSH) utilizando um tubo de amostra de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[036]A matéria presentemente revelada agora irá descrever mais completamente de agora em diante com referência aos Desenhos acompanhantes, em que algumas, mas não todas as modalidades da matéria presentemente reveladas são mostradas. Muitas modificações e outras modalidades da matéria presentemente revelada mostradas aqui virão a mente à um versado na técnica cuja matéria presentemente revelada pertencem, tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas seguintes descrições e os Desenhos associados. Assim, é para ser entendido que a matéria presentemente revelada não é para ser limitada à modalidades específicas reveladas e que as modificações e outras modalidades são tencionadas serem incluídas no objetivo das reivindicações em anexo. Embora os termos específicos são empregados aqui, eles são utilizados em um senso genérico e descritivo somente e não para propósitos de limitação.

[037]Os termos “um” e “o” refere-se a “um ou mais” quando utilizados neste pedido, incluindo as reivindicações. Então, por exemplo, referência a “uma amostra”

inclui uma pluralidade de amostras, a menos que o contexto claramente é para o contrário (por exemplo, uma pluralidade de amostras), e daí em diante.

[038]Através dessa especificação e reivindicações, as palavras “compreende”, “compreendem”, e “compreendendo” são utilizados em um senso não exclusivo, exceto onde o contexto requer de outra forma.

[039]Como aqui utilizado, o termo “cerca”, quando referindo a um valor significa compreender variações de, em algumas modalidades $\pm 50\%$, em algumas modalidades $\pm 20\%$, em algumas modalidades $\pm 10\%$, em algumas modalidades $\pm 5\%$, em algumas modalidades $\pm 1\%$, em algumas modalidades $\pm 0,5\%$, e em algumas modalidades $\pm 0,1\%$ a partir da quantidade especificada, tal como variações são apropriadas para fazer os métodos revelados ou emprego das composições revelados.

[040]Ainda, quando uma quantidade, concentração, ou outro valor ou parâmetro é dado como ou uma variação, variação preferida, ou uma lista de valores preferíveis superiores e valores preferíveis inferiores, é para ser entendido como especificamente revelando todas as variações formadas a partir de qualquer par de qualquer limite de variação superior ou valor preferido e qualquer limite de variação inferior ou valor preferido, sem levar em consideração se as variações são separadamente reveladas. Onde uma variação de valores numéricos é recitada qui, a menos que de outra forma afirmado, a variação é tencionada incluir os pontos finais dos mesmos, e todos os números inteiros e frações dentro da variação. Não é tencionado que o objetivo da matéria presentemente revelada ser limitada à valores específicos recitados quando definindo a variação.

I. ENSAIOS UTILIZANDO PARTÍCULAS ATIVAS – SERS

[041]Em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê ensaios diagnósticos para determinar a presença ou quantidade de um analito ou ligante de interesse em uma amostra biológica. Consequentemente, em algumas

modalidades, a matéria presentemente revelada provê métodos de ensaio, composições, sistemas, instrumentos, e kits para ensaios de desempenho diagnósticos utilizando nanopartículas ativas –SERS.

[042]Como descrito em mais detalhes aqui abaixo, as capacidades de detecção dos ensaios presentemente revelados são melhoradas em um ou mais caminhos ao longo dos ensaios conhecidos na técnica. Esses melhoramentos incluem, mas não são limitadas a um aumento na intensidade de sinal, especificidade aumentada, maior acurácia, repetibilidade aumentada, e combinações dos mesmos. Os ensaios presentemente revelados também podem prover resultados diagnósticos em um período mais curto de tempo que ensaios conhecidos na técnica. Tais melhoramentos, ou sozinhos ou em combinação, permitem o uso dos métodos presentemente revelados em pedidos, tais como ensaios diagnósticos utilizando espectroscopia Raman como um método de detecção, imagem óptica de tecidos, e outros pedidos, onde tais melhoramentos são requeridos.

[043]Quando utilizado em um ensaio diagnóstico, as características aumentadas observadas para os métodos presentemente revelados permitem a detecção de biomarcadores, incluindo, mas não limitados a proteínas, polinucleotídeos, e metabólitos, e concentrações inferiores que aquelas mensuráveis utilizando métodos SERS conhecidos na técnica, e também permitem detecção de células (por exemplo, organismos inteiros). Essas características aumentadas também são benéficas nos pedidos onde o sinal Raman tem que passar, isto é, transmitido através, um meio complexo, tal como sangue completo ou soro. Ainda, ensaios diagnósticos com características aumentadas podem ser requeridos para detecção precoce de uma condição ou estado de doença em um paciente.

A. Visão Geral: Espectroscopia Raman de Superfície Aumentada

[044]Quando uma molécula é irradiada com fótons de uma frequência particular, os fótons são dispersos. A maioria dos fótons incidentes são elasticamente dispersos sem uma mudança em frequência (dispersão Rayleigh), embora uma pequena fração dos fótons incidentes (aproximadamente 1 em cada 10^6) interage com um modo vibracional da molécula irradiada e são dispersos inelasticamente. Os fótons dispersos inelasticamente são mudados em frequência e têm ou uma frequência superior (anti-Stokes) ou uma frequência inferior (Stokes). Por plotar a frequência dos fótons dispersos inelasticamente contra sua intensidade, um espectro Raman convencional da molécula é observado. A baixa sensibilidade da espectroscopia Raman convencional, entretanto, tem limitado seu uso para caracterizando amostras biológicas em que o(s) analito(s) alvo(s) tipicamente são presentes em quantidades pequenas.

[045]Quando uma molécula ativa Raman é adsorvida em ou em proximidade a, por exemplo, dentro de cerca de 50 Å de uma superfície metal, a intensidade de um sinal Raman aumentando a partir da molécula ativa Raman pode ser aumentada. Por exemplo, aumenta o sinal Raman por um fator de cerca de 10^3 a cerca de 10^6 , ou em alguns casos, 10^{14} tem sido reportado aos dados. Este aumento é referido como efeito dispersão Raman aumentada de superfície (SERS). O efeito SERS foi primeiro reportado em 1974 por Fleishman *et al*, que observou intenso dispersão Raman a partir de piridina adsorvida em uma superfície áspera do eletrodo prata. Ver Fleishman *et al*, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode", Chem. Phys. Lett., 26, 163 (1974); ver também Jeanmaire, D.L. e Van Dyne, R.P., "Surface Raman spectroelectrochemistry. 1. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines absorbed on anodized silver electrode." J. Electroanal. Chem., 84(1), 1-20 (1977); Albrecht, M.G., e Creighton, J.A., "Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode," J.A.C.S., 99, 5215-5217 (1977). Desde então, SERS tem sido observado para um número de moléculas diferentes adsorvidas na

superfície de superfícies de metais. Ver, por exemplo, A. Campion, A. E Kambhampati, P., "Surface-enhanced Raman dispersão," Chem. Soc. Rev., 27, 241 (1998).

[046]A magnitude do aumento SERS depende em um número de parâmetros, incluindo a posição e orientação de várias ligações presentes na molécula adsorvida com respeito ao campo eletromagnético na superfície metal. O mecanismo pelo qual SERS ocorre é pensado resultar a partir de uma combinação de (i) ressonâncias de de plasmon de superfície no metal que aumenta a intensidade local da luz incidente; e (ii) formação e transições subsequentes de complexos de transferência de carga entre a superfície metal e a molécula ativa Raman.

[047]O efeito SERS pode ser observado com moléculas ativas Raman adsorvidas em ou na proximidade de partículas coloidais de metal, filmes de metal em substratos dielétricos, e arranjo de partículas de metal, incluindo nanopartículas de metal. Por exemplo, Kneipp *et al.*, reportou a detecção de moléculas únicas de um corante, violeta de cresil, adsorvida em grupos agregados de nanopartículas de prata coloidais. Ver Kneipp *et al.*, "Single molecule detection using surface-enhanced Raman dispersão (SERS), Phys. Rev. Lett. 78(9), 1667-1670 (1997). Neste mesmo ano, Nie e Emory observaram o sinal da espectroscopia Raman de ressonância aumentada de superfície (SERRS), em que a ressonância entre a energia de absorção da molécula ativa Raman e que a nanopartícula produz um aumento tão grande quanto 10^{10} a cerca de 10^{12} , de uma molécula corante adsorvida em uma nanopartícula prata única, onde as nanopartículas variaram do tipo esféricas a haste e tinham uma dimensão de cerca de 100 nm. Ver Nie, S. e Emory, S. R., "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman dispersão," Science, 275, 1102-1106 (1997); Emory, S.R. e Nie, S., "Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles," Anal. Chem., 69, 2631 (1997).

[048] Uma partícula Raman aumentada tendo associado a ela, por exemplo, adsorvido a ou ligado a, uma(s) molécula(s) ativa(s) – SERS é(são) referida(s) aqui como uma “partícula ativa – SERS”. Mais particularmente, uma partícula ativa – SERS, causa, ou de outra forma dá suporte a dispersão de luz Raman aumentada pela superfície (SERS) ou dispersão de luz Raman de ressonância aumentada pela superfície (SERRS). Um número de superfícies é capaz de produzir um sinal SERS, incluindo superfícies ásperas, superfícies texturizadas, e outras superfícies, incluindo superfícies lisas.

[049] “Dispersão Raman” geralmente refere-se a dispersão inelástica de um fóton incidente em uma molécula. Fótons que são dispersos inelasticamente têm uma frequência óptica (ν_i), que é diferente que a frequência da luz incidente (ν_0). A diferença em energia (ΔE) entre a luz incidente e a luz scatteres inelasticamente pode ser representado como $(\Delta E) = h/\nu_0 - \nu_i$, em que h é constante de Planck, e corresponde à energias que são absorvidas pela molécula. A radiação incidente pode ser de qualquer frequência ν_0 , mas tipicamente é radiação monocromática na região espectral visível ou perto do infra-vermelho. A diferença absoluta $|\nu_0 - \nu_i|$ é um infra-vermelho, por exemplo, vibracional, frequência. Mais particularmente, o processo que produz frequência de luz outra que ν_0 é referida como “dispersão Raman”. A frequência ν_1 da radiação “dispersos Raman” pode ser maior que ou menos que ν_0 , mas a quantidade de luz com frequência $\nu_1 < \nu_0$ (radiação Stokes) é maior que aquela com frequência $\nu_1 > \nu_0$ (anti-radiação Stokes).

[050] Como aqui utilizado, o termo “radiação” refere-se a energia na forma de radiação eletromagnética que pode induzir dispersão Raman aumentada de superfície em uma amostra sob teste, por exemplo, uma amostra compreendendo uma nanopartícula ativa – SERS tendo uma ou mais moléculas repórter ativa – SERS associadas aos mesmos. Mais particularmente, o termo “radiação” refere-se a energia na forma de radiação eletromagnética que causa a superfície de uma

nanopartícula para induzir, emitir, suportar, ou de outra forma causa dispersão de luz, por exemplo, dispersão Raman, em uma molécula repórter próxima à superfície da nanopartícula. Como aqui utilizado, uma “molécula repórter” refere-se a qualquer molécula ou composto químico que é capaz de produzir um espectro Raman quando ela é iluminada com radiação de um comprimento de onda apropriado. Uma “molécula repórter” também pode ser referida aqui como uma “marcação”, um “corante”, uma “molécula ativa – Raman”, ou “molécula ativa – SERS”, cada uma das quais pode ser utilizada de modo passível de mudança.

[051]“Dispersão Raman aumentada pela superfície ” ou “SERS” refere-se ao fenômeno que ocorre quando o sinal dispersão Raman, ou intensidade, é aumentada quando uma molécula ativa de Raman é adsorvida em ou em proximidade a, por exemplo, dentro de cerca de 50 Å de, uma superfície de metal. “Dispersão Raman de ressonância de superfície aumentada” ou “SERRS” refere-se a um sinal SERS aumentado que ocorre quando a molécula repórter em proximidade para a superfície da nanopartícula ativa – SERS está em ressonância com o comprimento de excitação.

B. Nanopartículas Representativas Adequadas para Uso com os Métodos Presentemente Revelados

1. Nanopartículas Gerais

[052]Qualquer partícula ativa – SERS e adequada para uso nos métodos presentemente revelados. Tais partículas ativas – SERS tipicamente são nanopartículas e também são referidas como “nanomarcadores”. Como aqui utilizado, os termos “nanopartícula”, “nanoestrutura”, “nanocristal”, “nanomarcador”, e “nanocomponente”, são utilizados de modo passível de mudança e referem-se a uma partícula tendo pelo menos uma dimensão na variação de cerca de 1 nm a cerca de 1000 nm, incluindo qualquer valor de número inteiro entre 1 nm e 1000 nm (incluindo cerca de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 e 1000 nm). Em

algumas modalidades, a nanopartícula é uma nanopartícula metálica. Em algumas modalidades, a nanopartícula é uma partícula esférica, ou partícula substancialmente esférica tendo um diâmetro de núcleo entre cerca de 2 nm e cerca de 200 nm (incluindo cerca de 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 nm). Em algumas modalidades, a nanopartícula tem um diâmetro de núcleo entre cerca de 2 nm e cerca de 100 nm (incluindo cerca de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nm) e em algumas modalidades, entre cerca de 20 nm e 100 nm (incluindo cerca de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100 nm). Um versado na técnica, sob revisão da matéria presentemente revelada, pode reconhecer que uma nanopartícula adequada para uso com os ensaios presentemente revelados podem incluir um núcleo, por exemplo, um núcleo metal, que induz o efeito Raman, e pode ainda incluir uma ou mais camadas de materiais ativos –SERS, encapsulantes, e/ou outras estruturas de envoltório externas que também podem contribuir para o tamanho, por exemplo, diâmetro total da estrutura nanopartícula.

[053]Nanopartículas ativas – SERS adequadas para uso com os métodos presentemente revelados compreendem pelo menos um metal, isto é, pelo menos um elemento selecionado a partir da Tabela Periódica dos Elementos que é comumente conhecida como um metal. Metais adequados incluem metais do Grupo 11, tal como Cu, Ag, e Au, ou quaisquer outros metais conhecidos pelos versados na técnica para suportar SERS, tal como metais alcalinos. Em algumas modalidades, a nanopartícula substancialmente compreende um elemento único metal. Por exemplo, a preparação de nanopartículas de ouro é descrita por Frens, G. Nat. Phys. Sci., 241, 20 (1972). Em outras modalidades, a nanopartícula compreende uma

combinação de pelo menos dois elementos, tal como uma liga, por exemplo, uma liga binário. Em algumas modalidades, a nanopartícula é magnética.

[054]Em outras modalidades, o metal inclui um componente adicional, tal como em uma partícula de envoltório de núcleo $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$. Partículas de envoltório de núcleo $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ têm sido relatadas tendo amplo ajuste na ressonância óptica perto de IR. Ver Averitt, R.D. *et al.* "Ultrafast optical properties of gold nanoshells", JOSA B, 16(10), 1824-1832 (1999). Ainda, partículas núcleo Ag/ envoltório Au, tais como aquelas descritas por Cao, Y.W. *et al.*, "DNA-modified core-shell Ag/Au nanoparticles", J. Am. Chem. Soc., 123 (32), 7961-7962 (2001), ou partículas de núcleo Au / envoltório Ag, ou qualquer combinação núcleo-envoltório envolvendo metais ativos – SERS, podem ser utilizados. Outras combinações adequadas para uso em partículas núcleo-envoltório também são adequadas para uso com os métodos presentemente revelados, incluindo colóides sílica/alumina funcionalizados com Au ou Ag, colóides TiO_2 funcionalizados com Au e Ag, nanopartículas de Au revestidas com nanopartícula de Au (ver, por exemplo, Mucic, *et al.*, "DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials," J. Am. Chem. Soc., 120 (48), 12674 (1998); colóides TiO_2 revestidos com nanopartícula de Au; e partículas tendo um núcleo Si com uma envoltório metal (isto é, "nanoenvoltórios"), tal como colóides SiO_2 revestidos de prata ou colóides SiO_2 revestidos com ouro. Ver, por exemplo, Jackson *et al.*, Proc. Acad. Sci. USA 101 (52):17930-5 (2004); ver também Patente dos EUA Nos. 6.344.272 e 6.685.986 para Oldenburg *et al.*, cada uma das quais é aqui incorporada por referência em sua totalidade. O uso de tais nanoenvoltórios nas aplicações de biosensores tem sido descrito. Ver Patente dos EUA No. 6.699.724 para West *et al.*, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[055]Outra classe de nanopartículas adequadas para uso com os métodos presentemente revelados incluem nanopartículas tendo uma superfície interna. Tais nanopartículas incluem partículas vazias e nanocristais vazios ou nanopartículas

porosas ou semi-porosas. Ver, por exemplo, Patente dos EUA No. 6.913.825 para Ostafin *et al*, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Consequentemente, a matéria presentemente revelada também provê uma nanopartícula compreendendo uma partícula núcleo-envoltório ativa para SERS ou uma nanopartícula vazia ativa para SERS. Em algumas modalidades, tais nanopartículas podem exibir um sinal SERS aumentado.

[056] Enquanto é reconhecido que forma de partícula e proporção do aspecto pode afetar as características físicas, ópticas e eletrônicas das nanopartículas, a forma específica, aspecto de proporção, ou presença/ausência da área de superfície interna não sustenta a qualificação de uma partícula como uma nanopartícula. Consequentemente, nanopartículas adequadas para uso com métodos presentemente revelados podem ter uma variedade de formas, tamanhos e composições. Ainda, a nanopartícula podem' ser sólida, ou em algumas modalidades, como descrita imediatamente acima, vazia. Exemplos não limitantes de nanopartículas adequadas incluem nanopartículas colóides de metais vazias ou nanobarras cheias, magnéticas, paramagnéticas, condutoras ou insulantes, partículas sintéticas, hidrogéis (colóides ou barras), e semelhantes. Será apreciado por um versado na técnica que nanopartículas podem existir em uma variedade de formas, incluindo mas não limitadas a esferóides, hastes, discos, pirâmides, cubos, colíndros, nanoélices, nanosprings, nanoanéis, nanopartículas de forma de haste, nanopartículas de forma de seta, nanopartículas de forma de gota, nanopartículas de forma tetrápode, nanopartículas de forma de prisma, e uma pluralidade de outras formas geométricas e não geométricas.

[057] Ainda, nanopartículas adequadas para uso com métodos presentemente revelados podem ser isotrópicos ou anisotrópicos. Como aqui referido, nanopartículas anisotrópicas têm um comprimento e uma largura. Em algumas modalidades, o comprimento de uma nanopartícula anisotrópica é a

dimensão paralela da abertura em que a nanopartícula foi produzida. Em algumas modalidades, a nanopartícula anisotrópica tem um diâmetro (largura) de cerca de 350 nm ou menos. Em outras modalidades, a nanopartícula anisotrópica tem um diâmetro (largura) de cerca de 250 nm ou menos e em algumas modalidades, um diâmetro (largura) de cerca de 100 nm ou menos. Em algumas modalidades, a largura da nanopartícula anisotrópica está entre cerca de 15 a cerca de 300 nm. Ainda, em algumas modalidades, a nanopartícula anisotrópica tem um comprimento, em que o comprimento está entre cerca de 10 nm e 350 nm.

[058]Muito da literatura de SERS (ambas, experimental e teórica) sugere que partículas anisotrópicas (hastes, triângulos e prismas) podem prover um maior aumento do sinal Raman como comparado às esferas. Por exemplo, o assim chamado “efeito antena” prediz que o aumento Raman é esperado ser maior em áreas de maior curvatura. Muitos relatos de partículas anisotrópicas têm sido recentemente descritos, incluindo prismas prata (Ag) e partículas de ouro (Au) “ramificadas”.

[059]Nanohastes Au e Ag anisotrópicas podem ser produzidas por eletrodeposição em modelos de alumina pré-formados, de uma forma similar à produção de partículas Nanobarcodes®. Ver, por exemplo, Nicewarner-Pena, S.R. *et al*, “Submicrometer metallic barcodes”, *Science*, 294, 137-141 (2001); Walton, I.D. *et al*, “Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy”, *Anal. Chem.* 74, 2240-2247 (2002). Essas partículas podem ser preparadas por deposição de camadas alternantes de materiais, tipicamente Au e Ag, e modelos de alumina pré-formados, e podem ter um diâmetro de cerca de 250 nm e um comprimento de cerca de 6 microns.

2. Nanopartículas Ativas – SERS Encapsuladas

[060]Nanopartículas de metal ativas – SERS têm uma tendência a agregar em solução aquosa e uma vez agregadas são difíceis de re-dispersar. Ainda, a

composição química de algumas moléculas ativas – Raman é incompatível com químicas utilizadas para ligar outras moléculas, tais como proteínas, para nanopartículas de metal. Essas características podem limitar a escolha de molécula ativa de Raman, ligação química, e outras moléculas a serem ligadas à nanopartícula de metal.

[061]Consequentemente, em algumas modalidades, a molécula repórter ativa –SERS quando afixada, por exemplo, ou adsorvida ou covalentemente ligada a uma nanopartícula, pode ser revestida ou encapsulada, por exemplo, em um envoltório, de um material diferente, incluindo um polímero, vidro, ou material cerâmico. Tais modalidades são referidas aqui como “nanopartículas ativas – SERS encapsuladas”. Métodos para preparar nanopartículas ativas – SERS encapsuladas são descritas na Patente dos EUS No. 6.514.767 para Natan, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[062]Exemplos de partículas adequadas para uso com os métodos presentemente revelados incluem Oxonica Nanomarcadores (Oxinica Inc., Mountain View, Califórnia). Em uma modalidade, os nanomarcadores compreendem um núcleo de ouro tendo um diâmetro de cerca de 50 nm, são revestidos com uma molécula repórter distinta, e são encapsulados, em algumas modalidades, em um revestimento de vidro protetor de 10 nm e 50 nm, em algumas modalidades, um revestimento de vidro protetor de 15 nm a 40 nm, em algumas modalidades, um revestimento de vidro protetor de 30 nm a 40 nm, e, em algumas modalidades, um revestimento de vidro protetor de 35 nm, como descrito aqui acima. Nanomarcadores são ainda descritos, por exemplo, na Patente dos EUA No. 6.514.767 para Natan; Pedido de Patente dos EUA publicado Nos. 2003/0166297 para Natan e 2005/0158870 A 1 para Natan, as revelações das quais são aqui incorporadas por referência.

[063]As nanopartículas ativas – SERS encapsuladas presentemente reveladas podem incluir uma nanopartículas de metal, uma submonocamada, monocamada ou multicamada de uma ou mais moléculas repórter em proximidade à superfície da nanopartícula de metal. O termo “em proximidade” é tencionado significar dentro de cerca de 50 nm ou menos de uma superfície externa da nanopartícula. Uma nanopartícula tendo uma sub-monocamada, monocamada, ou multicamada de um ou mais moléculas repórter ligadas a uma superfície externa do núcleo da nanopartícula também pode incluir um envoltório encapsulante. Em tais modalidades, a molécula repórter é posionada em uma interface entre a superfície externa da nanopartícula de metal e uma superfície interna da envoltório encapsulante.

[064]O núcleo da nanopartícula compreendendo a nanopartícula encapsulada pode ser uma esfera de metal, por exemplo, uma esfera de ouro, prata, ou cobre, tendo um diâmetro de cerca de 20 nm pra cerca de 200 nm. Em algumas modalidades, o núcleo de nanopartícula compreende um esferóide de metal oblato ou prolato. O diâmetro do núcleo da nanopartícula pode ser selecionado baseado, em parte, no comprimento de onda de luz incidente. Em algumas modalidades, a envoltório encapsulante compreende um material dielétrico, tal como um polímero, vidro, metal, óxidos de metais, tais como TiO_2 e SnO_2 , sulfetos de metal ou um material cerâmico. Em algumas modalidades, o encapsulante é vidro, por exemplo, SiO_x . Para encapsular as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas em vidro, os núcleos de nanopartículas de metal podem ser tratados com um vidro primeiro, isto é, um material que pode levar a um crescimento de um revestimento uniforme de vidro, ou pode melhorar a adesão do revestimento de vidro para a partícula, ou ambos. Vidro pode então ser crescido ao longo da nanopartícula de metal por técnicas padrões conhecidos na técnica.

[065]O processo de encapsulamento pode ser realizado após, ou durante a ligação ou adsorção de uma ou mais moléculas repórter para o núcleo da nanopartícula. Dessa forma, o corante é sequestrado a partir do solvente ao redor como um revestimento na superfície do núcleo da nanopartícula de metal. Tal configuração provê o núcleo da nanopartícula de metal com uma atividade SERS estável. O corante pode formar uma sub-monocamada, uma monocamada completa, ou uma união de multicamadas na superfície do núcleo da nanopartícula de metal. A camada do corante pode compreender uma camada única ou pode ser uma mistura de diferentes corantes.

[066]Então, em algumas modalidades, a molécula repórter SERS ativa forma uma camada da superfície externa no núcleo de nanopartícula, em que a camada pelo menos parcialmente cobre a superfície externa no núcleo da nanopartícula e é definido por uma superfície interna e uma superfície externa. O encapsulante é disposto em pelo menos uma da superfície externa da nanopartícula para pelo menos parcialmente rodear o núcleo da nanopartícula, que é pelo menos parcialmente recoberto com uma camada de molécula repórter ativa - SERS.

[067]Ainda, em algumas modalidades, o encapsulante pode ser modificado, por exemplo, derivatizado por técnicas padrões conhecidos na técnica, para ligar moléculas, incluindo biomoléculas, para sua superfície externa. Esta característica permite as nanopartículas ativas – SERS encapsuladas presentemente reveladas serem conjugadas às moléculas, incluindo biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos, ou para suportes sólidos sem interferir com a atividade Raman do corante. Vidro ou outros materiais para uso como um envoltório encapsulante contém grupos funcionais receptíveis para ligação molecular. Por exemplo, imersão de vidro em uma base adequada permite para a ligação covalente de alquil triclorossilanos ou alquil trialcoxissilanos, com funcionalidade adicional disponível ao final do grupo alquila do alquil triclorossilano ou grupo alquil trialcoxissilano. Em

algumas modalidades, um ou mais de um grupo aminoalquiltrialquiloxisilano, um grupo mercaptoalquiltrialcoxisilano, ou um grupo carboxialquiltrialxocisilano pode ser covalentemente ligado à superfície de vidro. Então, superfícies de vidro podem ser modificadas com muitas formas de biomoléculas e super estruturas biomoleculares, incluindo células, bem como, óxidos, metais, polímeros e semelhantes. Assim, tensoativos de vidro podem ser modificados com camadas monomoleculares bem organizadas. Consequentemente, revestimentos de vidro suportam muitos tipos de funcionalização química (também referidos aqui como “derivatização”). Outras formas de encapsular também podem ser funcionalizadas, também. Consequentemente, as nanopartículas reveladas presentemente podem ser afixadas para quaisquer espécies conhecidas na técnica tendo uma funcionalidade quimicamente reativa.

[068] A espessura do encapsulante pode ser variada dependendo das propriedades físicas requeridas da nanopartícula ativa – SERS. As propriedades físicas, tal como a sedimentação coeficiente pode ser afetada pela espessura do encapsulante. Em geral, quanto mais espesso o encapsulante, mais efetivo o sequestro dos corantes ativos – SERS no núcleo nanopartícula de metal a partir do solvente circundante.

[069] Em modalidades em que o encapsulante é vidro, a espessura do vidro tipicamente pode variar a cerca de 1 nm a cerca de 50 nm. Em exemplo, modalidades não limitantes, as nanopartículas ativas – SERS encapsuladas compreendem nanopartículas de ouro tendo um diâmetro variando de cerca de 50 nm a cerca de 100 nm encapsulado em uma esfera de vidro tendo uma espessura variando de cerca de, em algumas modalidades, de cerca de 10 nm a cerca de 50 nm; em algumas modalidades, a partir de cerca de 15 nm a cerca e 40 nm; e em algumas modalidades, cerca de 35 nm. A otimização das dimensões das nanopartículas ativas – SERS encapsuladas presentemente reveladas pode ser

realizada por um versado na técnica. Por exemplo, é conhecido na técnica que nanopartículas núcleo-envoltório (por exemplo, nanopartículas Au/AuS) suportam SERS e têm propriedades ópticas diferentes como comparadas às nanopartículas de metal puro. Assim, é conhecido na técnica que SERS a partir de esferóides prolatos podem ser aumentadas relativas a esferas com o mesmo eixo principal. Ainda, é conhecido que melhoramentos de partícula única são dependentes de comprimento de onda. Então, o tamanho da partícula pode ser “ajustado” para alcançar um sinal SERS máximo para uma dada excitação de comprimento de onda. Consequentemente, a composição da partícula, ou seu tamanho ou forma pode ser alterado de acordo com a matéria presentemente revelada para otimizar a intensidade do sinal SERS.

[070]As nanopartículas ativas – SERS encapsuladas presentemente reveladas são fáceis de manusear e estocar. Ainda, elas também são resistentes a agregação, estabilizadas contra decomposição do corante em solventes e ar, são quimicamente inertes, e podem ser concentradas, por exemplo, por técnicas de força magnéticas, e re-dispersas sem perda da atividade SERS.

[071]Como descrito em mais detalhes aqui abaixo, a matéria presentemente revelada também provê mais nanopartículas especializadas capazes de aumentar um ensaio utilizando partículas ativas – SERS.

3. Moléculas Repórter

[072]As moléculas repórteres podem ser quaisquer moléculas que provêm um sinal Raman sob exposição à irradiação apropriada. Uma “molécula repórter” refere-se a qualquer molécula ou composto químico que é capaz de produzir um sinal Raman. Uma “molécula repórter” também pode ser referida aqui como “marcador”, um “corante”, uma “molécula ativa – Raman”, ou “molécula ativa – SERS”, cada uma das quais pode ser utilizada de modo passível de mudança. Um número de moléculas repórter distintas com forte espectro Raman são conhecidas e podem ser utilizadas para criar “gostos” distintos de partículas ativas – SERS para

permitir capacidades multiplexantes (o termo “gostos” indica partículas que provêm assinaturas Raman distintas sob irradiação). Tais partículas tipicamente são capazes de funcionarem em região de comprimento de onda perto do infra-vermelho (PIV), são detectáveis em sangue total, e são fotoestáveis. Ainda, um número de “gostos” diferentes pode ser excitado com um comprimento de onda único.

C. Padrões de Captura Representativos

[073] Padrões de captura, tais como anticorpos ou padrões de DNA, podem ser imobilizados em revestimentos de vidros protetores utilizando técnicas de bioconjugação conhecidos. Uma vantagem desta abordagem é que a molécula repórter geradora de sinal SERS está segura na proximidade da superfície e protegida pelo revestimento de vidro a partir do ataque biológico ou químico. Em adição, ligação competitiva entre a molécula repórter e o padrão de captura é eliminado, permitindo a máxima cobertura de superfície da molécula repórter na superfície do núcleo da nanopartícula e o padrão de captura na superfície do vidro, respectivamente.

[074] Mais geralmente, nanopartículas ativas – SERS podem ser funcionalizadas com uma molécula, tal como um membro de ligação específico de um par ligador, que pode ligar a um alvo analito. O evento de ligação cria o sinal detectável, que é indicativo da presença e/ou quantidade de um analito. O sinal detectável pode corresponder a uma detecção localizada de um marcador SERS ou pode ser representado por uma mudança de comprimento de onda detectável no espectro SERS.

[075] O uso de uma nanopartícula ativa – SERS funcionalizada tem várias vantagens em nanopartículas não funcionalizadas. Primeiro, o grupo funcional provê um grau de especificidade para a nanopartícula pode prover uma interação específica com um analito alvo. Segundo, o analito alvo não tem que ser Raman ativo por si mesmo; esta presença pode ser determinada por medir o espectro SERS

do corante ativo - Raman ligado à nanopartícula. Tais medidas são referidas aqui como “detecção indireta”, em que a presença ou ausência de um analito alvo ou ligante em uma amostra biológica é determinada por detectar um sinal SERS que não emana diretamente a partir do analito alvo ou ligante de interesse.

[076] Nanopartículas ativas – SERS adequadas para uso com os métodos presentemente revelados podem ser funcionalizados para ligar a um analito alvo em pelo menos duas formas diferentes. Em algumas modalidades, a molécula repórter ativa – SERS, isto é, um corante ativo – SERS, pode ser conjugado com um membro ligador específico de um par ligante, embora em outras modalidades, um membro ligador específico de um par ligador pode ser ligado diretamente à nanopartícula. Em modalidades em que o núcleo de nanopartículas é pelo menos parcialmente circundada por um envoltório encapsulante, o membro ligador pode ser ligado à uma superfície externa da envoltório encapsulante.

[077] Como aqui utilizado, o termo “conjugado” refere-se a uma molécula compreendendo duas ou mais subunidades ligadas juntas, opcionalmente através de um grupo ligador, para formar uma estrutura molecular única. O ligador pode ser feito ou por uma ligação química direta entre as subunidades ou através de um grupo ligador. Tal ligador em um conjugado tipicamente é irreversível. Como aqui utilizado, o termo “afinidade” refere-se à força de atração entre um membro de ligação para outro membro de um par ligador no sítio ligador particular. O termo “especificidade” e derivações dos mesmos, referem-se a probabilidade que um membro ligador se ligará para outro membro de um par ligador. Tal ligador entre um membro ligador, por exemplo, uma proteína ligadora, para outro membro ligador de um par ligador, por exemplo, um ligador ou analito, pode ser reversível.

[078] O termo “membro ligador específico” refere-se a uma molécula para a qual existe pelo menos uma molécula ligadora separada complementar. Um membro ligador específico é uma molécula que liga, conecta ou de outra forma associa com

uma molécula específica. A ligação, junção ou associação pode ser química ou física. Uma molécula específica a qual um membro ligador específico se liga pode ser qualquer de uma variedade de moléculas incluindo, mas não limitadas a, antígenos, haptenos, proteínas, carboidratos, sequências nucleotídicas, ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos, enzimas e semelhantes. Ainda, um membro ligador específico de um tipo particular se ligará em um tipo particular de molécula. Em tais exemplos, os membros ligadores específicos são referidos como um “par de ligador específicos”. Consequentemente, um anticorpo se ligará especificamente a um antígeno. Outros pares de ligação específicas incluem avidina e biotina, carboidratos e lectinas, sequências nucleotídicas complementares, sequências peptídicas complementares, enzimas e co-fatores enzimáticos e semelhantes.

1. Nanopartículas Ativa – SERS Tendo um Membro Ligador Específico de um Par de Ligação Ligado Diretamente ao mesmo

[079]Em algumas modalidades, um membro ligador de um par ligador específico, por exemplo, um anticorpo, tal como um anticorpo monoclonal, pode ser ligado diretamente à superfície da nanopartícula. Em uma modalidade exemplar, um membro ligador específico de um par ligador, por exemplo, um anticorpo monoclonal, pode ser tratado com ligador, por exemplo, polietileno glicol (PEG), e ligado diretamente à nanopartícula através do ligador PEG.

[080]Como pode ser apreciado pelo versado na técnica, a seleção do ligador pode ser determinado por vários fatores dependendo dos objetos do ensaio. Por exemplo, o uso de PEG como um ligador pode estabilizar a orientação do anticorpo tal que o epítipo do antígeno é apontado para fora a partir da superfície da nanopartícula. Desta forma, a nanopartícula funcionalizada pode ser desenhada para maximizar a apresentação do epítipo ou outra região ligadora para solução teste, assim potencializando o aumento da sensibilidade do ensaio.

[081]Dependendo do membro ligador, outros ligadores podem ser utilizados. Por exemplo, alcanotióis podem ser utilizados como ligadores para anticorpos e peptídeos. Alcanotióis de cadeia curta, incluindo, mas não limitados a N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) e N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) podem ser utilizados como ligadores após desproteção sulfidril. Outras propriedades também podem determinar a escolha do ligador, tal como o comprimento da cadeia ligadora. Por exemplo, PEG pode ser desejável em que é também para proteger a superfície do reagente e é flexível, que pode aumentar a habilidade do reagente para ligar ao analito de interesse.

[082]Um membro ligador específico, tal como um anticorpo, também pode ser modificado com um ligador, tal como um ligador PEG tiolado, e ligado a nanopartícula.

2. Membros Ligadores Representativos

[083]Em algumas modalidades, o membro ligador conjugado com a nanopartícula ativa –SERS presentemente revelada, ou através da molécula repórter ativa – SERS ou diretamente ligada a uma superfície externa da nanopartícula por si própria, compreende um polipeptídeo ou proteína, tal como uma proteína ligadora de glicose. Membros ligadores representativos incluem, mas não são limitados a, membros ligadores específicos tendo uma afinidade para um analito alvo, incluindo ácidos nucleicos, domínios proteicos, fragmentos de anticorpos, células, e anticorpos para analitos alvos, tais como antígeno específico prostático (PSA), isoenzima creatina quinase MB (CKMB), proteína troponina I cardíaca (cTnI), hormônio estimulantes da tireóide (TSH), antígeno do influenza A (Flu A), antígeno do influenza B (Flu B), e antígeno do vírus sincicial respiratório (RSV). Anticorpos para tais analitos alvos são conhecidos na técnica.

[084]O analito e membro ligador pode atuar como parceiros ligantes. O termo “associado” ou “ligação” como aqui utilizado refere-se a parceiros ligantes

tendo uma constante de ligação relativa (K_d) suficientemente forte para permitir detecção de ligação à proteína por um meio de detecção. O K_d pode ser calculado como a concentração do analito livre em que metade da proteína está ligada, ou vice versa. Quando o analito de interesse é glicose, os valores de K_s para os parceiros ligantes são entre cerca de 0,0001 mM e cerca de 50 mM.

D. Ensaio de Diagnósticos Gerais

[085] Nanopartículas ativas – SERS podem ser utilizadas em ensaios diagnósticos. Por exemplo, Rohr *et al*, demonstrou um imunoensaio com detecção SERS incluindo múltiplos componentes e etapas de lavagens. Ver Rohr, T.E. *et al*, “Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy”, Anal. Biochem., 182:388 (1989). Também, Ni *et al*, demonstrou ligação repórter a uma lâmina de outro em um ensaio de detecção heterogênea incluindo incubação e etapas de lavagem. Ver Ni, J. *et al*, “Immunoassay Readout Methods Using Extrinsic Raman Markers Adsorbed on Immunogold Colloids”, Anal. Chem., 71:4903 (1999). Os ensaios SERS revelados por Rohr, *et al*, e Ni *et al*, bem como outros conhecidos na técnica, requerem incubações compridas e etapas de lavagens.

[086] Outros exemplos de ensaio utilizando SERS é revelado na Patente dos EUA No. 5.266.498 para Tarcha *et al*, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Tarcha *et al*, revela o uso de um sistema reagente múltiplo em que um marcador ou anticorpo é ligado a uma superfície SERS. Um segundo reagente contém o par complementar de ou do marcador ou anticorpo.

[087] Em algumas modalidades, as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas como marcadores ópticos em ensaios biológicos. Em algumas modalidades, a molécula alvo, por exemplo, um antígeno, para ser detectado é capturado por um primeiro parceiro ligante ligado a uma superfície sólida. Um segundo parceiro ligador, também específico para a molécula alvo, pode ser ligado a uma nanopartícula ativa – SERS. Quando um

analito está presente, ambos o primeiro e o segundo parceiros ligadores se ligarão ao alvo, então formando um sanduíche nanopartícula ativa – alvo – superfície sólida. A superfície sólida pode ser, por exemplo, um substrato imóvel ou uma partícula móvel.

E. Ensaios baseados em líquidos

[088]Abordagens de ensaio baseado em líquido utilizando nanopartículas ativas – SERS têm sido previamente reveladas. Ver, por exemplo, Hirsch *et al*, “A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells”, *Anal. Chem.*, 75 (10, 2377-2381 (2003), que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Hirsch *et al*, revela a detecção óptica da agregação da partícula em presença de um analito de interesse por medir mudanças de absorção óptica devido a interações de partículas. A agregação das nanopartículas no ensaio revelado por Hirsch *et al*, detecta a ressonância de plasmon diminuída que ocorre como um resultado da agregação de partículas. Hirsch *et al*, entretanto, não revela o uso de sinais Raman para detecção.

[089]Em uma modalidade dos ensaios presentemente revelados, partículas ativas –SERS podem ser utilizadas em um ensaio chamado “sem lavagem” ou “homogêneo”. Em tal ensaio, uma amostra é coletada em um recipiente, por exemplo, um recipiente coletor de espécime, um recipiente de ensaio ou outro recipiente de amostra adequado para uso com os ensaios presentemente revelados, e o ensaio feito sem a necessidade de remover a amostra a partir do recipiente, por exemplo, um recipiente de ensaio. Vantajosamente, a amostra pode ser coletada em um recipiente que pode já conter todos os reagentes necessários para fazer o ensaio. Em algumas modalidades, entretanto, um ou mais reagentes podem ser adicionados para o recipiente seguindo a coleta do espécime. Recipientes representativos adequados para uso com os ensaios presentemente revelados são descritos em detalhes adicionais na Seção III aqui abaixo.

[090]Em outras modalidades, as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas em ensaios heterogêneos. Como aqui utilizado, o termo “ensaio heterogêneo” geralmente refere-se a um ensaio em que um ou mais componentes do ensaio são adicionados ou removidos a partir do ensaio sequencialmente. Mais particularmente, um ensaio heterogêneo pode confiar, em parte, na transferência do analito a partir de uma amostra líquida para uma fase sólida por ligação do analito durante o ensaio para a superfície da fase sólida. Em algum estágio do ensaio, aquelas sequências variam dependendo do protocolo de ensaio, a fase sólida e a fase líquida são separadas e a determinação levando a detecção e/ou quantificação do analito é feita em uma das duas fases separadas. Então, um ensaio heterogêneo, por exemplo, pode incluir um suporte sólido revestido com um antígeno ou anticorpo que se liga a um analito de interesse e assim separa ou remove o analito a partir de outros componentes na amostra sobre teste. Esses outros componentes podem ser seletivamente removidos a partir da amostra por um ou mais etapas de lavagem e o analito permanece ligado ao suporte sólido, onde ele é detectado, ou pode ser removido por uma etapa de lavagem adicional e subsequentemente detectado.

[091]Em ensaios baseados em líquido, a amostra tipicamente é incubada, por exemplo, em condições ambientes, mas é também possível prover condições controladas, tal como uma temperatura específica ou balanço da amostra. Seguindo o período de incubação, o recipiente pode então tomar lugar em um leitor para obter um sinal de uma ou mais partículas ativas – SERS que foram pré-carregadas ou subsequentemente adicionadas em um recipiente. Um sinal Raman é produzido, e detectado, sob interrogação por radiação incidente de um comprimento de onda particular, por exemplo, radiação a laser.

1. Analito(s) Alvo(s) de Superfície Imobilizada de Interesse

[092]Em algumas modalidades de ensaios baseados em líquido, o(s) analito(s) alvo(s) de interesse é(são) imobilizados(s), por exemplo, em uma área localizada de um suporte sólido, tal como uma superfície interna funcionalizada de um recipiente, por exemplo, um recipiente de coleta de espécime ou recipiente de ensaio. O(s) analito(s) alvo(s) imobilizado(s) de interesse podem então contactar com um reagente de detecção compreendendo nanopartículas ativas – SERS conjugadas com um membro ligador específico, por exemplo, um anticorpo, tendo uma afinidade para o(s) analito(s) alvo(s) de interesse. As nanopartículas ativas – SERS podem interagir ou se associarem com, por exemplo, serem reversivelmente ou irreversivelmente ligadas ao(s) analito(s) alvo(s) imobilizado(s) de interesse. Seguindo um tempo de incubação adequado, esta interação entre a nanopartícula ativa – SERS e o(s) analito(s) alvo(s) imobilizado(s) pode ser detectada por iluminação da área localizada do suporte sólido com radiação incidente do comprimento de onda apropriado e medindo o sinal SERS emitido por molécula repórter ativa – SERS. Ainda, porque cada tipo de moléculas repórter ativas – SERS exibe um espectro SERS único, um espectro SERS único pode ser utilizado para detectar uma pluralidade de analitos alvos de interesse pode inclusão nas nanopartículas ativas – SERS compreendendo diferentes moléculas repórter ativas – SERS no reagente de detecção. Consequentemente, as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas em um formato de ensaio multiplexado.

2. Seleção e Uso do Repórter

[093]Moléculas repórter preferivelmente exibem espectros Raman relativamente simples com larguras de linhas estreitas. Esta característica permite a detecção de várias espécies ativas – Raman diferentes no mesmo volume de amostra. Consequentemente, esta característica permite múltiplas nanopartículas ativas – SERS, cada incluindo corantes diferentes, serem fabricadas tal que o

espectro Raman de cada corante pode ser distinguido em uma mistura de diferentes tipos de nanopartículas. Esta característica permite para a detecção multiplex de várias espécies alvos diferentes em um pequeno volume de amostra. Então, nanopartículas tendo as moléculas repórter associadas com ou ligadas a mesma também são adequadas para uso em ensaios químicos multiplexados, em que a identidade da nanopartícula ativa – SERS codifica a identidade do alvo no ensaio.

[094]Tais moléculas repórter, quando associadas com ou ligadas a nanopartículas ativas – SERS, provêm diversidade espectral e resolvabilidade em ensaios multiplex. Cada nanopartícula ativa – SERS, quando acoplada com um reagente alvo-específico, pode codificar a identidade daquela molécula alvo particular. Ainda, a intensidade de um sinal Raman particular pode revelar a quantidade desta molécula alvo particular. Consequentemente, nanopartículas ativas – SERS podem ser utilizadas em ensaios multiplexados para produzir informação qualitativa e/ou quantitativa em relação a uma molécula alvo sem requerer localização sensível a posição de reagentes.

[095]Um reagente de detecção pode incluir mais que um tipo de marcação, por exemplo, mais que um tipo de molécula repórter ativa – SERS, dependendo dos requerimentos do ensaio. Por exemplo, tipos diferentes de moléculas repórter ativas – SERS podem exibir um sinal Raman, isto é, um espectro Raman ou característica espectral Raman, em diferentes comprimentos de onda e podem ser utilizados para criar uma “impressão digital” Raman para um analito específico de interesse, assim aumentando a especificidade do ensaio. Moléculas repórter diferentes podem ser ligadas a diferentes membros ligadores específicos para aproveitar um reagente capaz de detectar mais que um analito de interesse, por exemplo, uma pluralidade de analitos de interesse. Ainda, moléculas repórter múltiplas podem ser utilizadas para criar um sinal de referência interno que pode ser utilizado para distinguir o ruído basal a partir da detecção do sinal, particularmente em amostras que exibem ou são

esperados exibir um sinal relativamente fraco. Adicionalmente, mais que uma molécula repórter SERS pode ser utilizada para evitar ou superar radiação não específica emitida a partir da solução de amostra sobre teste, isto é, radiação emitida a partir da solução de amostra que não pode ser atribuída para medidas diretas ou indiretas de um analito de interesse.

F. Captura Magnética em Ensaios baseados em Líquido

[096]Em algumas modalidades de ensaios baseados em líquido, um reagente de captura magnética pode ser utilizado para facilitar a localização de partículas no recipiente de ensaio. Em tais modalidades, partículas de captura magnéticas podem ser marcadas com um membro ligador que tem uma afinidade para um ou mais analitos de interesse. Tais partículas de captura magnéticas pode se ligar a um ou mais analitos de interesse, que também pode se ligar a uma nanopartícula ativa – SERS, para formar um complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa. As propriedades magnéticas das partículas de captura magnéticas podem ser utilizadas para localizar o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa em uma área pré-determinada dentro do recipiente de ensaio para detectar o sinal SERS.

[097]Consequentemente, em algumas modalidades, o complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa é localizado em uma área pré-determinada dentro do recipiente de ensaio, por exemplo um recipiente ou tubo coletor de espécime. A localização do complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa pode aumentar a interação molécula repórter – superfície e aumenta o sinal por concentrar o efeito SERS para uma área do recipiente de ensaio.

[098]Captura magnética das partículas podem ser realizadas utilizando qualquer método conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a colocar um magneto forte ou induzir um campo magnético em uma área localizada do recipiente

de ensaio. O campo magnético pode ser induzido, por exemplo, por um ou mais magnetos permanentes ou eletromagnetos.

[0099]Mais particularmente, em algumas modalidades, as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas, conjugadas com um membro ligador específico tendo uma afinidade para o(s) analito(s) alvo(s) de interesse pode ser disposto em um recipiente, por exemplo, um recipiente coletor de espécime, ou antes de, concorrente com, ou subsequente para dispor aqui uma amostra biológica suspeita de conter um ou mais analitos alvo de interesse. Partículas magnéticas, também conjugadas com um membro ligador específico tendo uma afinidade para o(s) analito(s) alvo(s) de interesse, pode ser disposto em um recipiente. Analito(s) alvo(s) de interesse presentes na amostra podem se ligar a nanopartículas ativas – SERS e a partículas magnéticas, assim formando um complexo, por exemplo, um complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa, em que o(s) analito(s) alvo(s) é um sanduíche entre SERS – nanopartícula ativa e a partícula magnética. Ver, por exemplo, Figura 1, que mostra um ensaio de captura magnética representativo adequado para uso com a matéria presentemente revelada.

[0100]Referindo agora a Figura 1, um diagrama esquemático de um ensaio de captura magnética representativo para detectar a presença de um ou mais analitos em uma amostra biológica é mostrado. O ensaio de captura magnética presentemente revelado inclui uma ou mais partículas de captura magnéticas 100, que tem associada a mesma pelo menos um membro ligador específico 110a tendo uma afinidade para um ou mais analitos 130 de interesse em uma amostra biológica. O ensaio também inclui uma ou mais nanopartículas ativas – SERS 120, que têm associada às mesmas pelo menos um membro ligador 110b tendo uma afinidade para um ou mais analitos 130. Membro ligador 110b associado com nanopartícula ativa – SERS 120 pode ser o mesmo ou diferente que o membro ligador 110a associado com partículas de captura magnéticas 100. Partícula magnética 100 e

nanopartícula ativa – SERS 120 são contactadas com uma amostra biológica compreendendo um ou mais analitos 130 de interesse e incubados por um período de tempo para formar complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa 140, por exemplo, uma estrutura “sanduíche” anticorpo-antígeno, se um ou mais analitos 130 estão presentes na amostra biológica. Complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa 140 é exposto a um campo magnético (não mostrado) para induzir complexo 140 para migrar para uma área localizada do recipiente 150, por exemplo, um recipiente de ensaio ou recipiente de coleta de espécime, para formar concentrado 160. Concentrado 160 é iluminado com radiação incidente em um ou mais comprimentos de onda, por exemplo, em um sistema como mostrado na Figura 4, para induzir a molécula repórter ativa – SERS para produzir um sinal detectável para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica. Um versado na técnica sob revisão da matéria presentemente revelada pode reconhecer que partícula de captura magnética 100, nanopartícula ativa – SERS 120, e combinações dos mesmos, podem ser incluídas em um recipiente 150 antes da amostra ser disposta na mesma, ou podem ser adicionadas ao recipiente 150 antes de, concorrente com, ou subsequente a disposição da amostra no mesmo;

[0101]Consequentemente, em algumas modalidades, enriquecimento de partícula magnética pode ser utilizado vantajosamente nos ensaios presentemente revelados. Em uma tal abordagem, partículas ativas –SERS tendo um ou mais padrões de captura para o(s) analito(s) de interesse ligado ao mesmo pode estar presente em um recipiente, por exemplo, um recipiente de coleta de espécime, antes da coleta da amostra, ou, em algumas modalidades, adicionado após a coleta. Durante a fase de incubação, analitos alvos são ligados na superfície de partícula ativa – SERS por padrões de captura. Partículas magnéticas, também tendo ligadas a elas padrões de captura para o(s) alvo(s) de interesse, que tem sido providos no

recipiente podem se ligar a diferentes epítomos no(s) mesmo(s) alvo(s), por exemplo, um ou mais analitos de interesse, e então formar complexos onde o analito alvo é feito de sanduíche entre nanopartícula ativa – SERS e uma partícula magnética. Um magneto pode então ser utilizado para concentrar esses sanduíches em um espaço especificado, isto é, para formar um concentrado, no recipiente. O magneto pode ou ser aplicado antes do recipiente ser colocado no leitor ou pode ser integrado no leitor. Radiação incidente de um comprimento de onda desejado, por exemplo, uma irradiação a laser, pode então ser focado no concentrado dos complexos do sanduíche nanopartícula ativa – SERS – alvo – partícula magnética e sinal SERS é obtido a partir das nanopartículas ativas – SERS.

[0102]Como também revelado em maiores detalhes aqui, as modalidades de captura magnética dos ensaios presentemente revelados também podem incluir contato com múltiplos tipos de nanopartículas ativas – SERS com a amostra, em que cada tipo de nanopartícula ativa SERS tem ligada a mesma uma molécula repórter ativa – SERS que exibe um sinal Raman único. Tais modalidades podem ser utilizadas para detectar uma pluralidade de analitos de interesse, referidos aqui como multiplexação.

G. Referenciamento e Controle no Ensaio baseado em Líquido com Força Magnética

[0103]Imunoensaios convencionais, detecção de um antígeno pode ocorrer por “fazer um sanduíche” do antígeno entre dois anticorpos, um dos quais é marcado com um repórter pótico, colorimétrico ou radiométrico. O sinal medido, por exemplo, um repórter óptico, colorimétrico ou radiométrico pode então ser utilizado para determinar a concentração do antígeno presente na amostra. Imunoensaios convencionais como o Ensaio de imunoadsorção ligada a enzima (ELISA) são exemplos deste tipo de tecnologia. Um problema com esta abordagem técnica, é que a magnitude do sinal óptico depende de vários fatores em adição a presença

e/ou quantidade de antígeno. Por exemplo, o alinhamento e desempenho dos ópticos pode impactar o sinal medido. Tipicamente, para evitar este problema, amostras controles adicionais tendo concentrações conhecidas de antígeno são medidas.

[0104]Em uma modalidade da matéria presentemente revelada, como notado abaixo, um sinal mensurável é gerado por formar um complexo mediado por antígeno entre um nanotag marcado com SERS e uma partícula de captura magnética. Os complexos podem ser separados a partir da solução por aplicação de um campo magnético e o sinal óptico a partir do concentrado magnético resultante é medido.

[0105]A posição do concentrado magnético relativo aos ópticos interrogativos podem afetar a magnitude do sinal óptico medido e ultimamente, a calibração do ensaio. Em adição, a forma do concentrado magnético pode não sempre ser consistente. Por exemplo, alterando a funcionalidade da superfície das partículas magnéticas pode mudar a densidade e/ou a forma do concentrado.

[0106]De acordo com as modalidades da matéria presentemente revelada, é possível compensar para variações em tamanho de concentrado, forma ou posição. Esses métodos também são aplicáveis para outros formatos de ensaio em que um concentrado é formado. Em uma modalidade, partículas magnéticas utilizadas para força magnéticas são marcadas com um marcador de referência em adição aos padrões de captura, por exemplo, anticorpos específicos para o antígeno de interesse. A marcação de referência pode ser qualquer fração capaz de gerar (por si próprio ou sob algum tipo de estímulo) um sinal detectável, incluindo, mas não limitado a fluoróforos, corantes orgânicos, elementos terrosos raros, e repórteres Raman, e também podem incluir partículas compreendendo tais componentes. Exemplos específicos de marcadores de referência incluem partículas ativas – SERS

do tipo revelado aqui e partículas de sílica tendo fluoróforos distribuídos em todas as partículas de sílica.

[0107]Um exemplo de incorporação de uma referência marcada em um ensaio é ilustrada na Figura 2. O ensaio de captura magnética presentemente revelado incorpora uma um marcador de referência inclui uma ou mais partículas de captura magnética 200, que têm associadas a elas pelo menos um membro de ligação específica 210a tendo uma afinidade para um ou mais analitos 240 de interesse em uma amostra biológica. Nesta modalidade, uma ou mais partículas de captura magnéticas 200 também têm associadas a elas pelo menos um marcador de referência 230 capaz de gerar um sinal detectável. Em algumas modalidades, marcador de referência 230 compreende uma nanopartícula ativa – SERS tendo uma molécula repórter diferente que uma ou mais nanopartículas ativas –SERS 220 que forma complexo 250 com um ou mais analitos 240.

[0108]O ensaio também inclui uma ou mais nanopartículas ativas – SERS 220, que têm associadas as mesmas pelo menos um membro ligador 210b tendo uma afinidade para um ou mais analitos 240. Membro ligador 210b associado com nanopartícula ativa – SES 220 pode ser a mesma ou diferente que o membro ligador 210a associado com partículas de captura magnéticas 200.

[0109]Como com o ensaio descreve na Figura 1, partícula magnética 200 e nanopartícula ativa – SERS 220 são contactadas com uma amostra biológica compreendendo um ou mais analitos 240 de interesse e incubada por um período de tempo para formar complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa 250 se um ou mais analitos 240 estão presentes na amostra biológica. Complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa 250 é exposto a um campo magnético (não mostrado) para induzir complexo 250 a migrar para uma área localizada de um recipiente, por exemplo, um recipiente de ensaio ou

recipiente de coleta de espécime, para forar concentrado como mostrado previamente na Figura 1.

[0110] Todas as partículas magnéticas no recipiente (se complexadas ou não) são colocadas na área localizada do recipiente, por exemplo, uma área de leitura óptica. O concentrado compreendendo complexo captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa 250 é iluminada com radiação incidente em um ou mais comprimentos de onda, por exemplo, em um sistema como mostrado na Figura 4, para induzir nanopartícula ativa – SERS 220 para produzir um primeiro sinal detectável e marcador de referência 230 para produzir um segundo sinal detectável. O primeiro sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS 220 pode ser comparado ao segundo sinal detectável 230 para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos 240 na amostra biológica.

[0111] O sinal Raman a partir da partícula 220 é relacionado à quantidade do analito 240, por exemplo, um antígeno, presente; embora o sinal a partir do marcador de referência 230, por exemplo, a nanopartícula tendo uma molécula repórter – SERS diferente que a partícula 220, age como uma referência e corrige para variações na forma do concentrado, densidade, e/ou posição. Então, calibração pode ser baseada em uma comparação da intensidade do Repórter 1, por exemplo, partícula 220, para a intensidade do Repórter 2, por exemplo, marcador de referência 230. Por exemplo, o sinal pode ser calculado por como $(\text{intensidade do Repórter 1})/(\text{intensidade Repórter 2})$, em outras palavras, a proporção da intensidade do Repórter 1 relativa a intensidade do Repórter 2.

[0112] Embora Figura 2 mostra uma partícula ativa –SERS por partícula de captura magnética, marcadores de referência múltipla / partículas por partícula magnética são possíveis ou, alternativamente, uma fração das partículas de captura magnéticas podem ser marcadas com uma ou mais referências, enquanto o resíduo das partículas de captura magnética é livre de referência.

[0113] Como com o ensaio mostrado na Figura 1, um versado na técnica sob revisão da matéria presentemente revelada pode reconhecer que a partícula de captura magnética 200, nanopartícula ativa – SERS 220, e combinações das mesmas, podem ser incluídas no recipiente antes da amostra ser disposta no mesmo, ou podem ser adicionadas ao recipiente antes de, concomitante com, ou subsequente a disposição da amostra no mesmo.

[0114] A matéria presentemente revelada também compreende modalidades nas quais o sanduíche partícula magnética – SERS – nanopartícula ativa é pré-complexado e pode ser utilizado com os métodos presentemente revelados como um marcador de referência. Este complexo inerte, isto é, não complexa com o analito de interesse. Uma quantidade conhecida de tais partículas pré-complexadas pode ser adicionada a uma amostra como uma referência.

H. Uso de Reagente de Lise em Ensaio baseado em Líquido

[0115] Em uma modalidade adicional, um reagente de lise pode ser utilizado em um ensaio, tal como um ensaio baseado em líquido, com ou sem força magnética. Quando utilizado em matrizes biológicas, tais como sangue humano, plasma, ou soro, um reagente de lise pode prover um sinal aumentado e/ou aumentar o limite de detecção para biomarcadores. Em particular, quando utilizado em um imunensaio utilizando partículas ativas – SERS, a adição de um reagente de lise aumenta a intensidade Raman quando comparado às amostras que não contém o reagente de lise.

[0116] Um reagente de lise adequado para uso com os métodos presentemente revelados incluem um ou mais dos seguintes componentes: tampão (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico)(HEPES), cloreto de sódio, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), beta glicerofosfato, Triton® e inibidores de protease, e combinações dos mesmos. Ver, por exemplo, Hirsch, L. R. *et al*; “A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells”, *Anal. Chem.* 75, 2377-2381

(2003). Muitos detergentes são adequados para uso como um reagente lisante. Exemplos representativos de detergentes aniônicos incluem, mas não são limitados a, os sais de ácido cólico, ácido caprílico, dodecil sulfato de sódio (SDS), e ácido deoxicólico. Exemplos representativos de detergentes catiônicos incluem, mas não são limitados a, cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio. Exemplos representativos de detergentes anfotéricos incluem, mas não são limitados a, ácido 3[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-propanossulfônico (CHAPS) e fosfatidilcolina. Exemplos representativos de detergente não iônicos incluem, mas não são limitados a, digitonina, Tween® 20 (monolaurato de polioxietilenosorbitano) e Triton® X-100. Os reagentes de lise também podem incluir inibidores de proteases, incluindo, mas não limitados a aprotinina, EDTA. Leupeptina, α -macroglobulina, pepstatina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), e tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), e pode ser selecionado dependendo do alvo de protease particular.

[0117]Outras reagentes de lises adequados para uso com a matéria presentemente revelada incluem, mas não são limitados a ditiotreitol, ácido etileno glicol tetraacético (EGTA), colato de sódio, deoxicolato de sódio, NP-40, ácido glicocólico, taurocolato de sódio, ácido taurodeoxicólico, brometo de hexadeciltrimetilamônio, Brij 35, Brij 58P, N-decanoil-N-metilglucamina, Igepal CA-630, N-Nonanoil-N-metilglucamina, octil-b-D-1-tioglu copiranosídeo, Span 20, Triton® X-114, Tween® 40, Tween ® 80, 3-(4-heptil)fenil 3-hidróxi propil)dimetilamônio propano sulfonato, e amidosulfobetaina-14. Reagentes de lise também pode ser utilizados para lisar células.

[0118]Um versado na técnica pode apreciar que outros reagentes de lise conhecidos na técnica também são adequados para uso com os métodos presentemente revelados. Ainda, um versado na técnica pode apreciar que o reagente de lise é contactado com a amostra em uma quantidade efetiva para lisar

substancialmente todos os conteúdos celulares da amostra. Um exemplo deste método é provido no Exemplo 2.

[0119] Como provido no Exemplo 2, em imunoensaios detectados por SERS, adição de um reagente de lise a uma amostra sobre teste resulta em níveis de sinal mais altos e/ou sensibilidade aumentada para detecção do biomarcados em matrizes biológicas quando comparadas às amostras não contendo reagente de lise. Sensibilidade aumentada oferece muitos benefícios, por exemplo, o “tempo para resultar” pode ser diminuído e o resultado do paciente pode potencialmente ser aumentado. Os sinais Ramans maiores observados em presença do reagente de lise também pode levar a custos de instrumentação reduzidos. O reagente de lise pode ser utilizado para aumentar a sensibilidade para uma variedade de ensaios, incluindo mas não limitados a, ensaios de fluxo lateral, ensaios de imunosorventes ligados a enzima, e ensaios de ressonância de plasmon de superfície. O reagente de lise também pode ser utilizado para tratar tipos de amostras biológicas outras que sangue, soro ou plasma, tal como saliva para detecção de tuberculose, ou qualquer outro tipo de espécime utilizado para diagnósticos que requerem a detecção de um biomarcador. Componentes individuais no reagente de lise podem ser utilizados sozinhos ou em combinações para alcançar efeitos similares.

I. Instrumentação Representativa para Detectar um Sinal SERS Emitido por uma Amostra Sobre Teste

[0120] Agora referente a Figura 4, um sistema representativo para uso com os ensaios presentemente revelados é provido. Sistema 400 inclui fonte de luz 402 capaz de produzir radiação eletromagnética capaz de induzir um sinal Raman em uma partícula ativa –SERS. Em algumas modalidades, fonte de luz 402 é um laser, que em algumas modalidades é um laser capaz de operar na região espectral perto do infra-vermelho, por exemplo, um laser diodo no estado sólido com um comprimento de onda de emissão de cerca de 785 nm. Radiação eletromagnética

emitida a partir da fonte de luz 402, por exemplo, luz de um ou mais comprimentos de onda particulares, podem ser direcionados por fibra 404 para lentes 406a. Fibra 404 pode ser qualquer fibra óptica adequada para uso com o sistema presentemente revelado. Por exemplo, fibra 404 pode ser fibra única 404a ou fibra feixe 404b.

[0121] Lentes 406a expandem a luz transmitida através da fibra 404 e direcionam a luz através do filtro 407a, que pode ser, em algumas modalidades, um filtro passa-faixa, e em separador de saída de feixe de luz 408, por exemplo, um separador de saída de feixe de luz dielétrico. Uma porção de luz incidente no separador de saída de feixe de luz 408 é direcionada para as lentes 406b, que focam a luz na amostra 412, que é contida no recipiente 410, por exemplo, um recipiente de coleta de espécime ou um ensaio que é contido no recipiente 410, por exemplo, um recipiente de coleta de espécime ou um recipiente de ensaio. Amostra 412 pode compreender um ou mais complexos captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa como aqui revelados. A luz incidente na amostra 412 é capaz de induzir um sinal SERS, isto é, dispersores de radiação, a partir dos complexos captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa compreendendo amostra 412. Radiação dispersa emitida a partir da amostra 412 é coletada por lentes 406b e é direcionada para separador de saída de feixe de luz 408. Uma porção da radiação dispersa é transmitida através do separador de saída de feixe de luz 408 e direcionada para o filtro 407b, por exemplo, um filtro de longa passagem. Após passar através do filtro 407b, a radiação dispersa é direcionada às lentes 406c, que focam a radiação dispersa na fibra 414. A fibra 414 pode ser qualquer fibra óptica adequada para uso com o sistema presentemente revelado. Por exemplo, fibra 414 pode ser uma fibra única 414a ou rede de fibra 414b. Fibra 414 direciona a radiação dispersa para o espectrômetro 416, que, em algumas modalidades, incluem dispositivo acoplado a carga (CCD) 418.

[0122]Em algumas modalidades, um laser serve como uma fonte de excitação da radiação incidente utilizada para detectar um ou mais analitos alvos de interesse. Um versado na técnica sob revisão da matéria presentemente revelada pode verificar o tipo de laser, incluindo a força e excitação do comprimento de onda, adequado para uso com as moléculas repórter ativas – SERS descritas aqui. Radiação dispersa ou emitida a partir da amostra pode ser detectada utilizando sistemas de detecção conhecidos na técnica.

[0123]Em algumas modalidades, mais que um tipo de fonte de radiação, ou mais que um comprimento de onda de excitação, podem ser utilizados. Por exemplo, em modalidades em que dois analitos de interesse são para serem detectados, o reagente pode incluir dois tipos distintos de moléculas repórter ativas – SERS e/ou dois tipos distintos de membros ligadores específicos. Em outras modalidades, radiação incidente de um comprimento de onda pode ser utilizada para induzir espectro Raman a partir de duas ou mais moléculas repórter ativas – SERS. Em algumas modalidades, entretanto, a radiação incidente de comprimentos de onda diferentes podem ser utilizados para produzir sinais Raman distintos para cada analito de interesse. Como um versado na técnica pode reconhecer sob revisão da matéria presentemente revelada, a seleção do(s) comprimento (s) de onda(s) particular(es) para ser utilizado(s) no analito de interesse, os membros ligadores específicos utilizados, e as moléculas repórter ativas – SERS particulares utilizadas.

[0124]O ensaio presentemente revelado pode ser conduzido com qualquer sistema espectrômetro Raman adequado conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, um Espectrômetro Raman Múltiplo Multimodo (Centice, Morrisville, Carolina do Norte, Estados Unidos da América), tal como o sistema espectrômetro raman revelado na Patente dos EUA No. 7.002.679 para Brady *et al*, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Mais particularmente, um sistema e método para um ensaio de espectroscopia Raman utilizando partículas

paramagnéticas é revelado na Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. 2006/0240572 para Carron *et al*, e um sistema de espectrômetro Raman adequado para uso com os ensaios presentemente revelados é revelado na Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. 2005/0248758 para Carron *et al*, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0125] Dispositivos sensíveis, tal como detectores ópticos, fontes de radiação, e sistemas de computador, microprocessadores, e programa de computador e algoritmos podem ser utilizados em qualquer combinação na prática dos métodos revelados aqui. Consequentemente, em algumas modalidades, programa, ou outras instruções claras em computador podem ser utilizadas para interpretar, analisar, compilar, ou de outra forma dividir o emissor dados relacionados ao ensaio óptico presentemente revelado. O programa ou outro sistema de computador podem ser utilizados para mostrar, armazenar, ou transmitir emissor de dados, seja na forma digital ou outras formas para um ou mais usuários.

J. Método para Amplificar um Sinal SERS em um Ensaio baseado em Líquido

[0126] Ensaios biológicos sempre requerem ainda detecção sensível das biomoléculas em uma variedade de meios. Uma abordagem para o desenvolvimento de ensaios mais sensíveis é aumentar o sinal emissor do ensaio. O método presentemente revelado demonstra que, em algumas modalidades, um sinal aumentado de um fator de três ou mais é possível. Consequentemente, em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método para amplificar o sinal emissor em um ensaio baseado em líquido no tipo descrito acima e mostrado na Figura 1.

[0127] O método de amplificação de acordo com uma modalidade começa com uma amostra sendo adicionada a uma solução contendo ambos, uma partícula de captura magnética e uma molécula repórter, tal como, mas não limitado a, como

nanopartícula ativa – SERS compreendendo uma molécula repórter SERS, e incubada por um curto período de tempo, durante o qual um complexo sanduíche compreendendo a partícula de captura magnética, analito e molécula repórter pode ser formado.

[0128]A amplificação de sinal característica da matéria presentemente revelada aumenta a partir da adição de outra alíquota da molécula repórter, por exemplo, outra alíquota de nanopartículas ativas –SERS tendo as mesmas capacidades produtoras de sinal, por exemplo, a mesma molécula repórter Raman, como a primeira alíquota adicionada a solução de ensaio, antes das partículas de captura magnética serem localizadas. Esta segunda alíquota da molécula repórter, por exemplo, uma segunda alíquota de nanopartículas ativas – SERS, anticorpos presentes (ou outras moléculas, por exemplo, um membro ligador específico) que reconhece o anticorpo na primeira alíquota das moléculas repórter, por exemplo, nanopartículas ativas – SERS, originalmente presentes no ensaio. A presença da segunda alíquota das moléculas repórter em um número mais alto de moléculas repórter por sanduíche na amostra sobre teste e assim um sinal mais alto por complexo sanduíche.

[0129]Por exemplo, como mostrado na Figura 7, nanopartículas ativas – SERS revestidas com um anticorpo que reconhece anticorpos não ligador na primeira alíquota da nanopartículas ativas – SERS podem ser adicionadas para a solução de ensaio. Quando esses anticorpos secundários se ligam a primeira alíquota das nanopartículas ativas – SERS, o nível de sinal vai a partir de uma nanopartícula ativa – SERS por complexo sanduíche para três.

[0130]Mais particularmente, referido agora à Figura 7, um diagrama esquemático representativo do ensaio presentemente revelado utilizando método de amplificação mostrado. O ensaio presentemente revelado inclui uma u mais partículas de captura magnética 700, que tem associada a mesma pelo menos um

membro ligador específico 710a tendo uma afinidade para um ou mais analitos 730 de interesse em uma mostra biológica. O ensaio também inclui uma primeira alíquota de um ou mais moléculas repórteres 720 capazes de produzir um sinal detectável, por exemplo, uma ou mais nanopartículas ativas – SERS, que têm associada as mesmas pelo menos um membro ligador 710b tendo uma afinidade para um ou mais analitos 730. Membro ligador 710b associado com molécula repórter 720 pode ser o mesmo ou diferente que o membro ligador 710a associado com partículas de captura magnética 700. Partículas magnética 700 e molécula repórter 720 são contactadas com uma amostra biológica compreendendo um ou mais analitos 730 de interesse e incubados por um período de tempo para formar o complexo partícula de captura magnética-analito-molécula repórter 740, por exemplo, uma estrutura “sanduíche” antígeno-anticorpo, se um ou mais analitos 730 estão presentes na amostra biológica.

[0131]O ensaio mostrado na Figura 7, então inclui uma segunda alíquota de uma ou mais moléculas 750 capazes de produzir um sinal detectável tendo associada a mesma pelo menos um membro ligador específico 710c tendo uma afinidade para o membro ligador específico 710b da primeira alíquota das moléculas repórteres 720. A segunda alíquota das moléculas repórteres 750 podem ser dispostas em recipientes 760 antes de, concomitante com, ou subsequente a disposição da amostra e/ou a primeira alíquota de uma ou mais moléculas repórteres 720 aqui, em que uma ou mais moléculas repórteres da segunda alíquota da moléculas repórteres 750 é a mesma como uma ou mais molécula repórteres da primeira alíquota das moléculas repórteres 720.

[0132]Complexo 740, compreendendo um complexo sanduíche de partícula de captura magnética 700, analito 730, molécula repórter 720, tendo uma molécula repórter associada a mesma 750, é exposta a um campo magnética (não mostrado) para induzir complexo 740 para migrar para uma área localizada do recipiente 760,

por exemplo, um recipiente de ensaio ou recipiente coletar de espécime, para formar concentrado 770. Concentrado 770 é iluminado com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas, por exemplo, em um sistema como mostrado na Figura 4, para induzir a molécula repórter para produzir um sinal detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

[0133]Um versado na técnica sobre revisão da matéria presentemente revelada pode reconhecer que partícula de captura magnética 700, molécula repórter 720, moléculas repórter 750, e combinações dos mesmos, podem ser incluídos em recipiente 760 antes da amostra ser disposta no mesmo, ou pode ser adicionada ao recipiente 760 antes de, concomitante com, ou subsequente a disposição da amostra nele;

[0134]Dependendo da forma do ensaio, a segunda alíquota dos marcadores SERS pode ser adicionada em qualquer estágio, por exemplo, sequencialmente ou concomitantemente com a primeira alíquota dos marcadores SERS, ou sequencialmente ou concomitante com a amostra. Também, para evitar um grande aumento no ruído basal no ensaio, é preferível que a biomolécula na superfície da segunda nanopartícula ativa – SERS não reconhece a biomolécula na superfície na partícula de captura magnética. No caso de um imunensaio, esta característica pode ser realizada por biomoléculas imunobilizadas, por exemplo, anticorpos que originam em diferentes espécies na nanopartículas de captura magnética e nanopartícula ativa – SERS. Por exemplo, em algumas modalidades, a solução de ensaio inicial pode incluir partículas de captura magnética tendo anticorpos produzidos em cabra e a nanopartícula ativa – SERS pode apresentar anticorpos feitos em camundongos. Se a segunda alíquota de nanopartículas ativas – SERS é marcada com um anticorpo anti-camundongo, nenhuma ligação à partícula de captura magnética ocorrerá. O método de amplificação presentemente revelado

pode ser utilizado para detectar virtualmente qualquer analito, incluindo DNA, provendo dois parceiros de ligação com epítomos ortogonais que são utilizados.

[0135]Um benefício adicional do emissor de sinal aumentado em um dado ensaio é que sistemas de detecção menos sofisticados (e menos caros) podem ser utilizados para testar para um analito.

[0136]Agora em referência a Figura 8, resultados representativos da estratégia de amplificação presentemente revelada são providos. Figura 8A mostra uma curva de ligação típica para um ensaio de proteína homogênea sem amplificação como mostrado previamente na Figura 1. O eixo Y é emissor de um algoritmo que quantifica o nível de sinal SERS para cada amostra. Figura 8B mostra o ensaio feito com o reagentes idênticos e concentrações com a etapa de amplificação mostrado na Figura 7. O gráfico mostra aumento de sinal de três vezes ou mais sob inclusão da etapa de amplificação.

[0137]O método presentemente revelado pode ser utilizado para detectar virtualmente qualquer analito provendo dois parceiros ligadores com epítomos ortogonais que são utilizados. Por exemplo, em algumas modalidades, o método de amplificação presentemente revelado pode ser utilizado para detectar um polinucleotídeo. O uso do termo “polinucleotídeo” não é tencionado limitar os métodos presentemente revelados para polinucleotídeos compreendendo DNA. Os versados na técnica reconhecerão que polinucleotídeos podem compreender ribonucleotídeos e combinações de ribonucleotídeos e deoxiribonucleotídeos. Tais deoxiribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem ambos, moléculas de ocorrência natural e análogos sintéticos. Mais particularmente, o termo “polinucleotídeo” é tencionado compreender um ácido nucléico singular, bem como ácidos nucléicos no plural, e refere-se a uma molécula de ácido nucléico isolada ou construída, por exemplo, RNA mensageiro (mRNA), DNA plasmídeo (pDNA), ou RNA de curta interferência (siRNA). Um polinucleotídeo pode ser de fita simples ou fita dupla,

linear ou circular. Um polinucleotídeo pode compreender uma ligação fosfodiéster convencional ou uma ligação não convencional (por exemplo, uma ligação amida, tal como encontrada em ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). O termo “ácido nucleico” refere-se a qualquerum ou mais segmentos de ácido nucleico, por exemplo, fragmentos de DNA ou RNA, presentes em um polinucleotídeo. Por ácido nucleico ou polinucleotídeo “isolado” é tencionado uma molécula de ácido nucleico, DNA ou RNA que tenha sido removida a partir do ambiente nativo. Exemplos de um polinucleotídeo isolado incluem polinucleotídeos recombinantes mantidos em polinucleotídeos de células hospedeiras heterólogas ou purificadas (parcialmente ou substancialmente) em solução. Polinucleotídeos isolados ou ácidos nucleicos de acordo com presente invenção ainda incluem tais moléculas produzidas sinteticamente. Polinucleotídeos isolados também podem incluir vetores de expressão isolados, construções de expressão, ou populações dos mesmos. “Polinucleotídeo” também pode se referir a produtos amplificados deles mesmos, como uma reação em cadeia de polimerase. O “polinucleotídeo” pode conter ácidos nucleicos modificados, tais como fosforotioato, fosfato, derivados modificados no átomo do anel e semelhantes. O “polinucleotídeo” pode ser um polinucleotídeo de ocorrência natural (isto é, um existindo na natureza sem intervenção humana), ou um polinucleotídeo recombinantes (isto é, um existente somente com a intervenção humana). Enquanto os termos “polinucleotídeos” e “oligonucleotídeos” ambos referem-se a um polímero de nucleotídeos, como aqui utilizado, um oligonucleotídeo é tipicamente menos que 100 nucleotídeos em comprimento.

[0138] Figura 9 provê um esquema representativo do método de amplificação utilizado para a detecção do polinucleotídeo. Agora, em referência a Figura 9, o método de amplificação presentemente revelado inclui partícula de captura 900 tendo ligada a ela padrão de captura 910a, por exemplo, um padrão de captura tendo 15 pares de base. Também é provido molécula repórter 920, por exemplo,

uma nanopartícula ativa – SERS, tendo ligada a ela padrão de captura 910b, por exemplo, um padrão de captura tendo 15 pares de base. Quando em contato com polinucleotídeo alvo 930, por exemplo, um polinucleotídeo tendo 30 pares de base, complexo 940 é formado e inclui polinucleotídeo de fita dupla 950 compreendido de molécula do polinucleotídeo alvo 930 e padrões de captura 910a e 910b. Complexo 940 pode então ser colocado em contato com molécula repórter 960, por exemplo, nanopartícula ativa – SERS, tendo ligada a ela padrão de captura 910c, por exemplo, um padrão de captura complementar ao padrão de captura não ligado 910b ligado a molécula repórter 920 para formar o complexo 980, que inclui polinucleotídeo de fita dupla 970 compreendendo padrões de captura 910b e 910c. Complexo 980 é exposto a um campo magnético (não mostrado) para induzir complexo 980 para migrar para uma área de um recipiente, por exemplo, um recipiente de ensaio ou recipiente de coleta de espécime como mostrado na Figura 7, para formar um concentrado magnetizado. O concentrado é iluminado com radiação incidente em um ou mais comprimentos de onda, por exemplo, em um sistema como mostrado na Figura 4, para induzir a molécula repórter para produzir um sinal detectável para detectar a presença ou quantidade de um ou mais DNA alvo na amostra biológica.

[0139]Dados a partir do ensaio de DNA presentemente revelado são mostrados nas Figuras 10A e 10B.

K. Geração de Espectro de Referência Raman Aumentada e Análises Espectrais no Ensaio baseado em Líquido de Força Magnética

[0140]A matéria presentemente revelada, em outra modalidade, provê um método de gerar espectros de referência para uso em análises baseadas em Espectroscopia Raman. Este método pode ser utilizado vantajosamente com nanopartículas acopladas a partícula magnética em ensaios líquidos do tipo aqui revelado. Para determinar a quantidade de uma nanopartícula ativa – SERS em uma

amostra, um sinal Raman geralmente deve ser gerado por uma quantidade conhecida da nanopartícula ativa – SERS específica. Tipicamente, este conhecido ou sinal de referência é gerado por nanopartículas ativas – SERS em solução, como processamento de amostra pode ser simplificado.

[0141]Em alguns sistemas de ensaio, tal como aqueles revelados aqui, partículas ativas – SERS são complexadas com partículas magnéticas através das reações envolvendo o analito de interesse. Essas partículas combinadas são colocadas em um volume pequeno por um magneto externo. O sinal Raman gerado pelas nano partículas dentro deste concentrado pode ser analisado utilizado o sinal de referência previamente obtido a partir da solução.

[0142]A matéria presentemente revelada provê, entretanto, que o espectro Raman a partir de um concentrado é diferente a partir do espectro Raman a partir da solução, mesmo se o mesmo tipo de nanopartícula ativa – SERS única é contida na amostra. Resultados melhorados podem ser obtidos no espectro de referência acima dos adquiridos do concentrado, não da solução. As diferenças nesses espectros de solução como comparados ao espectro do concentrado pode causar erros na quantificação da quantidade de nanopartículas na amostra. Esta observação é especialmente verdade em um ambiente multiplexante, onde várias nanopartículas ativas – SERS tendo sinais Raman únicos estão presentes na amostra. Por exemplo, características dentro do sinal da amostra que não são contidas no espectro de referência podem ser interpretados como vindo a partir de outras nanopartículas ativas – SERS dentro da amostra (ver Exemplo 4).

[0143]As diferenças no espectro vindas a partir da solução e concentrados não têm que ser grandes para ter um impacto na quantificação das nanopartículas ativas – SERS (ver Exemplo 4). Este é especialmente verdade quando uma nanopartícula ativa – SERS está presente em grandes quantidades e outra é

totalmente ausente. Sobre essas circunstâncias, um pequeno erro pode induzir um resultado falso positivo para a ausência de nanopartícula ativa – SERS.

[0144]De acordo com esta modalidade, espectros Raman podem ser analisados por ajustes com mínimos quadrados, em cujo caso sinais de referência são utilizados para cada componente potencial. Nas técnicas ajustes mínimos quadrados, o sinal sobre análise é assumido ser composto de uma combinação linear de espectros, cada contribuição variando pela quantidade relativa da nanopartícula ativa – SERS específica dentro da amostra. Características dentro do sinal medido que não pode ser “ajustado” para qualquer dos sinais de referência podem ser grandemente particionados em um sinal basal. Se uma característica do sinal medido, entretanto, coincide com uma característica de qualquer sinal referência, então o ajuste determinará alguma porção do sinal total para aquela fonte de referência. Se espectros são influenciados por peletização de nanopartículas, por exemplo, então estas mudanças necessariamente contribuirão para erros na quantificação. Estas mudanças são capturadas nos espectros de referência, então tais erros de análises de amostra podem ser reduzidos. Um versado na técnica pode reconhecer que outras técnicas de análises multivariadas, incluindo, mas não limitadas a, mínimos quadrados parciais, análises do componente principal, e semelhantes, podem ser utilizados com os métodos presentemente revelados.

[0145]A matéria presentemente revelada, em uma modalidade adicional, provê um método de analisar os espectros Raman, especialmente aquelas obtidas a partir de nanopartículas ativas – SERS, e especialmente em uma situação multiplexada onde partículas com diferentes espectros Raman são utilizadas para identificar analitos múltiplos. Para determinar a quantidade de uma nanopartícula ativa – SERS específica (nanopartícula com uma nanopartícula ativa – SERS que gera um sinal Raman único) em uma amostra, um espectro de amostra tipicamente é gravado por uma ampla variação de comprimentos de onda ou onda de números, e

então comparadas para um ou mais espectros de referência. Esta comparação envolve ajustar os espectros da amostra aos espectros de referência por um comprimento de onda consistente e adequado ou variação de número de onda.

[0146]A matéria presentemente revelada demonstra que um estimado de componentes de nanopartículas feitos a partir desta comparação típica pode ser refinada em duas formas baseadas nos resultados da primeira comparação. Primeiro, porque as diferenças entre contribuições espectrais para componentes diferentes podem variar por uma variação espectral, variações específicas dentro dos espectros podem ser pesados mais pesadamente nos cálculos dependendo de quantidades relativas de componentes na primeira estimativa. Segundo, componentes estimados estarem ausentes ou presentes em concentrações muito baixas podem ser removidos a partir das análises, e os componentes remanescentes re-estimados. Em ambos os casos, um aumento no ajuste de acurácia (“teste de ajuste”) pode ser calculado e avaliado. O “teste de ajuste” representa uma diferença entre o espectro da amostra e o espectro ajustado e pode ser determinado por qualquer método conhecido na técnica e podem ser relatados, por exemplo, como um residual de técnica de ajuste dos mínimos quadrados. Esses dois métodos podem ser aplicados em combinação ou separadamente. Em adição, o método presentemente revelado é aplicável a uma variedade de nanopartículas ativas – SERS que similarmente têm espectros que devem ser distinguidos.

II. COMPOSTOS NANOESTRUTURAIS E MÉTODOS DE SEU USO

[0147]A matéria presentemente revelada provê compostos nanoestruturais, incluindo uma estrutura composto, referida aqui como uma estrutura “satélite”, compreendendo uma pluralidade de partículas dando sinais, por exemplo, nanopartículas, ligadas a um núcleo de partícula, e uma estrutura composto, referido aqui como uma estrutura “núcleo-envoltório”, que inclui um núcleo partícula, um material ativo, tal como material ativo, tal como um material ativo Raman,

envolvendo o núcleo da partícula, e um ou mais revestimento, tal como um revestimento metal, envolvendo o material ativo. O satélite presentemente revelado e as estruturas núcleo-revestimento podem ser utilizadas para amplificar ou de outra forma aumentar um sinal em um ensaio, tal como um ensaio SERS.

[0148]Consequentemente, em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método para fazer um ensaio, o método compreendendo: prover pelo menos uma de uma estrutura satélite, uma estrutura núcleo-envoltório, ou combinações dos mesmo; contactando as estruturas satélites e/ou estruturas núcleo-envoltório com uma amostra suspeita de conter um ou mais alvos analitos, e desempenho de uma etapa de detecção para determinar a presença ou ausência de um ou mais alvos analitos na amostra.

[0149]Mais particularmente, em uma modalidade, sinal melhorado pode ser alcançado por prover uma estrutura composto tendo uma pluralidade de satélites dando sinais (por exemplo, nanopartículas) ligadas a um núcleo de partícula (por exemplo, uma micropartícula) tal que a estrutura composto satélite resultante é capaz de gerar sinais múltiplos. Então, a estrutura satélite pode aumentar a detecção de analitos dentro de um ensaio, tal como para amostras tendo uma concentração inferior de analitos.

[0150]De acordo com vários aspectos da matéria presentemente revelada, as partículas satélites podem ser nanopartículas de metal, semi-condutoras, orgânicas e/ou inorgânicas. Similarmente, o núcleo da partícula pode ser magnético, de sílica, metal (por exemplo, ouro), ou micropartículas orgânicas ou nanopartículas. O satélite e núcleos de partículas podem ser esféricos ou não esféricos na forma. As partículas satélites podem ser ligadas a cada núcleo de partícula utilizando forças eletroestáticas, covalentes, ou de van der Waals. Em adição, as partículas satélites tipicamente compreendem uma molécula repórter, tal como moléculas repórteres fluorescentes, ativa – Raman, ou enzimáticas que facilitam a detecção. As

partículas satélites e/ou a pelo menos um núcleo de partícula pode ter ainda moléculas ligadas a mesma, tais como anticorpos, padrões de ácidos nucleicos ou agentes bloqueadores.

[0151]Em uma modalidade adicional, a matéria presentemente revelada provê uma estrutura núcleo-revestimento compreendendo um núcleo de partícula, um material ativo, tal como material ativo – Raman, envoltório do núcleo da partícula, e um envoltório ao redor do material ativo, em que o envoltório pode ser uma camada contígua ou uma pluralidade de nanopartículas, que preferivelmente estão em proximidade uma a outra. Os materiais do núcleo e do envoltório podem ser os mesmos ou diferentes, e são desejavelmente escolhidos a partir de materiais que aumentam o espectro do material ativo. Por exemplo, um núcleo de outro e envoltório de outro melhorarão o espectro detectável de um material ativo Raman em uma aplicação dispersão Raman aumentada de superfície.

[0152]Aspectos adicionais do método incluem detecção de um analito alvo utilizando dispersão Raman aumentada de superfície. Uma pluralidade de esferas magnéticas, metálicas ou semi-condutoras tendo, por exemplo, um anticorpo para o analito alvo, podem ser introduzidas no ensaio, ao longo com um composto estrutura tendo uma molécula ligadora similar para o analito alvo. O analito, se presente, se torna um sanduíche entre o composto estrutura e a esfera. A esfera pode ser manipulada, por exemplo, por aplicação de um campo magnético, para concentrar uma pluralidade de sanduíches para detecção através de espectro Raman. Um aspecto adicional da matéria presentemente revelada inclui contactar uma pluralidade de compostos estruturais presentemente revelados com uma célula ou tecido sobre condições para ligar o composto estrutura a um analito (por exemplo, uma célula normal ou cancerosa) e imagens das estruturas.

A. Nanoestruturas Satélites

[0153]A matéria presentemente revelada provê estruturas satélites micropartícula-nanopartícula, que, em algumas modalidades, podem ser utilizadas para amplificar ou aumentar um sinal em um ensaio, tal como um ensaio SERS.

[0154]Agora com referência a Figura 14, é mostrado uma micrografia eletrônica de transmissão (TEM) da estrutura satélite 1400 de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada. Estrutura satélite 1400 inclui uma pluralidade de partículas menores (por exemplo, uma fração sinalizadora) ligada a uma partícula maior (por exemplo, um veículo), tal como uma pluralidade de nanopartículas 1412 ligadas a micropartícula 1414. Como revelado em detalhes adicionais aqui abaixo, estrutura satélite 1400 é capaz de amplificar um sinal analito em um ensaio. Então, a estrutura satélite 1400 pode ser capaz de amplificar um sinal para detectar um analito que pode de outra forma não ser detectado, tal como em amostras contendo concentrações mais baixas de analitos.

[0155]É entendido que estrutura satélite 1400 descrito aqui pode ser utilizada para detectar qualquer número de analitos. O termo “analito” não é tencionado ser limitante e pode ser qualquer molécula de interesse tal como uma proteína, ácido nucléico, ou metabólito. O analito pode alternativamente ser uma célula, tal como uma célula cancerosa. Além disso, o ensaio utilizado para analisar analitos pode ser homogêneo ou heterogêneo. Por exemplo, um ensaio heterogêneo tipicamente requer separação, ou por lavagem ou outros meios físicos, dos elementos reacionais entre as etapas individuais do procedimento de ensaio, enquanto um ensaio homogêneo não requer qualquer etapa separado. Em adição, qualquer ensaio desejado pode ser utilizado para identificar e analisar os analitos. Por exemplo, imunoenaios sanduíches podem ser utilizados, exemplos dos quais são providos em detalhes adicionais aqui. Ainda, estruturas satélites 1400 podem ser utilizadas para amplificar eventos sinalizadores para uma pluralidade de analitos tal que detecção multiplex pode ser utilizada para detectar tal pluralidade de analitos.

Por exemplo, uma primeira estrutura satélite com um sinal distinto, por exemplo, um espectro SERS distinto inclui um anticorpo para um primeiro analito, e é misturado diretamente com uma segunda estrutura satélite exibindo um sinal diferente, distinto, por exemplo, um espectro SERS distinto, e tendo um segundo anticorpo específico para um segundo tipo de analito.

[0156] Nanopartículas 1412 podem ser qualquer partícula adequada capaz de gerar um sinal detectável que é utilizado para detectar a ocorrência de um evento ligador. Por exemplo, nanopartículas 1412 podem ser nanopartículas de metal, semicondutoras, orgânicas ou inorgânicas. No exemplo mostrado na Figura 14, nanopartículas 1412 são partículas de ouro. Similarmente, micropartícula 1414 pode ser qualquer veículo desejado que facilita a ligação de uma pluralidade de nanopartículas 1412 ao mesmo. Por exemplo, micropartícula 1414 pode ser magnética, de sílica, metal (por exemplo, ouro), e/ou micropartículas orgânicas. No exemplo mostrado na Figura 14, a micropartícula é uma partícula de sílica amino-funcionalizada. Nanopartículas 1412 tipicamente são capazes de prover sinais detectáveis por elas mesmas, por exemplo, elas podem ser, pontos quantum ou partículas ativas – SERS. Outras partículas adequadas para uso com os métodos presentemente revelados são conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, cada uma das nanopartículas 1412 podem conter uma molécula repórter tal como moléculas repórter fluorescentes, Raman e enzimáticas que permitem as nanopartículas agirem como elementos sinalizadores se as nanopartículas não são de outra forma capazes de fazer por si próprias. Ver, por exemplo, Patente dos EUA No. 6.514.767, a revelação da qual é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[0157] Embora o termo “micropartícula” é utilizado todo o tempo, é entendido que micropartícula 1414 pode ser qualquer partícula que é maior que nanopartículas 1412 (onde nanopartículas são definidas para ter tamanhos de cerca de 2 nm a

cerca de 200 nm em diâmetros). Várias técnicas podem ser utilizadas para se ligar a nanopartículas 1412 para cada micropartícula 1414, tal como utilizando forças eletroestáticas, covalentes, ou van der Waals. Além disso, nanopartículas 1412 podem ser ligadas para micropartícula 1414 utilizando vários ligadores, tais como polímeros, DNA, aminoácidos, cadeias curtas de carbono, ligação estreptavidina/biotina, ou semelhantes, que podem permitir para uma densidade mais alta de nanopartículas a cerca da micropartícula. O comprimento e tipo do ligador pode ser escolhido para tune o número de nanopartículas 1412 ligadas a micropartícula 1414, e o espaçamento entre as nanopartículas e micropartículas. Nanopartículas 1412 e/ou micropartículas 1414 também podem ser revestidas (por exemplo, com um polímero) para controlar interações interpartículas.

[0158]Qualquer número de nanopartículas 1412 pode ser ligada a micropartícula 1414, embora o número preciso de nanopartículas pode ser ditado pelo experimento particular sendo feito. Por exemplo, pode ser possível obter estrutura satélite 1400 tendo uma distribuição uniforme e máxima de nanopartículas 1412 para micropartícula 1414 por otimização da proporção das partículas e mistura das condições durante a reação. Além disso, nanopartículas 1412 e micropartícula 1414 pode ser de vários tamanhos e configurações dependendo do analito a ser detectado, tal como esférico ou não esférico (por exemplo, nanohastes) na forma. Por exemplo, Figura 14 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão, em que nanopartículas 1412 e micropartícula 1414 são esféricas na forma, e as nanopartículas são 40 nm em diâmetro e a micropartícula é 1 μ m em diâmetro. Em adição, micropartícula 1414 pode ser submícron (por exemplo, 0,5 μ m em diâmetro).

[0159]Ainda, nanopartículas 1412 e/ou micropartícula 1414 podem ser marcadas com uma espécie, tais como compostos orgânicos ou inorgânicos, polímeros, proteínas, receptores, anticorpos, padrões de ácidos nucleicos, e agentes

bloqueadores, para aumentar ou facilitar o evento de ligação com o analito ou facilitar o evento de ligação com o analito ou para prevenir interações indesejadas. Agentes bloqueadores exemplares incluem albumina, caseína, álcool polivinílico, poli(etileno glicol), e gamaglobulina.

[0160]Várias técnicas de detecção podem ser utilizadas para detectar um ou mais analitos de interesse através da estrutura satélite 1400, por exemplo, espectrometria de fluorescência ou Raman. Para fazer a detecção, pelo menos um evento ligador tipicamente existe entre a estrutura satélite 1400 e analito (por exemplo, através de um sanduíche como descrito abaixo). Amplificação de sinal resulta de cada uma pluralidade de nanopartículas 1412 gerando sinais múltiplos baseados em um evento de ligação único, ao invés de uma nanopartícula única gerando somente um sinal a partir do evento ligador.

[0161]Figura 15 mostra o ensaio sanduíche 1500 de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada. Em particular, o ensaio inclui anticorpo 1522a imobilizado no suporte 1524, enquanto estrutura satélite 1510 também inclui anticorpo 1522b imobilizado em uma das nanopartículas 1512. Enquanto esta modalidade particular ilustra que o anticorpo 1522b é acoplado a estrutura satélite 1510 através de nanopartículas 1512, é entendido que em algumas modalidades pode ser vantajoso ligar anticorpo 1522b ao veículo micropartícula 1514. Analito 1516 é capturado entre anticorpos 1522a, 1522b, que resulta em um evento ligador. Estrutura satélite 1510 facilita a geração de uma pluralidade de eventos sinalizadores detectáveis devido a eventos sinalizadores para cada uma das nanopartículas 1512, que resulta em amplificação do evento ligador entre analito 1516 e nanopartícula 1512 capturando o analito. É entendido que anticorpo 1522a em suporte 1524 e anticorpo 1522b na estrutura satélite 1510 não precisa ser o mesmo.

[0162]Figura 16A ilustra ensaio sanduíche 1600 de acordo com outra modalidade da matéria presentemente revelada. Ensaio 1600 inclui recipiente de ensaio 1628 contendo uma pluralidade de estruturas satélites 1610, analitos 1616, e esferas 1630. Esferas 1630 podem ser um material magnético, semi-condutor, ou metálico que são capazes de serem atraídos por um campo magnético, ou podem ser estruturas que de outra forma facilitam a separação/enriquecimento, por exemplo, através da gravidade ou centrifugação. Pode ser qualquer número de esferas 1630 dependendo do número de partículas satélites 1610 e analitos 1616, e as esferas podem ser de qualquer tamanho e configuração capaz de fazer o sanduíche do analito entre a esfera e uma estrutura satélite. Por exemplo, de acordo com uma modalidade exemplar, que não tenciona ser limitante, ensaio sanduíche 1600 pode incluir cerca de 1000 a 100.000 esferas 1630, cerca de 1000 a 100.000 estruturas satélites 1610 por ensaio, e cerca de 50 a 10.000 nanopartículas 1612 por micropartícula 1614. Em adição, esferas 1630 podem ter localizadas espécies dos mesmos tais como anticorpos, padrões de ácidos nucleicos, agentes bloqueadores ou semelhantes.

[0163]Analito 1616 pode ser capturado ou feito sanduíche entre estrutura satélite 1610 e esfera 1630. Deste modo, analito 1616 pode ligar a nanopartícula 1612 de uma respectiva estrutura satélite 1610, enquanto a esfera 1630 pode ligar ao analito tal que o analito é um sanduíche entre a nanopartícula e a esfera resultando em um evento de ligação. Após permitindo um tempo pré-determinado para uma pluralidade de analitos 1616 serem capturados, um campo magnético (provido, por exemplo, por um magneto permanente ou um eletromagneto) pode ser aplicado ao ensaio 1600, o que concentra analitos do sanduíche 1616 uma localização particular, como mostrado na Figura 16B. Concentrado 1632 pode ser formado no fundo ou na lateral do recipiente de ensaio 1628 dependendo da direção que o campo magnético é aplicado. Concentração 1632 pode então ser analisado para

determinar a presença de analitos 1616 através de sinais providos a partir das estruturas satélites. O sinal resultando a partir de estrutura satélite 1610 é aumentado pela presença da pluralidade de nanopartículas 1612 como descrito acima. Dispersão Raman aumentada pela superfície (SERS) pode ser utilizado para detectar sinais a partir de estrutura satélite 1610 contendo material ativo – Raman.

[0164] Uma modalidade adicional da matéria presentemente revelada é direcionada para imagem celular, em que a estrutura satélite 1610 pode ser utilizada para facilitar a análise de uma célula. Utilizando técnicas convencionais para analisar células, um número limitado de partículas pode ser capaz de se ligar a uma célula, tal como uma célula cancerosa, para facilitar a imagem da célula para identificar células normais ou cancerosas. Por exemplo, uma célula tendo dez marcadores de superfície ligadas a mesma pode somente ser detectada da ligação a dez nanopartículas tal que podem somente ter eventos sinalizadores correspondendo a dez marcadores de superfície. Por enviar estruturas satélites 1610 para se ligar a uma célula, cada uma tendo uma pluralidade de nanopartículas, uma pluralidade de eventos sinalizadores pode ser gerada por ligação a cada estrutura satélite da célula. Por exemplo, continuando com os exemplos acima, pode ter dez estruturas satélites 1610 que cada inclui 10 nanopartículas 1612 tal sinal é gerado a partir de 100 nanopartículas, então amplificando cada evento de ligação individual por um fator de 10. Tal como, a amplificação dos eventos de sinalização pode aumentar a identificação da célula utilizando imagem celular. Como discutido acima, estruturas satélites 1610 podem ser marcadas, tal como com um revestimento de anticorpo, para facilitar a ligação de eventos. O tamanho da estrutura satélite 1610 pode ser feita para permitir a decoração de uma célula por um número máximo de nanopartículas 1612 por otimizar o tamanho da micropartícula 1614 ao qual nanopartículas 1612 são ligadas. Então, se micropartícula 1614 é muito pequena, somente um número limitado de nanopartículas 1612 podem ser ligadas a ela. Por

outro lado, se micropartícula 1614 é muito grande, somente umas poucas estruturas satélites 1610 podem ser ligadas à célula.

B. Composto Nanopartículas Núcleo-Envoltório

[0165]Em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê compostos partículas, referidas aqui como estruturas “núcleo-envoltório”, que incluem um núcleo de partícula, um material ativo, tal como um material ativo – Raman, envolvendo o núcleo da partícula, e um ou mais envoltórios, tal como um envoltório metal, envolvendo o material ativo, que, em algumas modalidades, podem ser utilizados para amplificar ou aumentar um sinal em um ensaio, tal como um ensaio SERS.

[0166]Agora com referência a Figura 17, estrutura composto 1700 compreende núcleo 1702, um material ativo, tal como material ativo-Raman 1704 ao redor do núcleo, e envoltório contíguo 1706 ao redor do material ativo. Tipicamente envoltório externo 1706 tem 20 nm de espessura ou menos. Em uma modalidade específica, núcleo 1702 é um núcleo de ouro de cerca de 20 a cerca de 200 nm em diâmetro, envoltório 1706 também é ouro e tem uma espessura de 2 a 20 nm, e o material ativo é um material ativo-Raman tal como trans-1,2-bis(4-puridil)etileno (SPE). Em adição, uma fina, < 5nm, camada de sílica pode ser disposta no material ativo-raman sobre envoltório 1706. A sílica é vantajosa em algumas situações para promover fabricação de envoltório de ouro. Alternativamente, uma molécula bi-funcional pode ser utilizada para promover a ligação do outro ao material ativo-Raman. Ouro é um metal vantajoso em prover dispersão Raman aumentada de superfície, mas metais tais como prata e cobre (ou liga de qualquer metal) também são úteis.

[0167]Em uma modalidade adicional da estrutura composto núcleo-envoltório, a estrutura núcleo-envoltório é similar a Figura 17, mas com o envoltório sendo feito de nanopartículas, tipicamente tendo um tamanho igual a ou menor que

o núcleo. Em uma tal modalidade, o núcleo é um núcleo outro de cerca de 20 nm a cerca de 200 nm em diâmetro, o material ativo é um material ativo-Raman tal como trans-1,2-bis(4-pirridil)etileno (BPE), e as nanopartículas também são ouro e têm um diâmetro de cerca de 2 nm até o tamanho do núcleo. Em adição, uma fina, < 5 nm, camada sílica pode ser depositada no material ativo-Raman sobre as nanopartículas. Alternativamente, uma molécula bi-funcional pode ser utilizada para promover a ligação do outro ao material ativo-Raman. Outro é um metal vantajoso em prover dispersão Raman aumentada de superfície, mas metais tais como prata e cobre (ou liga de qualquer de tais metais) também são úteis.

[0168]É entendido que as modalidades mostradas nas Figuras 14-17 e descritas acima não são tencionadas serem limitantes. Em particular, as estruturas satélites e/ou núcleo/envoltório da matéria presentemente revelada pode ser utilizada em uma variedade de ensaios para aumentar os sinais de analito, tais como um ensaio homogêneo ou um ensaio de fluxo lateral. É possível que um ensaio único pode usar ambos tipos de partículas. O tamanho, número, material e configuração de nanopartículas 1512, e micropartículas 1514 podem ser variados dependendo do analito 1516 sendo identificado e uma amplificação desejada de um evento sinalizador. Similarmente, para estruturas núcleo/envoltório 1700, o tamanho, material, e espessura podem ser adaptados para o ensaio particular ou ambiente.

[0169]Como notado, uma aplicação particularmente vantajosa para a matéria presentemente revelada é para superfície dispersão Raman aumentada de superfície. Quando duas nanoestruturas metálicas estão em grande proximidade, acoplamento eletromagnético dos campos plasmônicos a partir de duas estruturas toma lugar, produzindo grandes aumentos no campo eletromagnético. Quando uma molécula ativa Raman é colocada no campo eletromagnético aumentado, a intensidade do sinal Raman a partir da molécula mostra um aumento de várias ordens de magnitude versus o sinal quando a molécula está em uma nanopartícula isolada.

Convencionalmente, os versados na técnica têm tentativa para agregar nanopartículas metálicas múltiplas, mas tal agregação é difícil e amplamente não controlável. A matéria presentemente revelada é capaz de prover o desejo eletromagnético de acoplamento, mas em uma maneira vantajosa.

[0170]Em adição, enquanto não limitado a qualquer teoria particular, é acreditado que as duas estruturas plasmônicas interagindo (ou núcleo e envoltório ou núcleo e satélites) permitirão um ajuste o comprimento de onda em que a ressonância de plasmon de superfície do composto estrutura ocorre. Este ajuste em combinação com o comprimento de onda de um laser de excitação é esperado ainda aumentar o sinal Raman a partir dos compostos estruturas, assim aumentando a sensibilidade de qualquer ensaio.

[0171]Os compostos estruturas da matéria presentemente revelada podem ser fabricados por qualquer técnica apropriada. Por exemplo, os seguintes documentos de patente provêm revelação na formação de nanopartícula, incluindo revestimentos de sílica: Patente dos EUA Nos. 6.548.168 e 6.514.767 e Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. 2001/0002315, as revelações das quais são aqui incorporadas por referência. Outros métodos para formar e manipular partículas metálicas são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0172]Em adição às partículas esféricas discutidas acima, outras configurações são possíveis, tais como forma de haste ou outras partículas de formas mais alongadas, e núcleos compreendendo partículas múltiplas.

III. TUBO DE AMOSTRA E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

[0173]Os tubos de amostras presentes, e métodos de uso dos mesmos, podem ser utilizados com qualquer das partículas presentemente reveladas ou métodos de ensaios.

A. Recipientes de Coleta de Amostras Gerais

[0174]Em algumas modalidades, o recipiente de amostra é selecionado a partir do grupo consistindo de uma cubeta, um tubo, tal como um tubo coletor de sangue, geralmente um recipiente de ensaio, ou qualquer outro recipiente de coleta de amostra compatível com a amostra sobre teste e medidas de SERS. Em algumas modalidades, o recipiente coletor de amostra, por exemplo, um tubo, pode ter uma pressão interna que é menor que a pressão atmosférica do ambiente ao redor. Tais recipientes coletores de amostra são revelados nas Patentes dos EUA Nos. 5.860.937 para Cohen; 5.906.744 para Carroll *et al*; e 6.821.789 para Augello *et al*; cada uma das quais é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Ainda, em algumas modalidades, o recipiente coletor de amostra inclui um reagente de detecção compreendendo as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas. Em tais modalidades, o recipiente coletor de amostra tem um reagente de detecção disposto no mesmo antes do uso, por exemplo, um paciente ou um médico, coletar a amostra biológica, por exemplo, sangue, a ser detectado. O reagente de detecção, por exemplo, pode ser imobilizado em uma superfície interna, por exemplo, uma parede interna, do recipiente coletor de amostra ou simplesmente de outra forma estar disposto dentro do recipiente de amostra.

[0175]O recipiente coletor de amostra, por exemplo, um tubo coletor de sangue, pode ser enviado para o usuário com o reagente de detecção disposto nele. Alternativamente, o usuário pode selecionar um reagente de detecção adequado e introduzir o reagente de detecção no dispositivo de coleta antes de coletar a espécime de amostra. Ainda, a matéria presentemente revelada pode incluir um kit compreendendo um ou mais de um recipiente coletor de amostra, tais como um tubo coletor de sangue, um ou mais reagentes, tais como um ou mais reagentes de detecção compreendendo nanopartículas tendo uma molécula repórter ativa – SERS ligada ao mesmo, partículas de captura magnética, e componentes individuais dos mesmos. Tais kits podem incluir qualquer número de componentes do ensaio,

incluindo, mas não limitados a múltiplas moléculas repórter ou múltiplos membros de ligação específica ou ligados a uma nanopartícula ou embalados separadamente dos mesmos.

B. Recipientes de Coleta de Amostra Presentemente Revelados

[0176]Em imunoensaios convencionais, detecção de um antígeno pode ocorrer por “fazer um sanduíche” o antígeno entre dois anticorpos, um dos quais é marcado com um repórter óptico ou colorimétrico. O sinal óptico medido pode então ser utilizado para determinar a concentração do antígeno presente na amostra. Imunoensaios convencionais Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima (ELISA) são exemplos deste tipo de tecnologia.

[0177]Um ensaio de captura magnética envolve revestimento de pequenas partículas susceptíveis magneticamente, tais como microesferas variando no tamanho a partir de uns poucos 100 nanômetros a dezenas de micrômetros, com uma substância alvo-específica, por exemplo um ligante ou um anticorpo. As partículas são introduzidas em um poço contendo uma solução das entidades alvos, e moléculas biológicas não queridas. As entidades alvo então se ligam ao revestimento nas partículas magnéticas. Células, proteínas, sequências de ácidos nucleicos e semelhantes são exemplos de entidades alvo. Magnetos são colocados perto do poço para aplicar campos magnéticos no poço e a solução.

[0178]As partículas magnéticas, incluindo as entidades alvo ligadas às partículas, são atraídas para os magnetos. Os magnetos provêem uma força magnética suficiente para acumular as partículas em uma forma expediente. Dependendo do lugar do magneto, as partículas podem ser coletadas no fundo ou nas paredes laterais dos poços. Um perfil de separação de partícula uniforme é desejável, tal como um perfil em que as partículas uniformemente distribuídas pela base de cada poço produzem um “perfil reto”, ou em que as partículas puxam para as laterais dos poços igualmente.

[0179]Em outro formato de ensaio, um ensaio de captura magnética utilizando repórteres dispersão Raman aumentada de superfície (SERS), um sinal óptico é gerado pela formação de um complexo antígeno-anticorpo entre um nanomarcador marcado com SERS e uma partícula de captura magnética. Referindo-nos mais uma vez a Figura 1, um exemplo de ensaio SERS de captura magnética é ilustrado. Com esta abordagem técnica, a magnitude do sinal óptico pode depender do tamanho, densidade, e posição do concentrado de partícula magnética.

[0180]O tamanho, densidade, e posição do concentrado de partícula magnética relativo aos interrogantes ópticos podem afetar a magnitude e reprodutibilidade do sinal óptico medido. Por exemplo, alterando a funcionalidade da superfície nas partículas magnéticas pode mudar a forma do concentrado, que então pode levar a diferenças significantes dos sinais ópticos. Em desenhos de tubos de análises de amostras prévios tendo uma grande janela, o ensaio reacional podem ser extinto por manter o tubo acima de um magneto para atrair as partículas magnéticas para o fundo do tubo. Porque a janela do tubo é relativamente grande em comparação ao número absoluto de partículas magnéticas, um concentrado denso pode não ser consistentemente formado e uma etapa adicional para a formação do concentrado pode ser necessário. Um método para formar um concentrado magnético consistente inclui utilizar um magneto montado abaixo do tubo da amostra, onde o centro do magneto é posicionado fora do centro em respeito ao eixo do tubo de amostra. Este método é ilustrado na Figura 5. Ele pode tipicamente tomar somente uns poucos segundos para o magneto induzir a formação de um concentrado no fundo do tubo de amostra. Tipicamente, o concentrado toma a forma de um toro, onde quase nenhuma partícula pode ser encontrada no centro do concentrado. Então, em algumas modalidades, a matéria

presentemente revelada provê um método para a criação confiável de pequenos e densos concentrados de partículas magnéticas.

[0181]Em referência agora a Figura 5, um processo de formação de concentrado confiável por rotação do tubo de amostra em um magneto montado fora do centro é ilustrado. Figura 5A mostra um lado da visão do tubo de amostra 500 e magneto 510. Como mostrado na Figura 5A, magneto 510 (por exemplo, um haste) é montado abaixo do tubo de amostra 500, onde o centro do magneto é posicionado fora do centro para o eixo do tubo de amostra (mostrado como uma linha pontilhada na Figura 5A). Uma visão superior do recipiente 500 e magneto 510 é mostrada na Figura 5B, onde a parte de cima do magneto 510 é mostrada como uma área seccional cruzada 520. Em um ensaio baseado em líquido do tipo descrito aqui, é tipicamente tomado um período curto de tempo, por exemplo, uns poucos segundos, para o magneto 510 induzir a formação de um concentrado no fundo do tubo de amostra 500. Tipicamente, o concentrado toma a forma de um toro, onde quase nenhuma partícula pode ser encontrada no centro do concentrado. Figura 5C mostra uma visão superior da formação do concentrado 530 na forma de um toro. Área cruzada seccionalmente 520 do magneto 510 pode ser vista através do centro do concentrado 530, que contém quase nenhuma partícula. A matéria presentemente revelada provê que tubo de amostra em rotação 500 ao redor do seu eixo central modula o campo magnético experimentado pelo concentrado 530 em tal forma que o concentrado 530 se torna mais denso. Em referência agora a Figura 5D, uma visão superior de um concentrado mais denso 540 formado após tubo de amostra rotando 500 ao redor de seu eixo central é mostrado.

C. Formação de Concentrado no Ensaio baseado em Líquido usando Partículas Magnéticas

[0182]O pequeno tamanho do magneto e a rotação adicional do tubo de amostra podem levar a um concentrado de partícula magnética mais confiável e

denso. Flutuações na posição do magneto, bem como na velocidade de rotação, entretanto, podem modular a posição do concentrado e a densidade e assim essencialmente pode mudar a medida do sinal óptico. Etapas para formar o concentrado de partícula magnética deve assim ser feito com cuidado e prática. Consequentemente existe uma necessidade para um sistema para formar um concentrado de partícula magnética tendo uma densidade consistente e a forma em um tubo de amostra, e que pode ser alcançado com um processo mais simples.

[0183]Em referência mais uma vez às Figuras 1 e 4, um exemplo de ensaio de captura magnética e sistema de detecção é ilustrado. O ensaio usa anticorpos de captura ligados a partículas magnéticas. Anticorpos de detecção são ligados a nanopartículas marcadas com dispersão Raman aumentada de superfície (SERS). O anticorpo de captura e o anticorpo de detecção cada se liga especificamente a epítomos diferentes e distintos em um alvo analito. Consequentemente, um complexo mediado por antígeno entre a nanopartícula marcada com SERS e partícula de captura magnética ("sanduíche" S-A-M) pode ser formado. Os complexos sanduíches S-A-M podem então ser segregados a partir da solução de amostra por aplicar um campo magnético. Um magneto é utilizado para atrair os complexos sanduíches para o fundo do tubo onde um sinal óptico a partir do concentrado de partícula magnética resultante é medido. A matéria presentemente revelada pode ser utilizada com este processo e técnica.

[0184]Com esta abordagem técnica, a magnitude do sinal óptico pode depender do tamanho, densidade, e posição do concentrado de partícula magnética. A forma do concentrado magnético pode nem sempre ser consistente. Por exemplo, alterando a superfície de funcionalidade das partículas magnéticas pode mudar a densidade e/ou forma do concentrado. Como mostrado na Figura 5, abordagens alternativas usam um magneto montado abaixo do tubo de amostra. Um concentrado pequeno pode ser formado no fundo do tubo de amostra por toação do

tubo de amostra em seu eixo central. Também é aqui provido tubos de amostras para uso nos métodos presentemente revelados.

[0185]Em referência agora as Figuras 18A e 18C, e acordo com pelo menos uma modalidade da matéria presentemente revelada, um tubo de amostra 1810 pode compreender um corpo alongado 1812 tendo uma terminação aberta 1814, e uma porção cônica 1816 tendo uma terminação fechada 1818. Porção cônica 1816 pode ainda compreender um fundo plano 1820 na terminação fechada 1818. O tubo de amostra 1810 pode ter um eixo longitudinal central 1822 que é normal para o fundo plano 1820. Enquanto as modalidades exemplificadas nas Figuras 18A-18C ilustram um corpo alongado cilíndrico 1812, a matéria presentemente revelada não é limitada ao tubo de amostra tendo esta forma. Corpo alongado 1812 pode ter qualquer forma desejada, tal como, por exemplo, triangular, quadrada, multi-lados, tipo pentagonal, hexagonal, e octagonal, e outras formas geométricas. A forma do corpo alongado não é crítica. Porção cônica 1816, exemplificada nas Figuras 18A e 18C, também não são limitadas a um cone circular e podem ter qualquer forma estreita, tal como uma forma externa que encontre o corpo alongado ou uma forma diferente do corpo alongado, desde que a porção seja estreita ou de outra forma leve a um diâmetro reduzido ou dimensão comparada ao diâmetro ou dimensões do corpo alongado.

[0186]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode compreender uma parede 1824 tendo uma espessura 1825 variando de cerca de 0,1 mm a cerca de 1,25 mm, por exemplo, cerca de 0,635 mm. Qualquer espessura de parede é aceitável, e uma espessura de parede acima e abaixo desta dada espessura pode ser utilizada. De acordo com várias modalidades, corpo alongado 1812 pode ter um diâmetro interno 1826, na abertura final 1814, variando a partir de cerca de 2,0 mm a cerca de 25 mm, por exemplo, em algumas modalidades, cerca de 2,0 mm a cerca de 12 mm, ou em modalidades particulares, cerca de 10,2 mm.

Qualquer diâmetro dentro ou interna pode ser aceitável, e diâmetros internos acima ou abaixo dessas dadas quantidades podem ser utilizados. Também, quando uma forma geométrica é utilizada que não tem um diâmetro, os diâmetros recitados podem servir como um comprimenro ou mérida de comprimento ou comprimento mais longo através do espaço definido. Esta característica se aplica a todos os aspectos da matéria presentemente revelada.

[0187]O corpo alongado 1812 pode estreita para a porção cônica 1816, por exemplo, em uma forma leve, tal como um ângulo variando de cerca de 0 graus a cerca de 5 graus, tal como a partir de 1 grau a 3 graus. Ângulos acima ou abaixo destas quantidades dadas podem ser utilizados. O fundo plano 1820 pode ter um eixo central 1834, e porção cônica 1816 pode estreita para o eixo central 1834. Este ângulo pode ser a partir de cerca de 10 graus a cerca de 50 graus, ou de cerca de 15 graus a cerca de 45 graus, ou a partir de cerca de 15 graus a 40 graus, ou a partir de 20 graus a 30 graus. Ângulos acima ou abaixo desta dada quantidade podem ser utilizados. O ângulo em cada caso é determinado utilizando o eixo central 1834 como uma linha de referência.

[0188]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode ter qualquer comprimenro 1823, tal como variando de cerca de 10 mm a cerca de 50 mm, por exemplo, a partir de 20 a 30 mm, tal como 25,4 mm. Qualquer comprimenro geral é aceitável, e comprimentos gerais acima e abaixo desses comprimentos podem ser utilizados. De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode definir um volume interior. O volume interior pode variar de cerca de 0,1 mL a cerca de 50 mL, em algumas modalidades, de cerca de 0,1 mL a cerca de 2,0 mL ou mais, ou de cerca de 0,2 mL a cerca de 1,5 mL, por exemplo, cerca de 1,4 mL, ou cerca de 0,4 mL. Quantidades acima ou abaixo desta variação podem ser utilizadas e não são críticas.

[0189]De acordo com várias modalidades, porção cônica 1816 pode ter qualquer comprimento, tal como um variando de cerca de 2,0 mm a cerca de 10,0 mm, por exemplo, cerca de 6,35 mm. Comprimentos acima ou abaixo deste comprimento podem ser utilizados. De acordo com várias modalidades, porção cônica 1816 pode definir um volume interior de qualquer quantidade, tal como variando de cerca de 10 µL a cerca de 50 µL, de cerca de 10 µL a cerca de 5 µL, de cerca de 10 µL a cerca de 1 mL, de cerca de 10 µL a cerca de 500 µL, ou de cerca de 50 µL a cerca de 400 µL, por exemplo, cerca de 200 µL. O volume interior pode ser acima ou abaixo desta variação.

[0190]O tubo de amostra 1810 pode compreender um fundo plano 1820 tendo uma superfície interna 1826 e uma superfície externa 1828. Superfície interna 1826 e/ou superfície externa 1828 pode ter uma qualidade óptica final ou superfície polida. De acordo com várias modalidades, fundo plano 1820 po ter qualquer espessura, tal como variando de cerca de 0,10 mm a cerca de 2,0 mm, ou de cerca de 0,25 mm a cerca de 1,0 mm, por exemplo, cerca de 0,635 mm. Outra espessura acima ou abaixo dessas quantidades pode ser utilizada.

[0191]De acordo com várias modalidades, fundo plano 1820 pode ter qualquer diâmetro interno 1829 variando, tal como um de cerca de 0,25 mm a cerca de 10 mm, em algumas modalidades, a partir de 0,25 mm a cerca de 2,5 mm, ou de cerca de 0,5 mm a cerca de 1,25 mm, por exemplo, cerca de 1 mm. Em várias modalidades, fundo plano 1820 pode ter qualquer diâmetro externo 1830, tal como um variando de cerca de 1,25, a cerca de 25 mm, por exemplo, em algumas modalidades, cerca de 1,25 mm a cerca de 6 mm, e em algumas modalidades, cerca de 2,50 mm.

[0192]Em geral, para qualquer dimensão ou volume mencionado aqui, outros tamanhos e dimensões de tubo de amostra podem ser apropriados. Geralmente, um pode levar em consideração, por exemplo, o tipo e volume de amostra, o tipo de

ensaio, o volume de reagentes, e/ou o tamanho desejado do concentrado de partícula magnética.

[0193]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode compreender um aro 1821 circunscrevendo a terminação aberta 1814. Aro 1821 pode ter uma espessura, tal como variando de cerca de 0,25 mm a cerca de 1,25 mm, por exemplo, cerca de 0,80 mm.

[0194]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode ainda compreender uma tampa ou dispositivo para fechar (não mostrado) tendo uma posição aerta e uma posição fechada para selar a terminação aberta 1814. Em algumas modalidades, a tampa pode ser configurada para se ajustar firmemente na terminação aberta 1814. A tampa pode ter um tamanho e forma configurada para proteger e cobrir o perímetro da abertura do tubo, e ajudar a manter o interior do tubo de amostra livre de qualquer contaminação. As tampas podem ser seladas aos tubos de amostras por pressão das mesmas abaixo contra uma força friccional resistente. O fechamento pode ser qualquer forma e pode envolver qualquer técnica de fechamento, tal como ajuste de estalo, ajuste de parafuso, tampa e semelhantes. Em algumas modalidades, a tampa pode ser ligada ao tubo de amostra 1810 por uma alça flexível.

[0195]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode compreender qualquer material que não reage com os componentes colocados nele. De acordo com várias modalidades, os materiais podem afetar minimamente na transmissão de luz e espectro basal. Tubo de amostra 1810 pode compreender vidro, cerâmica, e/ou material polimérico, por exemplo, polipropileno, polietileno, poliestireno, policarbonato, copolímero olefian cíclica, e semelhantes, ou qualquer combinação dos mesmos. Tubo de amostra 1810 pode ser fabricado por procedimentos padrões, tais como, por exemplo, injeção de molde ou outras técnicas de moldagem.

[0196]De acordo com várias modalidades, tubo de amostra 1810 pode compreender um material termalmente condutor e/ou compreender paredes tendo uma espessura que permite rápida transferência de calor, tal como ocorre durante o ciclo térmico da reação de polimerase em cadeia.

[0197]De acordo com várias modalidades, fundo plano 1820 pode compreender uma quantidade de janela ótima. Características básicas da janela óptica podem incluir qualidade de superfície, uniformidade de espessura, e/ou pureza óptica. Qualidade óptica refere-se a nenhuma ou mínima absorção e perda dispersão tal que os níveis desejados de transmissão podem ser alcançados. Qualidade óptica também inclui uniformidade de propriedades ópticas, tal como o índice de refração. De acordo com várias modalidades, a qualidade da janela óptica não pode ter ranhuras ou defeitos maiores que $\lambda/2$ ou não maiores que $\lambda/4$, em que λ é o comprimento de onda da luz emitida.

[0198]A matéria presentemente revelada não é limitada a tubos de amostras individuais. De acordo com várias modalidades, um tubo de amostra pode compreender uma placa multi-poços. Um tubo de amostra pode compreender, por exemplo, uma placa de 96 poços, uma placa de 384 poços, ou uma placa de 1536 poços. Em várias modalidades, as placas multi-poços podem ser utilizadas em altos rendimentos de aplicações, tipicamente envolvendo sistemas automatizados. Em tais sistemas, por exemplo, cada placa de 96 poços pode ser arranjada como poços 8x12 poços, cada placa de 384 poços pode ser arranjada como 16x24 poços, e cada placa de 1536 poços pode ser arranjada como 32x48 poços. Qualquer arranjo pode ser utilizado com a matéria presentemente revelada.

[0199]De acordo com várias modalidades, um sistema para formar um concentrado de partícula magnética em um tubo de amostra pode compreender um tubo de amostra e um magneto posicionado adjacente e abaixo do tubo de amostra. O tubo de amostra pode compreender uma porção cônica tendo um fundo

plano fechado, um tubo de amostra capaz de suportar um volume de partículas magnéticas aqui contidas. Em algumas modalidades, o magneto pode ser posicionado adjacente (por exemplo abaixo) o fundo plano do tubo de amostra em que o magneto é capaz de prover uma força magnética suficiente para atrair partículas magnéticas contidas dentro do volume no fundo plano, então formando um concentrado de partícula magnética. De acordo com várias modalidades, o tubo de amostra pode conter uma amostra compreendendo partículas magnéticas dispostas dentro do tubo de amostra.

[0200]De acordo com várias modalidades, o tubo de amostra pode ainda conter partículas magnéticas dispostas dentro do tubo de amostra. O fundo plano do tubo de amostra pode ter um diâmetro interno, e um concentrado de partículas magnética tendo um diâmetro ou tamanho substancialmente o mesmo (dentro de 10%, dentro de 5%, dentro de 1% do diâmetro interno) como o diâmetro interno pode ser formado.

[0201]De acordo com várias modalidades, as partículas magnéticas podem compreender materiais paramagnéticos, superparamagnéticos e/ou ferromagnéticos. As partículas magnéticas podem ser ou conter qualquer material magnético convencional, e podem ter qualquer tamanho/diâmetro. As partículas magnéticas podem ser de qualquer tamanho, e de acordo com várias modalidades, podem ter um diâmetro variando de cerca de 0,05 microns a cerca de 5,0 microns ou diâmetros menores ou maiores ou comprimentos/larguras. As partículas magnéticas podem compreender, por exemplo, óxido de ferro, magnetite, ou uma combinação dos mesmos. As partículas magnéticas podem compreender partículas magnéticas encapsuladas, por exemplo, partículas compreendendo um núcleo tico em magnetite encapsulado com um envoltório de polímero. As partículas magnéticas podem compreender, por exemplo, microesferas paramagnéticas, tal como,

aproximadamente 1 micron em diâmetro, disponível a partir de bangs Laboratories, Inc., Fishers, Indiana.

[0202]De acordo com várias modalidades, a área de superfície (por exemplo, L x W) do magneto pode ser a mesma, maior, ou menor que a área de superfície do fundo plano. Por exemplo, em referência agora a Figura 19, a área de superfície do magneto 1940 pode ser maior que a área de superfície do fundo plano 1920. Magneto 1940 pode ser posicionado adjacente e abaixo do fundo reto 1920 do tubo de amostra 1910. De acordo com várias modalidades, o magneto inteiramente se sobrepõe e compreende o fundo plano. De acordo com várias modalidades, o magneto pode ter uma área de superfície que é maior que a área de superfície do fundo plano, por exemplo, por uma variação de cerca de 1% a cerca de 200%, ou de cerca de 3% a 100%, ou de cerca de 5% a 50%, ou de cerca de 5% a 25%, ou de cerca de 5% a 15%, ou de cerca de 1% a 10%. Não existe limite superior em quanto largo o magneto pode ser com respeito à área de superfície. Um magneto tendo uma área de superfície mais larga que, e compreendendo, o fundo plano permite o tubo de amostra 1910 ser posicionado com um grau de flexibilidade em relação ao magneto e ainda produzir um concentrado de partícula magnética consistente.

[0203]Embora a modalidade mostrada nas Figuras 19 A e 19B ilustra um magneto de forma circular 1940, magnetos de qualquer forma desejável podem ser utilizados. Preferivelmente, os magnetos provêm um campo magnético paralelo substancialmente uniforme que estende em parte ou todo o volume ocupado pelo tubo de amostra 1910 e tem um gradiente uniforme direcionado para a superfície do magneto. Magneto 1940 pode ter, por exemplo, uma forma triangular, retangular, hexagonal, trapezóide, ou elíptica, ou outra forma geométrica.

[0204]De acordo com várias modalidades, magneto 1940 pode compreender qualquer tipo de dispositivo produtor de campo magnético externo. Magneto 1940 pode compreender, por exemplo, um ou mais ferromagnetos, ferrimagnetos,

magnetos ligados a polímeros, magnetos terrosos raros, magnetos cerâmicos, e/ou eletromagnetos, ou qualquer combinação dos mesmos. O magneto pode ser um dispositivo eletromagnético. Magneto 1940 pode compreender, por exemplo, óxido de ferro, magnetite, gadolínio, alnico, ticonal, bário-estrôncio, neodímio-ferro-boro, e/ou samário cobalto, ou qualquer combinação dos mesmos e semelhantes. Magneto 1940 pode produzir um campo magnético suficiente para atrair todas as partículas magnéticas para o fundo reto 1920, e magneto 1940 pode ser posicionado tal que o tubo de amostra 1910 está dentro da influência do campo magnético provado pelo magneto 1940. Se o campo magnético é muito fraco, concentrados de partícula magnética podem ou ser incompletos ou pode levar mais tempo para completar. De acordo com várias modalidades, o magneto pode ter uma força variando de cerca de 1 militesla (mT) a cerca de 1 Tesla (T), ou forças acima desta variação, por exemplo, 10 T. O magneto pode ser um pedaço único ou pode ser múltiplos pedaços, tal como magnetos múltiplos arranjados em qualquer configuração (por exemplo, empilhados, alinhados perto de cada um, e semelhantes).

[0205]Os magnetos podem ser, por exemplo, encaixados dentro de um invólucro protetor. De acordo com várias modalidades, o invólucro pode ainda ser capaz de aceitar uma pluralidade de tubos de amostras, e um ou mais magnetos podem ser arranjados no invólucro tal que cada tubo de amostra é posicionado dentro do invólucro adjacente para pelo menos um magneto. De acordo com várias modalidades, múltiplos eletromagnetos podem ser utilizados em que cada eletromagneto é independentemente controlado, por exemplo, utilizando uma dedicada força fornecida.

[0206]De acordo com várias modalidades, o sistema pode compreender uma pluralidade de tubos de amostras, cada tubo de amostra compreendendo uma porção cônica tendo um fundo plano fechado e capaz de conter um volume de

partículas magnéticas contidas no mesmo. O sistema pode ainda compreender um ou mais magnetos posicionados adjacentes e abaixo da pluralidade de tubos de amostra, em que um ou mais magnetos são capazes de prover uma força magnética suficiente para atrair as partículas magnéticas para um fundo plano respectivo de cada tubo de amostra.

[0207]Como ilustrado na Figura 19A, tubo de amostra 1910 pode ter um eixo longitudinal 1922, e magneto 1940 pode prover um campo magnético 1942 que é alinhado substancialmente paralelo ao eixo longitudinal 1922. Campo magnético 1942 pode manter seu alinhamento substancialmente em paralelo no volume compreendido pelo tubo de amostra 1910. Tubo de amostra 1910 e magneto 1940 pode ser posicionado adjacente tal que o campo magnético 1942 pode ser substancialmente alinhado com o eixo longitudinal 1922. Adicionalmente, o alinhamento paralelo do campo magnético 1942 pode variar levemente todo o volume, sem sair da matéria presentemente revelada.

[0208]Como ilustrado nas Figuras 19 A e 19B, fundo plano 1920 pode compreender superfície interna 1926, e magneto 1940 pode prover campo magnético 1942 que é alinhado substancialmente normal a superfície interna 1926. Campos magnético 1942 pode manter seu alinhamento substancialmente normal quando penetrando um fluído dentro do tubo de amostra 1910 contendo partículas magnéticas, e podem ter uma força substancialmente uniforme ao longo da inteira superfície interna 1926.

[0209]De acordo com pelo menos uma modalidade, um método de formar um concentrado de partícula magnética em um tubo de amostra, um tubo de amostra compreendendo uma porção cônica tendo um fundo plano fechado, e definindo um volume interior no mesmo, e contendo partículas magnéticas dentro do volume interior, podem ser providos. Um magneto pode ser posicionado adjacente e abaixo do fundo plano, em que o magneto é capaz de prover uma força magnética

suficiente para ligar partículas magnéticas ao fundo plano e formar um concentrado de partícula magnética no fundo plano. De acordo com várias modalidades, o fundo plano pode ter um diâmetro interno e o concentrado de partícula magnética pode ter um diâmetro concentrado que é substancialmente o mesmo como ou maior que o diâmetro interno.

[0210]De acordo com várias modalidades, o magneto pode ser posicionado adjacente e abaixo do funro reto do tubo de amostra, e ambos, o magneto e o tubo de amostra podem permanecer estacionário (por exemplo, nenhuma volta é necessária) enquanto o concentrado de partícula magnética é formado. De acordo com várias modalidades, o concentrado de partícula magnética pode ser formado no fundo plano ao longo do tempo variando de cerca de 1 segundo a cerca de 5 minutos, ou mais, e em algumas modalidades, cerca de 1 minutos.

[0211]Em pelo menos uma modalidade, uma pluralidade de tubos de amostras pode ser provida, cada tubo de amostra compreendendo um corpo alongado e uma porção cônica tendo um fundo plano fechado, e definindo um volume interior no mesmo. Cada um dos tubos de amostra pode conter partículas magnéticas dentro do volume interior. O método pode ainda compreender posicionar um ou mais reagentes adjacentes e abaixo da pluralidade de tubos de amostra, em que um ou mais magnetos são capazes de prover uma fonte magnética suficiente para atrair as partículas magnéticas para um respectivo fundo plano de cada tubo de amostra. De acordo com várias modalidades, a força magnética para cada um da pluralidade de tubos de amostra pode ser substancialmente equivalente entre cada tubo de amostra. De acordo com várias modalidades, a força magnética pode ser provida para cada tubo de amostra para substancialmente o mesmo período de tempo. De acordo com várias modalidades, a força magnética pode começar atraindo as partículas magnéticas em cada tubo de amostra substancialmente ao mesmo tempo.

[0212]De acordo com várias modalidades, um sistema de detecção de um sinal pode compreender um tubo de amostra compreendendo uma porção cônica tendo um fundo plano fechado e capaz de conter um volume de complexo de partícula magnética contido aqui. O tubo de amostra pode conter um volume de complexo de partícula magnética capaz de gerar um sinal detectável. De acordo com várias modalidades, um magneto pode ser posicionado adjacente e abaixo do fundo plano do tubo de amostra. O magneto pode ser capaz de prover uma força magnética suficiente para atrair o complexo partícula magnética contido dentro do volume do fundo plano para formar um concentrado de complexo de partícula magnética. De acordo com várias modalidades, o sistema pode compreender um detector capaz de detectar o sinal gerado a partir do complexo de partícula magnética no concentrado formado.

[0213]De acordo com várias modalidades, o complexo de partícula magnética pode compreender uma partícula magnética compreendendo um primeiro padrão de captura específico para um analito alvo, uma partícula ativa – SERS compreendendo um segundo padrão de captura específico o analito alvo, e o analito alvo. O complexo partícula magnético pode ser capaz de gerar um sinal Raman. Os complexos são separados a partir da solução por aplicação de um campo magnético, e o sinal óptico a partir do concentrado magnético resultante é medido. Nanomarcadores marcados com SERS são ainda descritos, por exemplo, na Patente dos EUA No. 6.514.767 B1; Patente dos EUA no. 7.192.778 B2; e Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. 2005/158870 A1, as revelações das quais são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Agentes de captura magnética e ensaios de captura magnética são ainda descritos em, por exemplo, Patente dos EUA No. 5.945.281; Patente dos EUA No. 6.514.415 B2; e O. Olsvik, “Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology”, Clinical Microbiology Reviews, Vol. 7, 43-54 (1994), as revelações das quais são aqui incorporadas por

referência em sua totalidade. Esses métodos e/ou materiais podem ser utilizados na matéria presentemente revelada.

[0214]De acordo com várias modalidades do sistema, o tubo de amostra pode compreender um fundo plano compreendendo uma janela óptica. Um sinal gerado a partir do complexo de partícula magnética pode ser detectado através da janela óptica. O sinal pode ser, por exemplo, um sinal Raman. De acordo com várias modalidades, o detector pode compreender um laser capaz de apurar o complexo de partícula magnética. O detector pode compreender, por exemplo, um espectrômetro e/ou um dispositivo de carga acoplada. Em referência a Figura 4, um sistema óptico para detecção de um sinal gerado a partir do complexo e partícula magnética é ilustrado. O sistema na Figura 4 pode ser utilizado com o tubo amostra e método da matéria presentemente revelada.

[0215]De acordo com várias modalidades, um método de detectar um analito alvo em uma amostra pode compreender prover um tubo de amostra compreendendo uma porção cônica tendo um fundo plano fechado, e tendo um volume de complexo de partícula magnética contida no mesmo. O complexo de partícula magnética pode compreender o analito alvo e pode ser capaz de gerar um sinal detectável. O método pode ainda compreender posicionamento de um magneto adjacente e abaixo do fundo plano, em que o magneto é capaz de prover uma força magnética suficiente para atrair o complexo de partícula magnética contido dentro do tubo de amostra para o fundo plano e formar um concentrado de complexo de partícula magnética. De acordo com várias modalidades, um concentrado complexo de partícula magnética pode ser formado no fundo plano. De acordo com várias modalidades, um sinal gerado a partir do concentrado de complexo de partícula magnética pode ser detectado e analisado para determinar a presença ou ausência do analito alvo. Em algumas modalidades, a quantidade quantitativa e/ou identidade do analito pode ser determinada.

[0216]De acordo com várias modalidades do método, uma pluralidade de tubos de amostra pode ser providos. Cada tubo de amostra contém um volume de complexo de partícula magnética compreendendo um analito alvo. O método pode ainda compreender posicionamento de um ou mais magnetos, tal que a força magnética provida para cada um da pluralidade de tubos de amostra pode ser substancialmente equivalente entre cada tubo de amostra. De acordo com várias modalidades, a força magnética pode ser provida para cada tubo de amostra para substancialmente o mesmo período. De acordo com várias modalidades, a força magnética pode começar a atrair o complexo de partícula magnética em cada tubo de amostra substancialmente ao mesmo tempo.

[0217]De acordo com várias modalidades do método, o complexo de partícula magnética pode compreender uma partícula magnética compreendendo um primeiro padrão de captura específico para o analito alvo, uma partícula ativa – SERS compreendendo um segundo padrão de captura específico para o analito alvo, e o analito alvo. Um exemplo de complexo de partícula magnética é ilustrado na Figura 1. De acordo com várias modalidades, o analito alvo pode compreender um primeiro epítopo e um segundo epítopo que é diferente do primeiro epítopo. O primeiro padrão de captura pode compreender uma primeira fração que especificamente se liga ao primeiro epítopo, e o segundo padrão de captura pode compreender uma segunda fração que especificamente se liga ao segundo epítopo. Consequentemente, um complexo “sanduíche” pode ser formado. De acordo com várias modalidades, o complexo de partícula magnética pode ser capaz de gerar um sinal Raman.

[0218]Em pelo menos uma modalidade, uma partícula magnética compreendendo um primeiro padrão de captura para um analito alvo, uma partícula ativa – SERS compreendendo um segundo padrão de captura para o analito alvo, e uma amostra a ser analisada são introduzidos em um tubo de amostra. Condições

apropriadas são ainda providas para permitir a formação de um complexo partícula magnética. Por exemplo, um complexo de partícula magnética, tal como o complexo “sanduíche” ilustrado na Figura 1 pode ser formado. De acordo com várias modalidades, o método pode compreender uma pluralidade de tubos de amostras. Um ou mais magnetos podem ser posicionados tal que uma força magnética substancialmente equivalente pode ser provida a cada tubo de amostra substancialmente ao mesmo tempo. De acordo com várias modalidades, a formação do complexo de partícula magnética pode ser extinta equivalentemente. A matéria presentemente revelada pode usar uma fonte de luz, por exemplo, um laser, para apurar o complexo de partícula magnética. O tubo de amostra pode compreender uma janela óptica e o sinal pode ser detectado através da janela óptica. O sinal pode ser detectado utilizando um espectrômetro e/ou um dispositivo de carga acoplada.

[0219]Então, com a matéria presentemente revelada, um concentrado magnético que é adequado para um ensaio de captura magnético ser alcançado com um processo mais simples que preferivelmente não envolve rotação do tubo e/ou magneto para alcançar um concentrado magnético para propósitos de ensaio, tal como SERS ou outras técnicas de detecção. Um teste homogêneo consistente e/ou reproduzível pode ser alcançado utilizando a matéria presentemente revelada, tal que um concentrado magnético reproduzível em um tubo de amostra pode ser formado tendo as características desejadas e parâmetros suficientes para propósitos de ensaio como aqui descrito. Com a matéria presentemente revelada, o alinhamento do magneto com o tubo de amostra não é crítico e um complexo de partícula magnética homogêneo consistente e/ou reproduzível pode ser obtido que é capaz de gerar um sinal detectável para propósitos de ensaio. Em alguns sistemas de ensaio passados, alinhamento do magneto foi importante, em que se o alinhamento não foi apropriado, as partículas magnéticas podem não formarem uma

maneira consistente e desejável suficiente para ser utilizada para propósitos de ensaio.

[0220]Com a matéria presentemente revelada, outro benefício é a habilidade da matéria presentemente revelada para alcançar extinção em todo o tempo (por exemplo, dentro de 10 minutos, dentro de 5 minutos, dentro de 1 minutos, dentro de 30 segundos, dentro de 15 segundos, e semelhantes). O desenho do tubo de amostra permite a extinção ocorrer essencialmente ao mesmo tempo, tal que o sanduíche é extinto e a reação de anticorpo é parada, que permite um alcançar um melhor complexo de partícula magnética tendo os conteúdos desejáveis para propósitos de alcançar um ensaio acurado, completo e reproduzível utilizando SERS e semelhantes.

[0221]Em referência a Figura 20, os resultados de um ensaio de hormônio estimulante da tireóide (TSH) são mostrados. O ensaio foi feito utilizando um tubo de amostra de acordo com uma modalidade da matéria presentemente revelada. O ensaio foi feito em triplicata e a curva de re-ligação resultante é mostrada. O limite de detecção mínima (LDM) alcançado e o limite de detecção confiável (LDC) são pelo menos bons como tipicamente observados utilizando desenhos de tubo de amostra.

IV. REPRESENTATIVO DE ANALITOS ALVO DE INTERESSE

[0222]Os métodos presentemente revelados podem ser utilizados para avaliar ou medir a presença ou quantidade de um ou mais analitos alvo em uma amostra biológica. O termo “analito”, como aqui utilizado, geralmente se refere a uma substância a ser detectada, que pode estar presente ou suspeita de estar presente em uma amostra teste. Mais particularmente, um “analito” pode ser qualquer substância para a qual existe um parceiro ligador específico de ocorrência natural, tal como uma proteína ligadora ou receptor, ou para a qual o parceiro ligador específico pode ser preparado. Consequentemente, um “analito” é uma substância

que pode se ligar a um ou mais parceiros ligadores específicos em um ensaio. Em algumas modalidades, o analito pode ser qualquer composto, tal como um metabólito, para ser detectado ou medido e que tem pelo menos um sítio ligador.

[0223]Os analitos alvo podem ser qualquer molécula ou composto, do qual a presença ou quantidade é para ser determinada em uma amostra sobre teste. Exemplos de classes de analitos que podem ser medidos pelos métodos presentemente revelados incluem, mas não são limitados a aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, carboidratos, ácido graxo, lipídeos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, polinucleotídeos, glicoproteínas, tais como antígeno prostático específico (PSA), proteoglicanos, lipoproteínas, lipopolisacarídeos, drogas, metabólitos de drogas, pequenas moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas e polímeros naturais ou sintéticos. Exemplos de analitos alvo incluem, mas não são limitados a glicose, ácidos graxos livres, ácido láctico, proteína reativa C e mediadores antiinflamatórios, tais como citocinas, eicosanóides ou leucotrienos. Em algumas modalidades, os analitos alvo são selecionados a partir do grupo consistindo de ácidos graxos, proteína reativa C, e leucotrienos. Em outra modalidade, os analitos alvo são selecionados a partir do grupo consistindo de glicose, ácido láctico e ácidos graxos.

[0224]Mais particularmente, em algumas modalidades, o analito pode incluir glicose, como descrito aqui acima, antígeno prostático específico (PSA), isoenzima creatina quinase MB (CKMB), proteína troponina I cardíaca (cTnI), hormônio estimulante da tireóide (TSH), antígeno do influenza A (Flu A), antígeno do influenza B (Flu B), e antígeno do vírus sincicial respiratório (RSV).

[0225]Antígeno prostático específico (PSA) é uma proteína produzida pelas células da glândula próstata e tipicamente está presente em pequenas quantidades no soro dos homens normais. PSA pode estar elevado em homens afligidos com câncer de próstata ou outros distúrbios da próstata. Níveis sanguíneos de PSA

normais tipicamente são considerados estar entre cerca de 0,0 a 4,0 ng/mL, embora níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL (nanogramas por mililitro) são considerados suspeitos.

[0226]Creatina quinase (CK), também conhecida como fosfocreatina quinase ou creatina fosfoquinase (CPK) é uma enzima encontrada predominantemente no coração, cérebro, e músculo esquelético. Creatina quinase compreende três isoenzimas que diferem levemente na estrutura: CK-BB (também referida como CPK-1) é concentrada no cérebro e pulmões; CK-MB (também referido como CPK-2) é encontrado principalmente no coração; e CK-MM (também referido como CPK-3) é encontrado principalmente no músculo esquelético. Testes diagnósticos para isoenzimas CPK específicas são feitos quando o nível de CPK total está elevado e pode ajudar a diferenciar a fonte do tecido danificado. Por exemplo, uma injúria do cérebro, por exemplo, um derrame, ou pulmões, por exemplo, um embolismo pulmonar, pode estar associado com níveis elevados de CK-BB. Ainda, CK-MM é normalmente responsável por quase toda a atividade de enzima CPK em pacientes saudáveis. Quando esta isoenzima particular está elevada, ela normalmente indica injúria ou estresse no músculo esquelético.

[0227]Níveis de CK-MB podem ser medidos em pacientes que têm dor no tórax para diagnosticar se eles tiveram um ataque cardíaco e/ou como uma indicação para dano no miocárdio durante o ataque cardíaco. Tipicamente, valores de CK-MB exibem um aumento significativo em valores de CK-MB nas primeiras duas a três horas após o ataque cardíaco. Se não tem dano adicional ao músculo do coração, os níveis têm pico em 12-24 horas e retornam ao normal 12-48 horas após a morte tecidual. Níveis de CK-MB não aumentam usualmente com dor no tórax causada por angina, embolismo pulmonar (coágulo sanguíneo no pulmão), ou falência congestiva do coração. Níveis elevados de CK-MB também podem ser observados em pacientes sofrendo de miocardite (inflamação do músculo cardíaco,

por exemplo, devido a um vírus), injúrias elétricas, trauma cardíaco, desfibrilação cardíaca, e cirurgia de abertura do coração. Valores de CK-MB no soro sanguíneo medidos em tais ensaios tipicamente variam de cerca de 0,0 a cerca de 10 ng/mL. Valores de CK-MB maiores que cerca de 5 ng/mL tipicamente confirmam um diagnóstico de infarto cardíaco.

[0228]Proteína troponina I cardíaca (cTnI) também é um preditor independente de eventos cardíacos principais. Ver, por exemplo, Polanczyk, C.A., *et al*, "Cardiac troponin I as a predictor of major cardiac event in emergency department patients with acute chest pain", J. Am. Coll. Cardiol., 32, 8-14 (1998). Valores cTnI no soro sanguíneo medidos em paciente suspeito de ter um infarto do miocárdio variam de cerca de 0,4 ng/mL a cerca de 1,5 ng/mL. Ensaio Id. cTnI com detecção inferior aos limites de 0,1 ng/mL têm o potencial, entretanto, para serem mais sensíveis para detecção de injúria do miocárdio. Id.

[0229]Hormônio estimulante da tireóide (TSH) é sintetizado e secretado por células tireotropas na glândula pituitária anterior que regula a função endócrina da glândula tireóide. Níveis de TSH são testados no sangue de pacientes suspeitos de sofrerem de excesso (hipertireoidismo) ou deficiência (hipotireoidismo) de hormônio da tireóide. Níveis de TSH normais em adultos variam cerca de 0,4 unidades mil-internacionais por litro (mUI/L) a cerca de 4,5 mUI/L). Ensaios correntes para TSH incluem sanduíche ELISA para medir o TSH no soro ou plasma sanguíneo, em que TSH na amostra é ligado por anticorpos monoclonais anti-TSH e então detectado por espectrofotômetro ou colorimetria.

[0230]Os ensaios presentemente revelados também podem ser utilizados para detectar vírus influenza. Três tipos de vírus influenza existem: Influenzavírus A; Influenzavírus B; e Influenzavírus C. Influenza A (Flu A) e Influenza C (Flu C) infectam espécies múltiplas, enquanto o Influenza B (Flu B) infecta quase que exclusivamente humanos. Vírus do tipo A são os mais virulentos patógenos

humanos entre os três tipos de influenza e tipicamente causam doença mais severa. Vírus Influenza A pode ser sub-dividida em diferentes sorotipos baseados na resposta do anticorpo à esses vírus e incluem H1N1 (isto é, “Gripe Espanhola”); H2N2 (isto é, “Gripe Hong Kong”); H5N1 (isto é, cepa de influenza aviário ou “Gripe Aviária”); H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3, e H10N7. Influenza B é quase exclusivamente um patógeno humano e é menos comum que Influenza A e somente inclui um sorotipo. O vírus Influenza C infecta humanos e porcos e podem causar doença severa e epidemia local, mas é menos comum que outros tipos.

[0231] Testes diagnósticos disponíveis para influenza incluem imunoensaio rápido, ensaio de imunofluorescência, reação de polimerase em cadeia (PCR), sorologia, e cultura viral. Ensaio de imunofluorescência conferem coloração de espécimens imobilizadas nas lâminas do microscópio utilizando anticorpos marcados com fluorescência para observação por microscopia fluorescente. Métodos de cultura empregam isolamento viral inicial na cultura celular, seguido por inibição da hema-adsorção, imunofluorescência, ou ensaios de neutralização para confirmar a presença do vírus influenza. Ensaio de detecção de antígeno para diagnosticar a infecção de influenza incluem kits testes DIRECTIGEN®EZ Flu A ou DIRECTIGEN®EZ Flu A+B, (disponíveis por Sistemas Diagnósticos BD, Sparks, Maryland). Tais imunoensaios cromatográficos rápidos podem ser utilizados para a detecção direta de antígenos virais de influenza A ou influenza A e B a partir de lavados/aspirados nasofaríngeos, swabs nasofaríngeos e swabs de garganta de pacientes sintomáticos. Ainda, tais testes diagnósticos podem ser distinguir entre influenza A e influenza B.

[0232] Vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa mais comum de bronquiolite e pneumonia entre bebês e crianças abaixo de 1 ano de idade. RSV é um vírus RNA envelopado, senso-negativo. Diagnóstico de infecção RSV pode ser feito por isolamento viral, detecção de antígenos virais, detecção de RNA viral,

demonstração de um aumento nos anticorpos séricos, ou uma combinação dessas abordagens. Métodos tradicionais para detecção de vírus respiratórios têm incluído cultura celular e fluorescência direta do anticorpo (DFA). Imunoensaio enzimático (EIA) e sistemas manuais rápidos estão disponíveis para vírus específicos tais como Influenza A/B e RSV. Correntemente, a maioria dos laboratórios clínicos usam ensaios de detecção de antígeno para diagnosticar infecção RSV, tais como teste DIRECTIGEN®EZ RSV (disponível de Sistemas Diagnósticos BD, Sparks, Maryland), que é um imunoensaio cromatográfico rápido para a detecção direta e qualitativa de antígeno de RSV em lavados nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, swabs nasofaríngeos e swabs/lavados nasofaríngeos a partir de pacientes suspeitos de ter uma infecção respiratória viral.

[0233]Consequentemente, em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método para detectar a presença ou quantidade de um alvo analito em uma amostra biológica, por exemplo, soro sanguíneo, em que o alvo analito inclui glicose, antígeno específico da próstata (PSA), isoenzima creatina quinase (CKMB), proteína cardíaca troponina I (cTnI), hormônio estimulante da tireóide (TSH), antígeno do influenza A (Flu A), antígeno do influenza B (Flu B), e antígeno do vírus sincicial respiratório (RSV), o método compreendendo contactar a amostra biológica com um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associada a elas pelo menos um membro ligador específico tendo uma afinidade para o analito, por exemplo, uma proteína ligadora específica ou um anticorpo monoclonal ou policlonal para o analito de interesse, e pelo menos uma molécula repórter ativa –SERS; iluminando a amostra biológica com radiação incidente em um comprimento de onda para induzir a molécula repórter ativa – SERS para produzir um sinal SERS; e medir o sinal SERS para detectar a presença ou quantidade do analito na amostra biológica.

[0234]Como aqui utilizado, o termo “carboidrato” inclui, mas não é limitado a monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. “Carboidrato” também inclui, mas não é limitado a moléculas compreendendo carbono, hidrogênio e oxigênio que não cae dentro da definição tradicional de um sacarídeo, isto é, um derivado de aldeído ou cetona de uma álcool poliidroxílico de cadeia reta contendo pelo menos três átomos de carbono. Então, por exemplo, um carboidrato como aqui utilizado pode conter menos que três átomos de carbono.

[0235]O termo “ácidos graxos”, como aqui utilizado inclui todos os ácidos graxos, incluindo ácidos graxos livres (AGL) e ácidos graxos esterificados para outras moléculas. Exemplos de ácidos graxos específicos incluem, mas não são limitados a, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato e araquidonato. O termo “ácido graxo livre” é aqui utilizado como é conhecido na técnica em que AGL não são parte de outras moléculas, tais como triglicerídeos ou fosfolipídeos. Ácidos graxos livres incluem ácidos graxos não esterificados que são ligados a ou adsorvem em albumina. Como aqui utilizado, o termo “ácido graxo livre não ligado” (AGL não ligado) é utilizado para denotar um ácido graxo livre ou ácidos graxos livres que não são ligados ou adsorvidos em albumina ou outras proteínas séricas.

[0236]Como aqui utilizado, o termo “lipídeo” é aqui utilizado na técnica, isto é, uma substância de origem biológica que é feita primariamente ou exclusivamente de grupos químicos não polares tal que são facilmente solúveis na maioria dos solventes orgânicos, mas somente moderadamente solúveis em solventes aquosos. Exemplos de lipídeos incluem, mas não são limitados a ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, colesterol, esteróides e derivados dos mesmos. Por exemplo, “lipídeos” incluem, mas não são limitados a, ceramidas, que são derivados de esfingolipídeos e derivados de ceramidas, tal como esfingomielinas, cerebrosídeos e gangliosídeos. “Lipídeos” também incluem, mas não são limitados a classes comuns de glicerofosfolipídeos (ou fosfolipídeos), tais como ácido

fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol e semelhantes.

[0237] Como aqui utilizado, uma “droga” pode ser uma droga conhecida ou um candidato a droga, cuja atividade ou efeitos em um tipo celular particular não são ainda conhecidos. Um “metabólito de droga” é qualquer dos sub-produtos ou produtos de quebra de uma droga que é mudada quimicamente em outro composto ou compostos. Como aqui utilizado, “moléculas orgânicas pequenas” incluem, mas não são limitadas a uma molécula orgânica ou composto que não se encaixe precisamente em outras classificações destacadas aqui. Mais particularmente, o termo “molécula orgânica pequena” como aqui utilizado, refere-se a compostos orgânicos, seja de ocorrência natural ou criados artificialmente (por exemplo, através da síntese química) que tenha relativamente baixo peso molecular e que não são proteínas, polipeptídeos, ou ácidos nucleicos. Tipicamente, moléculas pequenas têm um peso molecular de menos que cerca de 1500 g/mol. Também, pequenas moléculas tipicamente têm ligações carbono-carbono múltiplas.

[0238] Ainda, em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método de detecção de um ou mais ácidos nucleicos, por exemplo, ácido deoxiribonucleico (DNA), um fragmento de DNA, um nucleotídeo, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, e semelhantes. Geralmente, o método compreende contactar um ou mais de um ácido nucleico, um fragmento de DNA, um nucleotídeo, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, com uma nanopartícula ativa – SERS presentemente revelada tendo um oligonucleotídeo ligado ao mesmo e detectando a presença de ou uma mudança no espectro SERS do mesmo. Em modalidades exemplares, os oligonucleotídeos ligados às nanopartículas ativas SERS presentemente reveladas têm uma sequência, ou sequências, complementares à porções da sequência do ácido nucleico alvo, fragmento de DNA, nucleotídeo, polinucleotídeo, ou oligonucleotídeo. Um espectro SERS detectável, e

/ou uma mudança no espectro SERS, pode ser observada como um resultado da hibridização do oligonucleotídeo ligado à nanopartícula ativa SERS e o ácido nucléico alvo, fragmento de DNA, nucleotídeo, polinucleotídeo ou oligonucleotídeo.

[0239]As nanopartículas ativas – SERS presentemente revelados, os oligonucleotídeos, ou ambos podem ser funcionalizados para se ligarem a oligonucleotídeos para as nanopartículas. Tais métodos são conhecidos na técnica. Por exemplo, oligonucleotídeos funcionalizados com alcanotíóis na terminação 3' ou terminação 5' facilmente ligados a nanopartículas, incluindo nanopartículas metais de ouro ou outros. Ver, por exemplo, Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, Tex., p. 109-121 (1996); ver, também, Muncic et al., Chem. Commun. 55-557 (1996) (descrevendo um método de ligação DNA 3'tiol à superfícies de ouro retas que também podem ser utilizados para se ligar a oligonucleotídeos à nanopartículas).

[0240]Outros grupos funcionais adequados para se ligar oligonucleotídeos à superfícies sólidas incluem grupos fosforotioatos (ver, por exemplo, Pat. EUA No. 5.472.881 a *Beebe et al.*, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, para a ligação do oligonucleotídeo-fosforotioatos para superfícies de ouro), alquilsiloxanos substituídos (ver, por exemplo, Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) e Matteucci e Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191 (1981) para se ligar a oligonucleotídeos à sílica e superfícies de vidro, e Grabar et al., Anal. Chem. 67, 735-743 (1995) para ligação de aminoalquilsiloxanos e para ligação similar de mercaptoalquilsiloxanos). Oligonucleotídeos terminados com um tionucleosídeo 5' ou um tionucleosídeo 3' também pode ser utilizado para se ligar a oligonucleotídeos para superfícies sólidas.

[0241]Outros métodos são conhecidos na técnica para ligação de oligonucleotídeos à nanopartículas. Tais métodos são descritos nas seguintes

referências representativas. Nuzzo *et al*, J. Am. Chem. Soc., 109, 2358 (1987) *dissulfetos em ouro); Allara e Nuzzo, Langmuir, 1, 45 (1985) (ácidos carboxílicos em alumínio); Allara e Tompkins, J. Colloid Interface Sci., 49, 410-421 (1974) (ácidos carboxílicos em cobre); Iler, The Chemistry Of Silica, Capítulo 6, John Wiley & Filhos, Nova Iorque (1979) (ácidos carboxílicos e sílica); Timmons e Zisman, J. Phys. Chem., 69, 984-990 (1965) (ácidos carboxílicos em platina); Soriaga e Hubbard, J. Am. Chem. Soc., 104, 3937 (1982) (compostos de anel aromático em platina); Hubbard, Acc. Chem. Res., 13, 177 (1980) (sulfolanos, sulfóxidos e outros solventes funcionalizados em platina); Hickman *et al*, J. Am. Chem. Soc., 111, 7271 (1989) (isonitrilas em platina); Maoz e Sagiv, Langmuir, 3, 1045 (1987) (silanos em sílica); Maoz e Sagiv, Langmuir, 3, 1034 (1987) (silanos em sílica); Wasserman *et al*, Langmuir, 5, 1074 (1989) (silanos em sílica); Eltekova e Eltekov, Langmuir, 3, 951 (1987) (ácidos carboxílicos aromáticos, aldeídos, alcóois e grupos metóxi em dióxido de titânio e sílica); Lec *et al*, J. Phys. Chem. 92, 2597 (1988) (fosfatos rígidos em metais).

[0242] Ainda, oligonucleotídeos funcionalizados com um dissulfeto cíclico, por exemplo, dissulfetos cíclicos tendo um anel de 5- a 6-membros incluindo pelo menos dois átomos de enxofre, também são adequados para uso com a matéria presentemente revelada. Dissulfetos cíclicos adequados são disponíveis comercialmente ou podem ser sintetizados por procedimentos conhecidos. A forma reduzida dos dissulfetos cíclicos também podem ser utilizados. Em algumas modalidades, o dissulfeto cíclico podem ainda ter um ligador, por exemplo, uma fração hidrocarboneto, tal como um resíduo esteróide, ligado ao mesmo.

[0243] Cada nanopartícula pode ter uma pluralidade de oligonucleotídeos ligados a mesma. Como um resultado, cada conjugado nanopartícula-oligonucleotídeo podem se ligar a uma pluralidade de oligonucleotídeos ou ácidos nucleicos tendo uma sequência complementar. Métodos de fazer oligonucleotídeos

de uma sequência pré-determinada são bem conhecidos. Ver, por exemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., 1989) e F. Exkstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1ª Ed. (Oxford University Press, Nova Iorque, 1991). Métodos de síntese de fase sólida podem ser utilizados para oligoribonucleotídeos e oligodeoxiribonucleotídeos (métodos conhecidos de sintetizar DNA também são úteis para sintetizar RNA). Oligoribonucleotídeos e oligodeoxiribonucleotídeos também podem ser preparados enzimaticamente.

[0244]Consequentemente, a matéria presentemente revelada provê um método para detectar ácidos nucleicos. Qualquer tipo de ácido nucleico pode ser detectado pelo método presentemente revelado. Assim, os métodos presentemente revelados podem ser utilizados em várias aplicações onde a detecção de um ácido nucleico é requerida, por exemplo, no diagnóstico de doença e no sequenciamento de ácidos nucleicos. Exemplos de ácidos nucleicos que podem ser detectados pelos métodos presentemente revelados incluem, mas não são limitados a , genes (por exemplo, um gene associado com uma doença particular), RNA e DNA viral, DNA bacteriano, DNA fúngico, cDNA, mRNA, fragmentos de RNA e DNA, oligonucleotídeos, oligonucleotídeos sintéticos, oligonucleotídeos modificados, ácidos nucleicos de fita única e fita dupla, ácidos nucleicos naturais e sintéticos, e semelhantes.

[0245]Exemplos representativos dos usos de métodos de ácidos nucleicos incluem, mas não são limitados, a diagnósticos e/ou monitoramento de doenças virais (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite, vírus da herpes, citomegalovírus, e vírus Epstein-Barr), doenças bacterianas (por exemplo, tuberculose, doença de Lyme, H. Pylori, infecções por Escherichia coli, infecções por Legionella, infecções por Mycoplasma, infecções por Salmonella), doenças sexualmente transmitidas (por exemplo, gonorréia), distúrbios herdados (por exemplo, fibrose cística, distrofia muscular de Duchene, fenilcetonúria, anemia

celular falciforme), e cânceres (por exemplo, genes associados com o desenvolvimento do câncer); em laboratórios criminais; em sequenciamento de DNA; para testar paternidade; para autenticação da linhagem celular; para monitorar terapia gênica; e para muitos outros propósitos.

[0246]A ácido nucléico a ser detectado pode ser isolado por métodos conhecidos, ou podem ser detectados diretamente em células, amostras tissulares, fluídos biológicos (por exemplo, saliva, urina, sangue, soro, e semelhantes), soluções contendo componentes de PCR, soluções contendo grandes excessos de oligonucleotídeos ou DNA de alto peso molecular, e outras amostras, como também conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) e B.D. Hames e S.J. Higgins, Eds. Gene Probes 1 (IRL Press, Nova Iorque, 1995). Métodos de preparar ácidos nucléicos para detecção com padrões hidridizantes também são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) e B.D. Hames e S.J. Higgins, Eds., Gene Probes 1 (IRL Press, Nova Iorque, 1995). Se um ácido nucléico está presente em pequenas quantidades, ele pode ser aplicado por método conhecidos na técnica, incluindo amplificação em reação em cadeia polimerase (PCR). Ver, por exemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning; A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) e B.D. Hames e S.J. Higgins, Eds. Gene Probes 1 (IRL, Nova Iorque, 1995).

[0247]Um método presentemente revelado para detecção de ácido nucléico compreende contactar um ácido nucléico com uma ou mais nanopartículas presentemente reveladas tendo oligonucleotídeos ligados ao mesmo. O ácido nucléico a ser detectado pode ter pelo menos duas porções. Os comprimentos dessas porções e a(s) distância(s), se qualquer, entre elas são escolhidas de forma que quando os oligonucleotídeos nas partículas hibridizadas ao ácido nucléico, um sinal SERS detectável pode ser observado. Esses comprimentos e distâncias podem

ser determinados empiricamente e dependem do tipo de partícula utilizada e seu tamanho e tipo de eletrólito presente em soluções utilizadas no ensaio (como é conhecido na técnica, certos eletrólitos afetam a conformação de ácidos nucleicos).

[0248]Também, quando um ácido nucleico é para ser detectado em presença de outros ácidos nucleicos, as porções do ácido nucleico as quais os oligonucleotídeos nas nanopartículas estão para se ligar devem ser escolhidos de forma que eles contêm sequência única suficiente de forma que a detecção do ácido nucleico será específica. Guias para execução são bem conhecidos na técnica. O contato dos conjugados nanopartículas-oligonucleotídeos com o ácido nucleico toma lugar sob condições efetivas para hibridização dos oligonucleotídeos nas nanopartículas com a(s) sequência(s) alvo(s) do ácido nucleico. Essas condições de hibridização são bem conhecidas na técnica e podem ser facilmente otimizadas para o sistema particular empregado. Ver, por exemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., 1989). Em algumas modalidades, condições de hibridização severa são empregadas.

[0249]Métodos representativos para detecção de ácidos nucleicos por uso de nanopartículas ativas –SERS tendo oligonucleotídeos ligados as mesmas são reveladas na Patente dos EUA No. 7.169.556 em Park *et al*, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[0250]Como aqui utilizado, o termo “amostra” inclui qualquer amostra líquida ou fluída, incluindo uma amostra derivada a partir de uma fonte biológica, tal como um fluido fisiológico, incluindo sangue total ou componentes do sangue total, tais como células do sangue vermelho, células brancas do sangue, plaquetas, soro e plasma; ascites, urina; saliva; suor; leite; fluido sinovial; fluido peritoneal; fluido amniótico; fluido pericerebroespinal; fluido linfóide; embolismo pulmonar; fluido cerebroespinal; fluido pericárdico; amostras cervicovaginal; extratos tissulares; extratos celulares; e outros constituintes do corpo que são suspeitos de conter o

analito de interesse. Em adição a fluídos fisiológicos, outras amostras líquidas, tais como água, produtos alimentícios e semelhantes, para o desempenho do ambiente ou ensaios de produção de comida são adequados para uso com a matéria presentemente revelada. Um material sólido suspeito de conter o analito também pode ser utilizado como a amostra teste. Em alguns exemplos pode ser benéfico modificar uma amostra de teste sólido para formar um meio líquido ou liberar o analito.

[0251]Em algumas modalidades, a amostra pode ser pré-tratada antes de usar, tal como preparação de plasma a partir do sangue, diluição dos fluídos viscosos, ou semelhantes. Tais métodos de tratamento podem envolver filtração, destilação, concentração, inativação de compostos interferentes, e a adição de reagentes.

[0252]A amostra pode ser qualquer amostra obtida a partir de um paciente. O termo “paciente” refere-se a um organismo, tecido, a célula a partir da qual uma amostra pode ser obtida. Um paciente pode incluir um paciente humano para propósitos médicos, tal como diagnóstico e/ou tratamento de uma condição ou doença, ou um paciente animal para propósitos médicos, veterinários, ou propósitos de desenvolvimento. Um paciente também pode ser incluir material de amostra a partir de cultura de tecido, cultura celular, replicação do órgão, produção de célula tronco e semelhantes. Pacientes animais adequados incluem mamíferos e aviários. O termo “aviário”, como aqui utilizado, inclui mas não é limitado a galinhas, patos, ganso, codorna, perus e faisão. O termo “mamífero” como aqui utilizado inclui, mas não é limitado a primatas, por exemplo, humanos, macaquinho, macaco, e semelhantes; bovinos, por exemplo, gado, boi e semelhantes; ovinos, por exemplo, carneiro e semelhantes; caprinos, por exemplo, cabra e semelhantes; porcinos, por exemplo, porcos, porco, e semelhantes; equinos, por exemplo, cavalos, burro, zebras, e semelhantes; felinos, incluindo gatos selvagens e domésticos; caninos,

incluindo cachorros; lagomorfos, incluindo coelhos, lebre, e semelhantes; e roedores, incluindo camundongos, ratos e semelhantes. Preferivelmente, o paciente é um mamífero ou uma célula mamífera. Mais preferivelmente, o paciente é um humano ou uma célula humana. Pacientes humanos incluem, mas não são limitados a pacientes fetais, neonatais, infantes, juvenis e adultos. Ainda, um “paciente” pode incluir um paciente afligido com ou suspeito de estar em aflição com uma condição ou doença. Então, os termos “paciente” e “sujeito” são aqui utilizados de modo passível de mudança. Um paciente também pode referir a células ou coleções de células em laboratório ou cultura de bioprocessamento em testes para viabilidade, diferenciação, produção de marcador, expressão e semelhantes.

[0253]Os métodos presentemente revelados podem ser utilizados para diagnosticar, para o prognóstico, ou para monitoramento de um estado ou condição de doença. Como aqui utilizado, o termo “diagnóstico” refere-se a um processo preditivo em que a presença, ausência, severidade ou curso do tratamento de uma doença, distúrbio ou outra condição médica é avaliada. Para propósitos aqui, diagnósticos também inclui processos preditivos para determinar o resultado resultando a partir de um tratamento. Assim, o termo “diagnóstico” refere-se a determinação de se uma amostra espécime exibe uma ou mais características de uma condição ou doença. O termo “diagnóstico” inclui estabilizar a presença ou ausência de, por exemplo, um antígeno alvo ou reagentes de ligação aos alvos, ou estabilizantes, ou de outra forma determinando uma ou mais características de uma condição ou doença, incluindo tipo, grau, estágio, ou condições similares. Como aqui utilizado, o termo “diagnóstico” pode incluir distinguir uma forma de uma doença da outra. O termo “diagnóstico” compreende o diagnóstico inicial ou detecção, prognóstico, e monitoramento de uma condição ou doença.

[0254]O termo “prognóstico”, e derivações do mesmo, refere-se a determinação ou predição do curso de uma doença ou condição. O curso de uma

doença ou condição pode ser determinada, por exemplo, baseado na expectativa de vida ou qualidade de vida. “Prognóstico” inclui a determinação do curso temporal de uma doença ou condição, com ou sem um tratamento ou tratamentos. No exemplo onde tratamento (s) são contemplados, o prognóstico inclui determinação da eficácia de um tratamento para a doença ou condição.

[0255]Como aqui utilizado, o termo “risco” refere-se a um processo preditivo em que a probabilidade de um resultado particular é avaliado.

[0256]O termo “monitoramento”, tal como em “monitoramento do curso de uma doença ou condição”, refere-se ao avanço do diagnóstico de amostras obtidas a partir de paciente tendo ou suspeito de ter uma doença ou condição.

[0257]O termo “marcador” refere-se a uma molécula, tal como uma proteína, incluindo um antígeno, que quando detectado em uma amostra é característico de ou indica a presença de uma doença ou condição.

[0258]A matéria presentemente revelada também provê métodos para monitorar estados de doença em um paciente, incluindo doenças crônicas, tal como, mas não limitados a, doença cardíaca, doença de artéria coronária, diabetes, distúrbios metabólicos, doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide e câncer. Os distúrbios metabólicos podem incluir, mas não são limitados a, hiperlipidemia, hipolipidemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo.

[0259]Ainda, os métodos presentemente revelados podem ser monitorar marcadores específicos de uma doença crônica. Por monitorar as concentrações de artefatos moleculares, metabólitos, e moléculas deletérias e/ou benéficas de um estado de doença, a progressão do paciente, regressão ou estabilidade pode ser avaliado, e tratamentos podem, por sua vez ser ajustados ou revisados consequentemente. Por exemplo, marcadores para doença cardíaca que podem ser monitorados in vivo utilizando os biosensores presentemente revelados incluem, mas não são limitados a, ácidos graxos totais, lactato, glicose, ácidos graxos livres e

vários agentes cardiotônicos, tal como, mas não limitados a carfioglicosídeos e simpatomiméticos. Marcadores de diabetes incluem, mas não são limitados a, glicose, lactato e ácidos graxos. De outra forma, marcadores para doença de artéria coronária incluem, mas não são limitadas a, peptídeo reativo C e ácido graxos livres. Geralmente, marcadores de vários distúrbios metabólicos incluem, mas não são limitados a, ácidos graxos específicos.

[0260]As nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas também são adequadas para uso em dispositivos para monitorar tratamento de droga. Realmente, a nanopartícula ativa –SERS pode ser desenhada para especificamente se ligar a uma droga, candidato a droga ou um metabólito de droga. Desta forma, a concentração plasmática da droga pode ser monitorada e doses podem ser ajustadas ou mantidas baseadas nas medidas de concentração providas pelo método SERS. Consequentemente regime farmacêutico pode ser individualizado por um paciente particular, incluindo o uso de uma nanopartícula ativa – SERS que pode especificamente e reverssivelmente se ligar a droga ou metabólito da droga para determinar as concentrações plasmáticas da droga. As concentrações providas pelo método SERS pode então ser utilizado para determinar a biodisponibilidade da droga no paciente. A dose da droga administrada para o paciente pode então ser alterada para aumentar ou diminuir a biodispobinibilidade da droga para o paciente para prover benefícios terapêuticos máximos e evitando toxicidade.

[0261]As nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas também podem ser utilizadas para simultaneamente monitorar uma variedade de metabólitos, as medidas dos quais podem ser utilizadas para o perfil metabólico ou estado físico do paciente. Por exemplo, durante períodos estendidos de exercício árduo, glicose é quebrada em processo anaeróbico para ácido láctico. Nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas para determinar limiares de atletas, para maximizar os benefícios de treinamento e diminuir o tempo de recuperação.

Similarmente, as nanopartículas ativas –SERS podem ser utilizadas para determinar limiares de lactato em soldados para prevenir fadiga e exaustão e diminuir o tempo de recuperação. Para este fim, as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas para monitorar níveis de glicose, níveis de ácidos lácticos e outros metabólitos durante o exercício ou estresse físico.

[0262]As nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas também podem ser utilizadas para monitorar uma condição ou estado de doença em um paciente em uma facilidade de cuidado agudo, tal como uma sala de emergência ou uma sala de recuperação pós-operatória ou um hospital. Por exemplo, nas modalidades provendo um método para monitorar níveis de glicose em um paciente, estudos têm mostrado que mortalidade pode ser diminuído por tanto quanto 30% em pacientes pós-operatórios quando níveis de glicose são monitorados e mantidos normais. Então, os ensaios diagnósticos baseados em SERS presentemente revelados podem ser utilizados em situações onde monitorar a glicose ou outros metabólitos é essencial para recuperar ou a saúde geral do paciente.

[0263]A quantidade de um ou mais analitos presentes em uma amostra sob teste pode ser representada como uma concentração. Como aqui utilizado, o termo “concentração” tem seu significado ordinário na técnica. A concentração pode ser expressa como um valor qualitativo, por exemplo, como um resultado do tipo negativo ou positivo, por exemplo, uma resposta “SIM” ou “NÃO”, indicando a presença ou ausência de um analito alvo, ou como um valor quantitativo. Ainda, a concentração de um dado analito pode ser relatado como uma quantidade relativa ou uma quantidade absoluta, por exemplo, como um “valor quantitativo”. Os ensaios presentemente revelados, em algumas modalidades, são capazes de detectar um analito de interesse em uma concentração variando de cerca de 5 fg/mL a cerca de 500 ng/mL; em algumas modalidades, em uma concentração variando de cerca de

10 fg/mL a cerca de 100 ng/mL; em algumas modalidades, em uma concentração variando de cerca de 50 fg/mL a cerca de 50 ng/mL.

[0264]A quantidade (concentração) de um analito pode ser igual a zero, indicando a ausência do analito particular pesquisado ou que a concentração do analito particular está abaixo do limite de detecção do ensaio. A quantidade medida podem ser o sinal SERS sem qualquer medida ou manipulação adicional. Alternativamente, a quantidade medida pode ser expressa como uma diferença, porcentagem ou proporção do valor medido do analito particular para um valor medido de outro composto incluindo, mas não limitado a um padrão ou outro analito. A diferença pode ser negativa, indicando uma diminuição em uma quantidade do(s) analito(s) medido(s). As quantidades também podem ser expressas como uma diferença ou proporção do(s) analito(s) por elas mesmos, medidas em um ponto diferente no tempo. As quantidades de analitos podem ser determinadas diretamente a partir de um sinal gerado, ou o sinal gerado pode ser utilizado em um algoritmo, com o algoritmo desenhado para correlacionar o valor dos sinais gerados para a quantidade do(s) analito(s) na amostra.

[0265]As nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas são fáceis para uso com dispositivos capazes de continuamente medir as concentrações de um ou mais analitos. Como aqui utilizado, o termo “continuamente”, em conjunção com a medida de um analito, é utilizado para significar o dispositivo que ou gera ou é capa de gerar um sinal detectável em qualquer tempo durante a longevidade do dispositivo. O sinal detectável pode ser constante, neste o dispositivo está sempre gerando um sinal, mesmo se um sinal não é detectado. Alternativamente, o dispositivo pode ser utilizado episodicamente, tal que um sinal detectável pode ser gerado, e detectado, em qualquer tempo desejado.

V. IMAGEM CELULAR

[0266]O tamanho pequeno das nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas permitem as nanopartículas serem incorporadas em células. Por exemplo, o uso de SERS para estudo da complexação de um agente quimioterapêutico com DNA tem sido demonstrado. Ver Nabiev, I.R. *et al*, “Selective analysis of antitumor drug interactions with living cancer cells as probed by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Eur. Biophys. J.*, 19, 311-316 (1991); Morjani, H., *et al*, “Molecular and cellular interactions between topotecan, DNA, and topoisomerase II studied by surface-enhanced Raman dispersion spectroscopy”, *Cancer Res.*, 53, 4784-4790 (1993). SERS também tem sido utilizado para investigar o mecanismo de resistência quimioterapêutica para certos cânceres. Ver Breuzard, G., *et al*, “Surface-enhanced Raman dispersion reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells,” *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 320, 615-621 (2004). Ainda, SERS tem sido utilizado para caracterizar a distribuição das químicas particulares dentro das células e para distinguir entre o citoplasma e o núcleo da célula. Ver Kneipp, K., *et al*, “Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles,” *Appl. Spectrosc.*, 56(2), 150-154 (2002).

[0267]Consequentemente, em algumas modalidades, nanopartículas marcadas com as moléculas repórter podem ser utilizadas para imagem celular, por exemplo, para distinguir entre células anormais, por exemplo, uma célula exibindo uma anomalia, tais como uma célula cancerosa, versus células normais em uma amostra biológica. Em tais modalidades, a intensidade do sinal Raman aumentando a partir do corante é proporcional para a densidade das células detectadas. Ainda, em algumas modalidades, as nanopartículas marcadas com as moléculas repórteres também podem ser marcadas com outras espécies, tal como um membro ligador específico de um par ligador, por exemplo, um anticorpo, para facilitar a ligação a uma célula de interesse. O uso de nanopartículas para imagem celular é descrito na

Publicação do Pedido de Patente dos EUA Nos. 2006/005406 e 2006/0046313, cada uma das quais é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[0268]Consequentemente, em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método para detectar a presença de um ou mais estruturas alvos em uma amostra celular, o método compreendendo: (a) contactando um ou mais amostra de células com uma ou mais nanopartículas ativas –SERS marcadas com um ou mais membros ligadores sob condições adequadas para a ligação de um ou mais membros ligadoras a um ou mais estruturas alvos nas amostras celulares, em que a nanopartícula ativa –SERS tem associada com a mesma uma molécula repórter capaz de produzir um sinal Raman distinguível; e (b) detectando um ou mais sinais SERS distinguíveis a partir da amostra celular para indicar a presença de uma ou mais estruturas alvo na amostra celular.

[0269]Em algumas modalidades, as nanopartículas ativas –SERS presentemente reveladas podem ser utilizadas para corar microestruturas dentro de uma célula. Em tais modalidades, as nanopartículas ativas –SERS podem ser marcadas com pelo menos um ligante que especificamente se liga a uma microestrutura ou receptor alvo conhecido. Em algumas modalidades, um grupo de padrões de nanopartículas ativas – SERS podem ser utilizados, em que cada membro do grupo compreende uma combinação de um ligante que especificamente se liga a um alvo conhecido ou receptor e um ou mais corantes ativos –SERS que podem produzir um sinal SERS distinguível sob a ligação com o alvo.

[0270]Sob condições adequadas, as nanopartículas ativas – SERS podem especificamente se ligar aos receptores e outras microestruturas dentro da célula. As células “coradas” podem então ser feitas imagens, por exemplo, utilizando um escaneamento de microscopia Raman para determinar a presença e localização de receptores específicos e microestruturas nas células. Ainda, os sinais SERS a partir de corantes ativos – SERS individuais associados com um ligante particular podem

ser utilizados para distinguir entre receptores específicos e microestruturas na célula e criar um perfil dos receptores e microestruturas na célula. O perfil de uma célula alvo ensaiada de acordo com o método presentemente revelado pode ser comparado com um perfil similarmente obtido a partir de uma célula normal do mesmo tipo para determinar a presença de uma anomalia na célula alvo. A célula alvo pode ser ou viva ou morta.

[0271]Como aqui utilizado, o termo “microestrutura” inclui, mas não é limitado a moléculas da matriz extracelular, tal como fibronectina e laminina; estruturas intracelulares, tais como filamento de actina e microtúbulos; estruturas nucleares da célula, tais como histonas; e semelhantes. Ligantes adequados para ligação em tais estruturas podem ser selecionados a partir de ligantes revelados aqui, e incluem, mas não são limitados a anticorpos, tais como anticorpos anti-fibronectina e anticorpos anti-actina, a outros ligantes de ocorrência natural, tal como proteína anti-histona.

[0272]Imagens de células contendo informação espectral Raman podem ser obtidas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um microscópio pode ser acoplado a uma câmera de dispositivo acoplado à carga (CCD) tal que imagens completas da amostra podem ser obtidas. Tipicamente, em tais modalidades, um dispositivo de filtração de número de onda (ou comprimento de onda), tal como um monocromador ou filtro ajustável de cristal líquido, pode ser inserido entre a amostra e a câmera CCD. O dispositivo de filtração permite somente uma fina largura de radiação dispersos para alcançar a câmera CCD em qualquer outro tempo. Imagens múltiplas podem ser coletadas por câmera CCD, em que cada imagem cobre uma variação de espectro particular da radiação dispersos. O espectro a partir de cada ponto na imagem podem ser reunido no programa. Alternativamente, luz a partir de um ponto único de uma imagem pode ser dispersa através de um monocromador e o espectro completo deste ponto pode ser adquirido

em um detector de rede. A amostra podem ser escaneada tal que cada ponto na imagem é adquirido separadamente. A imagem Raman é então reunida no programa. Em outra abordagem, um instrumento de escaneamento em linha pode ser construído que excita a amostra com uma linha de radiação. A linha é faz a imagem espacialmente ao longo de um eixo de uma câmera CCD enquanto simultaneamente sendo espectralmente disperso ao longo do eixo ortogonal. Cada leitura da câmera adquire o espectro completo de cada pixel espacial na linha.

[0273]Para completar a imagem a linha é escaneada através da amostra. Um exemplo de um instrumento Raman adequado para fazer imagem é descrito em Talley, *et al.*, "Nanoparticle Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", NATO Advanced Study Institute: Biophotonis, Ottawa, Canadá (6 de Janeiro de 2005).

[0274]Em algumas modalidades, as nanopartículas ativas –SERS presentemente reveladas podem ser incorporadas em uma célula ou tecido por um mecanismo de captação passivo. Outro mecanismo para incorporar nanopartículas em células é através do uso de pequenos peptídeos, que podem se ligar aos receptores endocítico na superfície celular e fagocitar as nanopartículas na célula através de endocitose. Ver Tkachencko, A.G., *et al*, "Celluar trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains," Bioconjugate Chem., 15, 482-490 (2004). Ainda, as nanopartículas ativas –SERS podem ser introduzidas em células através de microinjeção, transfecção, eletroporação, e abordagens mediadas por endocitose, incluindo o uso de peptídeos anfipáticos, tal como PEP-1, o uso de reagentes baseados em lipídeos catiônicos, tal como LIPOFECTAMINE® (Invitrogen Corp., Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América), e o uso de micelas e reagentes de transfecção tais como transferrina, manose, galactose, e Arg-Gly-Asp (RGD), e outros reagentes tal como reagente baseado em dendrímero SUPERFECT® (Qiagen, Inc., Valencia, Califórnia, Estados Unidos da América). Intracelularmente,

métodos indiretos podem ser utilizados para mostrar que as partículas estão ligadas aos alvos desejados. Um método adequado para demonstrar a especificidade dos padrões é imunofluorescência, que pode ser utilizado para verificar a locação das nanopartículas ativas – SERS. Um número de padrões fluorescentes disponíveis comercialmente é útil para estruturas celulares marcadas (tal como a mitocôndria, aparato Golgi e retículo endoplasmático) em células vivas. Por conjugar um anticorpo que tem como alvo a mesma estrutura, a fração de nanopartículas que ativamente marcam o alvo podem ser determinados. Da mesma forma, qual a porcentagem de nanopartículas que são ligadas não especificamente também pode ser determinado. Outra abordagem para verificar a locação das nanopartículas ativas – SERS é para usar fusões de proteína fluorescente, tal como GFP e seus análogos.

[0275]Em algumas modalidades, agentes de imagens compreendendo as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas são providas para uso no diagnóstico médico. Os agentes de imagens presentemente revelados são úteis nas imagens de pacientes geralmente, e/ou especificamente diagnosticando a presença do tecido doente em um paciente. Como descrito aqui acima, por selecionar o tamanho, forma, e composição da nanopartícula núcleo; a identidade do corante; e a composição e espessura do encapsulamento, se desejado, a excitação ótima e emissão de frequências das nanopartículas ativas – SERS podem ser ajustadas para ocorrer entre cerca de 630 nm e cerca de 1000 nm, isto é, a região mínima para absorção e dispersão por tecidos.

[0276]Um processo de imagem pode ser realizado por administração de uma gente de imagem compreendendo uma ou mais nanopartículas ativa – SERS presentemente reveladas a uma célula, uma amostra tecidual, ou a uma pessoa, tal como um paciente, e então esceando a célula, amostra de tecido, ou paciente utilizando qualquer sistema conhecido na técnica que possa desempenhar imagem

de espectro, incluindo, mas não limitado a microscópios confocais de escaneamento de pontos, sistemas de escaneamento em linha, e sistemas tomográficos de Coerência Óptica. A presença da nanopartícula ativa – SERS presentemente revelada em uma célula, amostra de tecido, ou paciente também pode ser observada por qualquer sistema de imagem que detecta por uma banda de comprimento de onda único, bem como qualquer sistema de imagem de fluorescência que inclui uma fonte de luz de excitação e detecção de imagem filtrada. Outros sistemas de imagens adequados para uso com as nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas são descritas em Tuchin, V.V., Handbook of optical biomedical diagnostics, Bellingham, Wash, EUA: SPIE Press, 2002, que é aqui incluso por referência em sua totalidade. Outros métodos de imagens incluindo métodos de domínio de tempo, tal como espectroscopia de dispersão de luz dinâmica e tomografia, imagem tempo de voo, espectroscopia dispersão quase elástica, espectroscopia de correlação de fóton, espectroscopia Doppler, e espectroscopia de difusão de onda são adequadas para uso com a matéria presentemente revelada. Todas essas técnicas permitem a diferenciação entre fótons e onde elas têm sido baseadas em seus tempos de assinatura. Porque as nanopartículas ativas – SERS podem ter diferentes tempos de assinaturas que as substâncias fluorescentes e semelhantes, elas podem ser discriminadas contra tecidos e outros marcadores com esses métodos. Parâmetros de instrumentos úteis também incluem uma fonte de luz modulada e detector sensível a tempo. A modulação pode ser pulsada ou contínua.

[0277]O escaneamento da célula, amostra de tecido, ou paciente provê espectro ou imagens de uma região interna da célula, amostra de tecido, ou paciente e pode ser utilizada para detectar ou diagnosticar a presença de uma condição ou um estado de doença. Pela região de uma célula, a amostra de tecido, ou paciente, é significado célula inteira, amostra tissular, ou paciente. Quando o

paciente é um paciente, os agentes de imagem presentemente revelados podem ser utilizados para prover imagens de órgãos internos do paciente, incluindo vasculatura, coração, fígado, e baço, e na imagem da região gastrointestinal ou outras cavidades corporais, ou em outros caminhos como será facilmente aparente para àqueles versados na técnica tal como na caracterização tissular, imagens de sangue misturado e semelhantes.

[0278]A matéria presentemente revelada também provê, em algumas modalidades, um método de diagnosticar patologia anormal in vivo, o método incluindo introdução de uma pluralidade de nanopartículas ativas – SERS com alvo em uma molécula envolvida na patologia anormal em um fluído corpóreo em contato com a patologia anormal, em que as nanopartículas ativas – SERS podem se tornar associada com a molécula envolver em patologia anormal, e imagem das nanopartículas ativas – SERS associadas in vivo. O método presentemente revelado é geralmente aplicável a qualquer órgão acessível pelos padrões de nanopartículas ativas –SERS, incluindo o trato gastrointestinal, coração, pulmão, cérvix do fígado, mama e semelhantes.

[0279]Em algumas modalidades, as nanopartículas anativas-SERS presentemente reveladas podem ser introduzidas em um paciente através de um endoscópio, como no caso de uma colonoscopia, ou uma agulha, ou utilizado com uma ponta dispensável, ou através da endocitose, transfeção, microinjeção e semelhantes. Em outras modalidades, padrões de nanopartículas ativa podem ser introduzidas por introdução direta no padrão de imagem por ele mesmo. Em algumas modalidades, fibras ópticas individuais, ou feixe de fibras ópticas, podem ser introduzidas em organismos vivos para imagem. Tais métodos têm sido demonstrados para imagem de nervos, cérebro, microvasos, células, bem como para caracterizar a biodistribuição. Fibras ópticas revestidas de gel são bem conhecidas no sensor da literatura. As nanopartículas ativas – SERS presentemente

reveladas podem ser ligadas não covalentemente, ou as nanopartículas pode difundir em fases líquidas as quais eles estão conectados também são adequadas para uso com a matéria presentemente revelada.

[0280]Em algumas modalidades, a matéria presentemente revelada provê um método para marcar um animal com uma nanopartícula ativa – SERS, o método compreendendo introdução de uma nanopartícula ativa – SERS no animal. As nanopartículas ativas – SERS presentemente reveladas podem ser introduzidas em um animal por qualquer método, incluindo, mas não limitado a, qualquer método de implantação ou intravenosamente. A nanopartícula ativa – SERS pode ser detectada utilizando instrumentação apropriada. Em algumas modalidades, a matéria do paciente presentemente revelada provê um sistema de identificação para animais, incluindo livestock e animais domésticos, em que a nanopartícula ativa – SERS é implicado sob a pele (ou escondido) do animal para permitir a identificação.

EXEMPLOS

[0281]Os seguintes exemplos têm sido incluídos para prover guia de um versado na técnica para praticar modalidades representativas da matéria presentemente revelada. Na luz da presente revelação e o nível geral do versado na técnica, aqueles versados podem apreciar que os seguintes Exemplos são tencionados ser exemplares somente e que numerosasa mudanças, modificações, e alterações podem ser empregadas sem se afastarem do objetivo da matéria presentemente revelada. Os seguintes Exemplos são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

Exemplo 1

Ensaio SERS de Captura Magnética com Marcadores de Referência

[0282]Biomarcadores Nanoplex® foram adquiridos a partir de Oxonica Inc. (Mountain View, Califórnia). As partículas foram partículas de ouro tendo um diâmetro de cerca de 50 nm e marcadas com repórter Raman selecionadas a partir

de trans-1,2-bis(4-piridil)-etileno (BPE) ou 4,4'-dipiridil (DPI) e encapsuladas com vidro como descrito aqui. O encapsulante de vidro foi biotinilado. Partículas magnéticas (aproximadamente um micron em diâmetro) foram compradas de Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, Indiana) e maracados com estreptavidina. Duas soluções de nanopartículas maracadas com BPE e DPI foram misturadas cada com partículas magnéticas revestidas com estreptavidina. Essas duas soluções foram então misturadas juntas em uma proporção de 7:3 e um campo magnético foi aplicado utilizando um sistema do tipo ilustrado na Figura 4, assim formando um concentrado no fundo do tubo de amostra. O concentrado foi então repetidamente rompido e reformado, e o sinal Raman foi medido para cada configuração do concentrado, onde o sinal Raman a partir do repórter BPE e DPI foi medido simultaneamente. Os espectros Raman gravados no pico a 1590 cm^{-1} correspondem ao repórter Raman BPE e o pico a 1180 cm^{-1} correspondem ao repórter DPI.

[0283]O sinal do repórter BPE sozinho provê uma medida da repetibilidade do sinal quando nenhuma referência é utilizada. Utilizando o repórter DPI como uma referência, a proporção do repórter BPE e DPI é calculada. Figura 3 mostra uma comparação do sinal não referenciado e referenciado. O coeficiente de variação por cinco ciclos de concentração e disrupção é 8,4% para sinal não referenciado e 3,8% par sinal referenciado. Assim, a redução na variação de sinal é reduzida por 55% quando utilizando um segundo repórter como uma referência.

Exemplo 2

Ensaio SERS de Captura Magnética com Reagente de Lise

[0284]Nanopartículas Oxonica Nanoplex® com grupos tiol na superfície foram marcadas com anticorpos policlonais de cabra anti-humano cTnI (BiosPacifc, Emeryville, CA) utilizando Sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) cicloeano-1-carboxilato). Separadamente, partículas magnéticas (esferas magnéticas carboxiterminadas Bioclone 1- μm BcMag®) foram marcadas com

anticorpos monoclonais anti-humano cTnI (BiosPacific, Emeryville, Califórnia) utilizando cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). Uma mistura principal de nanopartículas marcadas com anticorpo e partículas magnéticas foi criada, que resultou em cada ensaio de 162 μL contendo $5,1 \times 10^8$ nanopartículas e 15 μg de partículas magnéticas. Uma solução de reagente lisante também foi preparada, contendo 10 mM de HEPES, 50 mM de β -glicerofosfato, 70 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 1% de Triton 100X, e Coquetel de Inibitor de Protease P2714 1X da Sigman.

[0285] Para testar o impacto do reagente de lise no desempenho do ensaio, amostras foram preparadas consistindo de tampão diluído em PBS, plasma ou sangue. As amostras foram divididas em quatro grupos. No primeiro grupo, reagente de lise foi adicionado a cada um dos três meios (tampão, plasma e sangue), e após 10 minutos, as amostras foram adsorvidas com Troponina I cardíaca, previamente dissolvidas em tampão, para uma concentração fina de 100 mg/mL. No segundo grupo de amostras, reagente lisante foi novamente adicionado, mas, ao invés, tampão sem Troponina I foi adicionado para, 100 μL da amostra foi adicionada para 62 μL da solução de Mistura Principal e incubada por 30 minutos (rotação lenta, temperatura ambiente). A concentração final do fluído biológico foi 21% nas amostras de plasma e sangue. As reações foram paradas por formar um concentrado magnético, e o sinal SERS a partir do concentrado em cada tubo foi lido em um instrumento adaptado.

[0286] Figura 6 mostra os níveis de sinal SERS com e sem reagente de lise para 0 e 100 ng/mL de Troponina I cardíaca. Barras de erros no gráfico indicam $\pm$ erro padrão a partir das três replicatas.

Exemplo 3

Formação do Concentrado por Rotação do Tubo de Amostra

[0287]Partículas magnéticas a partir de Laboratórios Bangs (aproximadamente um micron em diâmetro) dispersas em água foram utilizadas para formar um concentrado denso como segue. Um magneto (por exemplo, uma haste) é montado abaixo de um tubo de amostra, onde o centro do magneto é posicionado no centro em respeito ao eixo do tubo de amostra (ver Figura 5). Após uns poucos segundos, o magneto induziu formação de um concentrado no fundo do tubo de amostra. O tubo de amostra foi rotado ao redor de seu eixo central, assim modulando o campo magnético experimentado pelo concentrado em tal forma que o concentrado se torna denso. O esquema na Figura 5 mostra o processo de formação do concentrado por rotação do tubo da amostra acima de um magneto montado fora do centro.

[0288]Após o magneto ter sido colocado abaixo do tubo de amostra, partículas são capturadas pelo magneto em uma maneira de segundos. O concentrado formado pode ser irregular na forma e pode parecer a seção cruzada de um toro. Após girar o tubo de amostra ao redor de seu próprio eixo o concentrado se torna mais denso. Após algumas rotações a mais, a forma do concentrado não muda mais. O concentrado resultante é mais denso e menor que o concentrado formado sem a rotação do tubo de amostra.

Exemplo 4

Espectro de Referência Raman Aumentado

[0289]Um experimento multiplexante foi feito onde cinco diferentes nanopartículas ativas – SERS, isto é, nanopartículas ativas – SERS tendo diferentes corantes Raman, também referidos aqui como “marcadores”, foram misturados juntos em várias proporções. Uma técnica de ligação a biotina-avidina foi utilizada para ligar nanopartículas às esferas magnéticas (aproximadamente 1 micron em diâmetro). Concentrados foram formados como descrito no Exemplo 3 imediatamente acima. Espectros das misturas concentradas foram analisados

utilizando dois grupos de espectros de referência: as nanopartículas em solução e as nanopartículas em concentrados de esferas magnéticas.

[0290]Curvas de calibração foram construídas utilizando os pesos adequados para concentrados contendo cada nanopartículas ativa – SERS sozinha. Concentrações de nanopartículas ativas – SERS foram então estimadas para cada mistura. Concentrações de nanopartículas ativas – SERS variaram de 1,25E7 partículas/mL a 2,5E8 partículas/mL. Mesmo com o espectro de referência em solução e em concentrados pode ser difícil distinguir visualmente (ver Figura 12), as diferenças podem ser importantes para estimação acurada de baixas concentrações em um sistema multiplexado. A acurácia e precisão para concentrações estimadas de zero e baixas concentrações foram melhoradas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela I										
	Erro Médio					Desvio Padrão de Erros				
Marcador	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Referência de Soluções										
0	1.50	0.23	0.28	0.32	0.05	1.46	2.67	0.39	0.56	0.32
1.25E+07	0.93	0.10	0.14	0.48	0.07	1.41	0.50	0.43	0.72	0.37
2.50E+08	0.53	2.81	-1.49	6.07	-1.16	4.92	6.40	5.63	6.86	5.67
Referência de Concentrados										
0	0.24	0.30	0.17	-0.22	0.03	0.22	2.60	0.14	0.47	0.22
1.25E+07	0.07	0.16	0.06	0.14	0.02	0.29	0.38	0.28	0.54	0.36
2.50E+08	-1.57	2.99	-1.63	5.01	-1.20	4.29	6.37	5.61	6.47	5.55

[0291]Concentrações estimadas para marcador 1 também são plotadas na Figura 13. Embora a descrição acima desta referência técnica é baseada em sinais gerados por nanopartículas ativas – SERS para partículas magnéticas e colocadas em um concentrado para análise de Raman, o conceito é aplicável para qualquer situação onde marcadores são configurados em uma configuração particular durante

a detecção que difere a partir de uma configuração anterior que pode ser utilizada como uma referência.

[0292]Como mostrado na Figura 11, um sinal aleatório pode ser erroneamente determinado para colocar variáveis devido a alinhamento falso de características. Ruído aleatório normalmente distribuído com um desvio padrão de 10.000 foi colocado utilizando rotina mínimos quadrados. Entrada de sinal 1100 é mostrado na Figura 11A. O espectro 1110 ajustado reflete erros devido ao ruído aleatório na entrada do sinal 1100. Neste caso particular, marcador 4 foi determinado um peso de 0,5 para balancear pesos negativos de outros marcadores. Um espectro ajustado 1120 para marcador 4 é mostrado na Figura 11B.

[0293]Espectros de referências representativos são mostrados na Figura 12. Referência a Figura 12A, espectros 1200 representam um espectro SERS do marcador 1 em solução, embora espectro 1210 representa um espectro SERS do marcador 5 na solução. Referência agora a Figura 12B, espectro 1220 representa um espectro SERS do marcador 1 em um concentrado, embora o espectro 1230 representa um espectro SERS do marcador 5 em um concentrado.

[0294]Embora a precedente matéria tem sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para propósitos de clarificar o entendimento, será entendido pelos versados na técnica que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do objetivo das reivindicações em apêndice e equivalentes das mesmas.

[0295]Todas as publicações, pedidos de patentes, e outras referências são aqui incorporadas por referência para a mesma extensão como se cada publicação individual, pedido de patente, patente, e outras referências fossem especificamente e individualmente indicadas para serem incorporadas por referência. Será entendido que, embora um número de pedidos de patente, patentes, e outras referências são

referidas aqui, tal referência não constitui uma admissão que qualquer desses documentos fazem parte do conhecimento geral comum na técnica.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos em uma amostra biológica, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecer uma amostra biológica suspeita de conter um ou mais analitos;

(b) dispor a amostra biológica em um recipiente de ensaio, em que o recipiente de ensaio:

(i) tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associadas às mesmas pelo menos um membro de ligação específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos e pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS ou um reagente compreendendo uma primeira alíquota de uma ou mais moléculas repórter capazes de produzir um sinal detectável tendo associadas às mesmas pelo menos um membro de ligação específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos; e uma ou mais partículas de captura magnética, em que uma ou mais partículas de captura magnética têm associada à elas pelo menos um membro de ligação específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos, em que ou o membro de ligação possui pelo menos uma marcação de referência capaz de gerar um sinal detectável ou a pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável ou ambos, em que o membro ligador associado com as nanopartículas ativas – SERS pode ser o mesmo ou diferente que o membro ligador associado com as partículas de captura magnéticas; ou

(ii) é adaptado para ter disposto nele o reagente da etapa (b)(i), em que o reagente da etapa (b)(i) está disposto no recipiente do ensaio antes de, concomitante com, ou subsequente a disposição da amostra no mesmo;

(c) incubar a amostra biológica por um período de tempo para formar um complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa se

um ou mais analitos estão presentes na amostra biológica;

(d) exposição do complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa a um campo magnético para induzir o complexo para migrar para uma área localizada do recipiente de ensaio;

(e) iluminar a área localizada do recipiente de ensaio com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas e quando ambos os membros de ligação possuem a pelo menos uma marcação de referência e a molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável, induzindo assim a nanopartícula ativa – SERS para produzir um primeiro sinal detectável e a marcação de referência para produzir um segundo sinal detectável; e

(f) e quando ambos os membros de ligação possuem pelo menos uma marcação de referência e a molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável, comparando o primeiro sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS a um segundo sinal detectável da marcação de referência para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a marcação de referência compreende uma segunda nanopartícula ativa – SERS tendo uma molécula repórter diferente que a uma ou mais nanopartículas ativas – SERS que formam um complexo com um ou mais analitos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente de ensaio tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associadas às mesmas pelo menos um membro de ligação específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos e pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS, em que a molécula repórter ativa – SERS é capaz de gerar um sinal detectável; e

em que a exposição do complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa para um campo magnético ainda compreende:

(i) posicionar um magneto em uma posição fora do centro relativo a um eixo do recipiente de ensaio, em que o magneto é capaz de induzir o complexo para migrar para uma área localizada do recipiente de ensaio; e

(ii) rotacionar o recipiente de ensaio sobre seu eixo para formar um concentrado compreendendo o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa em uma área localizada do recipiente de ensaio;

em que ilumina a área localizada do recipiente de ensaio com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas induz a nanopartícula ativa – SERS a produzir um sinal detectável para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente de ensaio tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associadas às mesmas pelo menos um membro de ligação específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos e em que pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável,

em que o método ainda compreende dispor um ou mais reagentes de lise em uma quantidade efetiva para lisar os conteúdos celulares da amostra em um recipiente de ensaio antes de, concomitante com, ou subsequente a disposição da amostra no mesmo;

em que a iluminação da área localizada do recipiente de ensaio com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas induz a nanopartícula ativa – SERS a produzir um sinal detectável para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o reagente de lise compreende um ou mais reagentes selecionados a partir do grupo consistindo em tampão (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico),

cloreto de sódio, ácido etilenodiaminotetraacético, β -glicerofosfato, Triton, inibidores de proteases, e combinações dos mesmos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente de ensaio tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma primeira alíquota de uma ou mais moléculas repórter capazes de produzir um sinal detectável tendo associada às mesmas pelo menos um membro ligador específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos, o método compreendendo ainda dispor uma segunda alíquota de uma ou mais moléculas repórter capazes de produzir um sinal detectável associado ao mesmo pelo menos um membro ligador específico tendo uma afinidade para o membro ligador específico da primeira alíquota de moléculas repórter no recipiente de ensaio antes de, concomitante com, ou subsequente para disposição da amostra e/ou a primeira alíquota de uma ou mais moléculas repórter no mesmo, em que a uma ou mais moléculas repórter da segunda alíquota de moléculas repórter são as mesmas como uma ou mais moléculas repórter da primeira alíquota de moléculas repórter.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a molécula repórter compreende uma molécula repórter ativa – SERS associada com uma nanopartícula capaz de produzir um sinal SERS.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o membro ligador específico da segunda alíquota das moléculas repórter não reconhe o membro ligador específico de uma ou mais partículas de captura magnética.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o analito é um polinucleotídeo.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente de ensaio tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associadas às

mesmas pelo menos um membro ligador específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos, em que pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável; e

em que a iluminação da área localizada do recipiente de ensaio com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas induz a nanopartícula ativa – SERS para produzir um sinal detectável, em que o sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS compreende o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa é comparado a um ou mais espectros SERS de referência de um ou mais analitos de interesse, em que o espectro SERS de referência de um ou mais analitos de interesse é obtido a partir de uma composição conhecida de um ou mais analitos em um concentrado magnético, para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a presença ou quantidade de um ou mais analitos de interesse na amostra biológica é determinada por um método de análise multivariada.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método de análise multivariada é um método de ajuste de mínimos quadrados.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente de ensaio tem disponível no mesmo um reagente compreendendo uma ou mais nanopartículas ativas – SERS tendo associadas às mesmas pelo menos um membro ligador específico tendo uma afinidade para um ou mais analitos e o pelo menos uma molécula repórter ativa – SERS é capaz de produzir um sinal detectável;

em que a iluminação da área localizada do recipiente de ensaio com radiação incidente em um ou mais comprimentos de ondas induz a nanopartícula ativa – SERS para produzir um sinal detectável, em que o método compreende

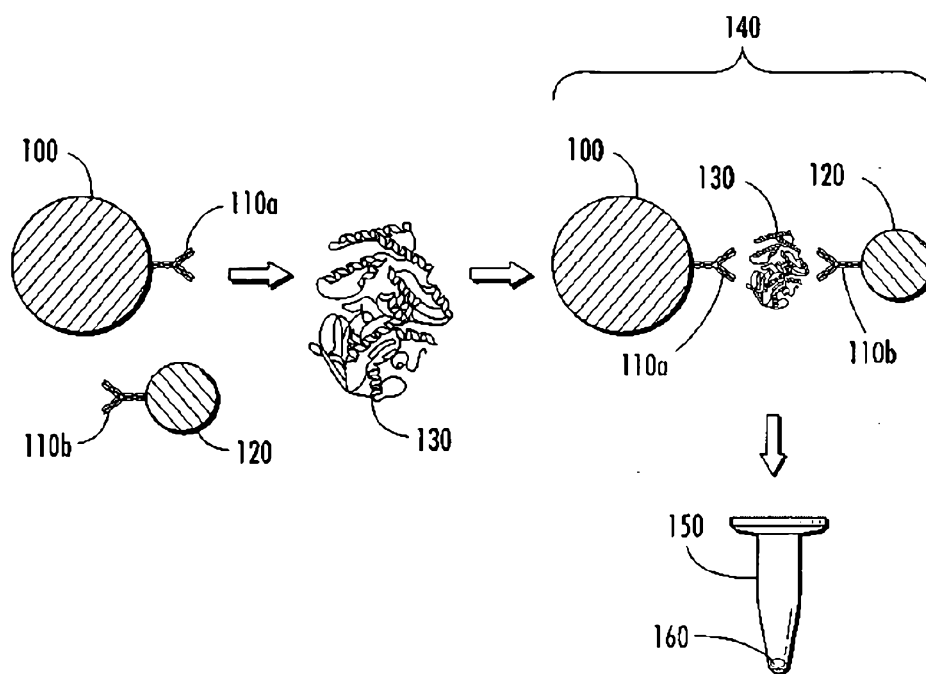
adicionalmente:

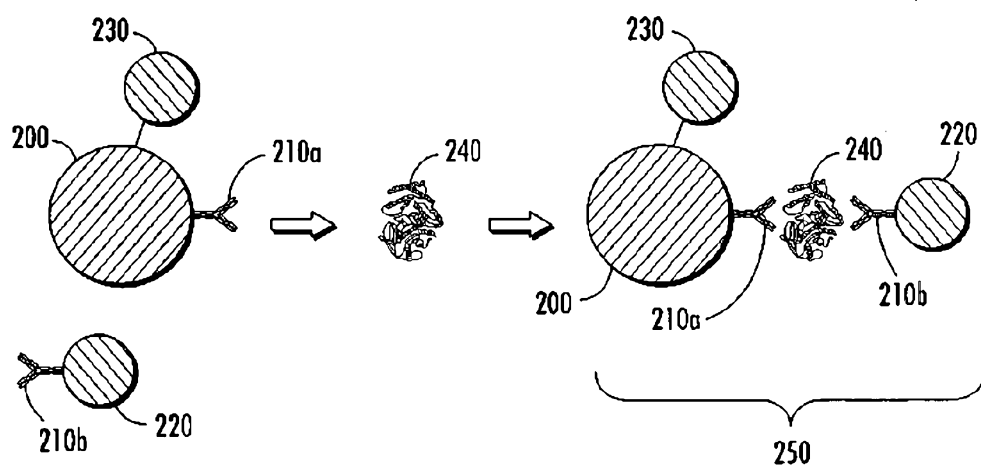
(i) comparar o sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS compreendendo o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa a um ou mais espectros SERS de referência de um ou mais analitos de interesse ao longo da primeira variação espectral para prover uma primeira estimação da presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica, em que o primeiro estima-se reportar um primeiro valor relacionado a um teste de ajuste entre o sinal detectável da nanopartícula ativa - SERS compreendendo o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa e um ou mais espectros SERS de referência de um ou mais analitos de interesse ao longo da primeira variação espectral;

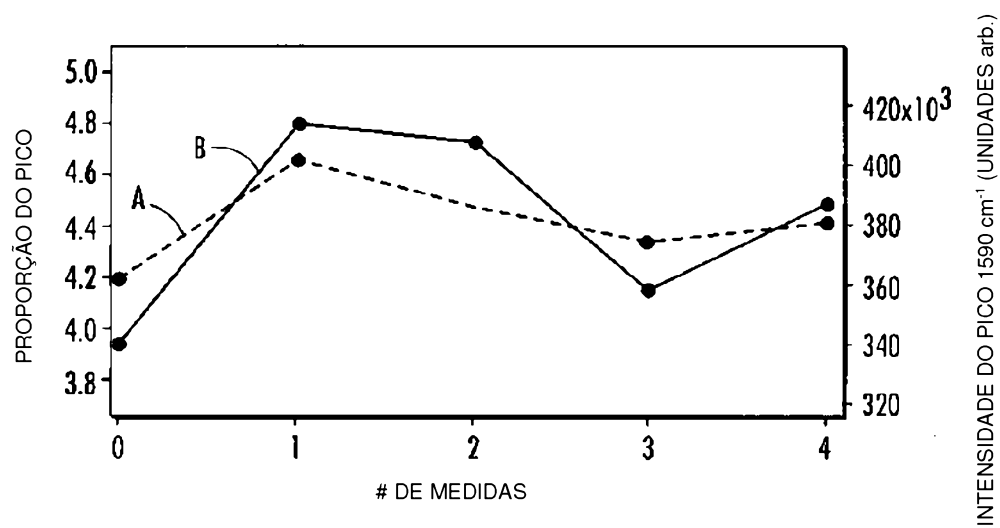
(ii) selecionar uma segunda variação espectral ou remover um ou mais espectros SERS de referência de um ou mais analitos de interesse, ou uma combinação dos mesmos, e repetir a comparação da etapa (a) para prover uma segunda estimação da presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica, em que o segundo estimado relata um segundo valor relacionado a um teste de ajuste entre o sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS compreendendo o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa e um ou mais espectros SERS de referência; e

(iii) repetir a etapa (b), como necessário, para obter um teste de ajuste entre o sinal detectável da nanopartícula ativa – SERS compreendendo o complexo partícula de captura magnética – analito – SERS – nanopartícula ativa e um ou mais espectros SERS de referência que caem dentro de uma variação aceitável, para detectar a presença ou quantidade de um ou mais analitos na amostra biológica.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o magneto é selecionado a partir do grupo consistindo em um magneto permanente e um eletromagneto.

**FIG. 1**

**FIG. 2**

**FIG. 3**

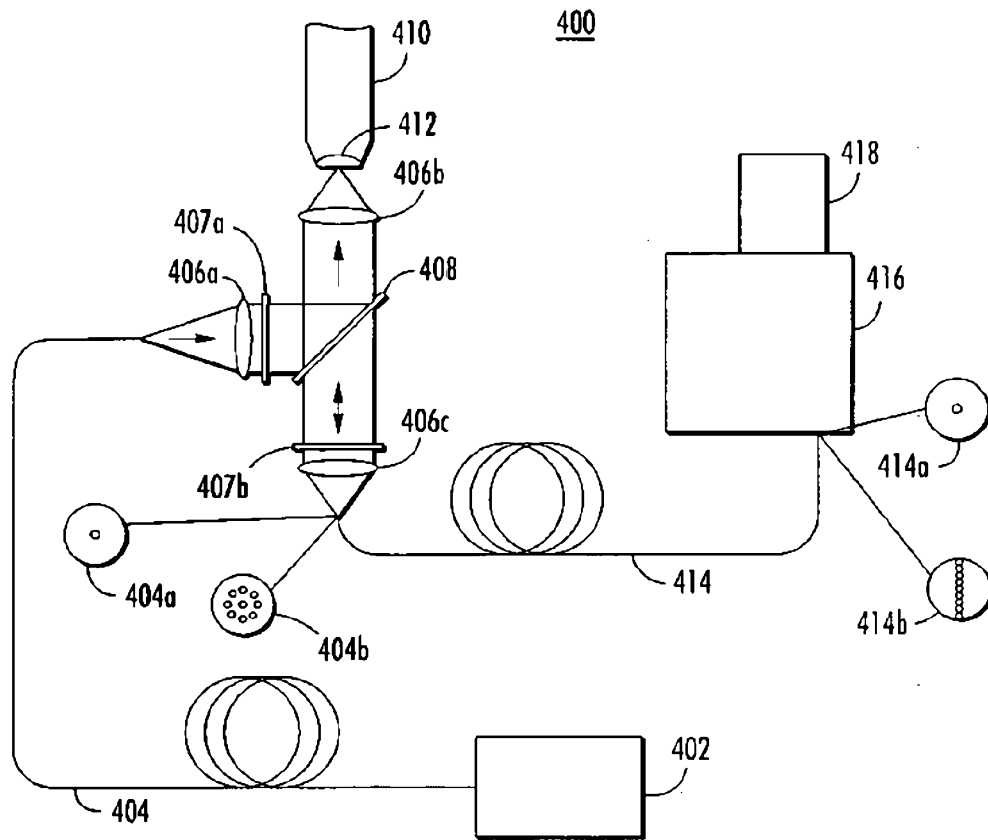
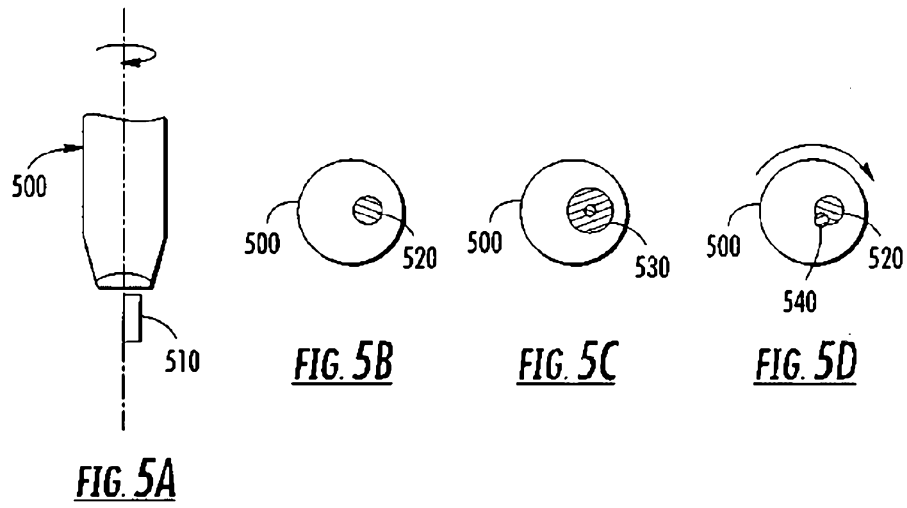
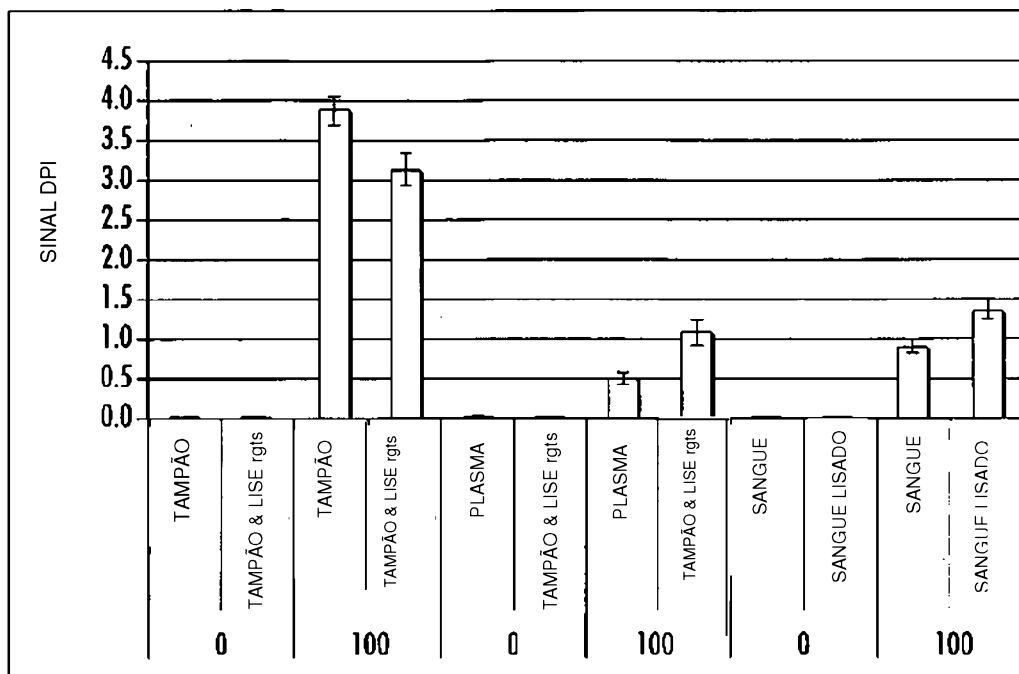
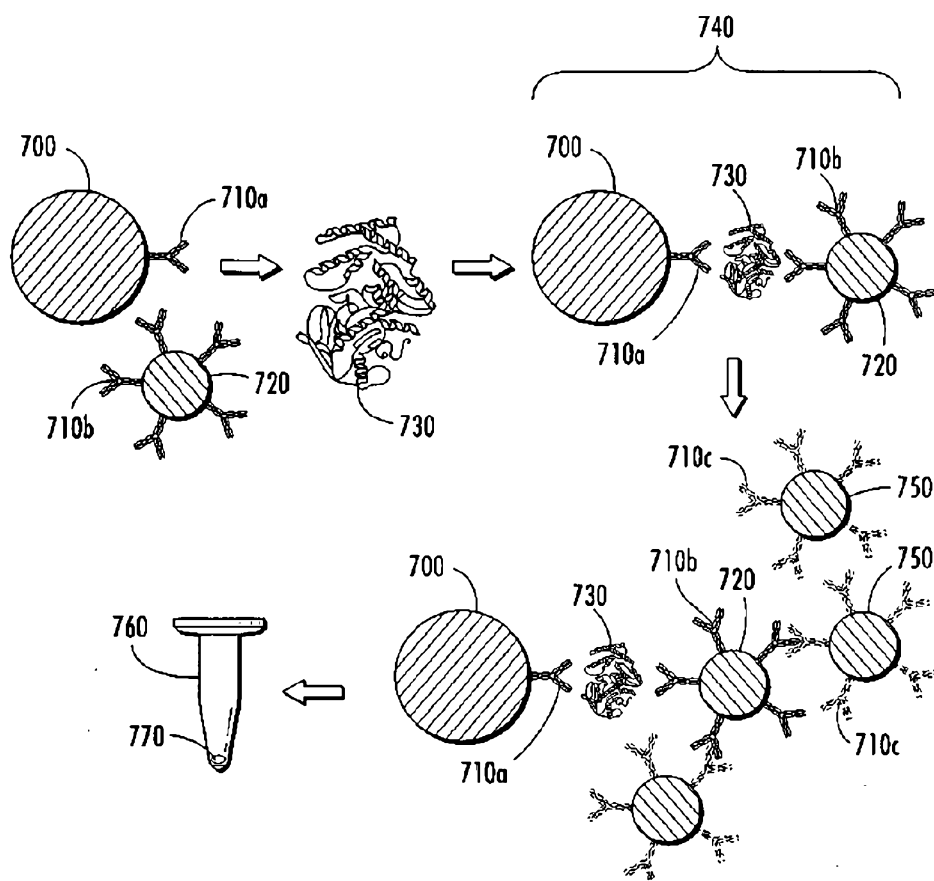
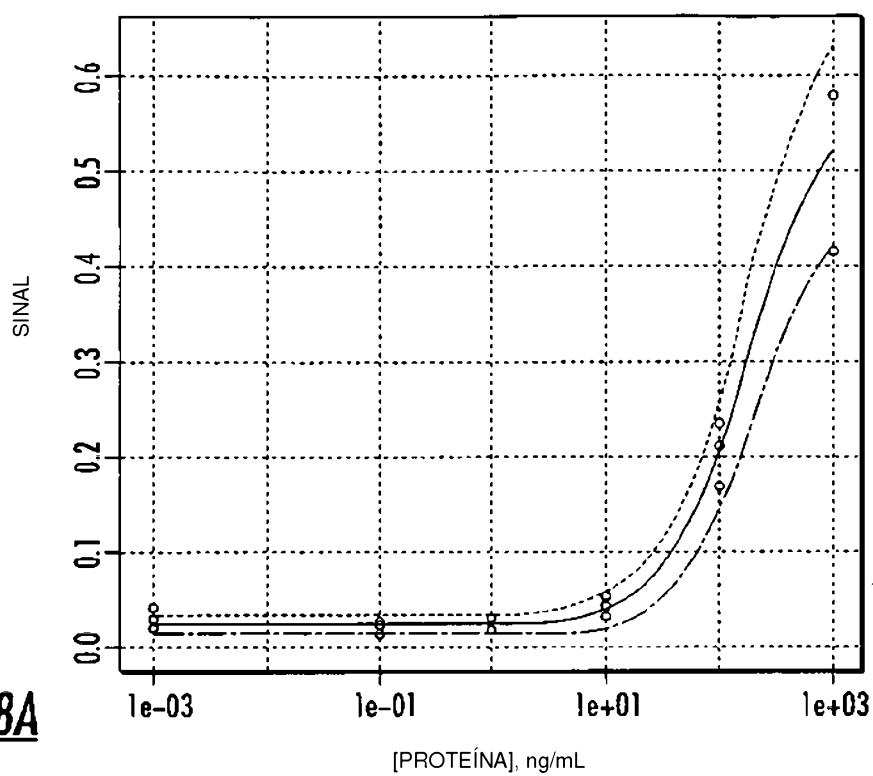
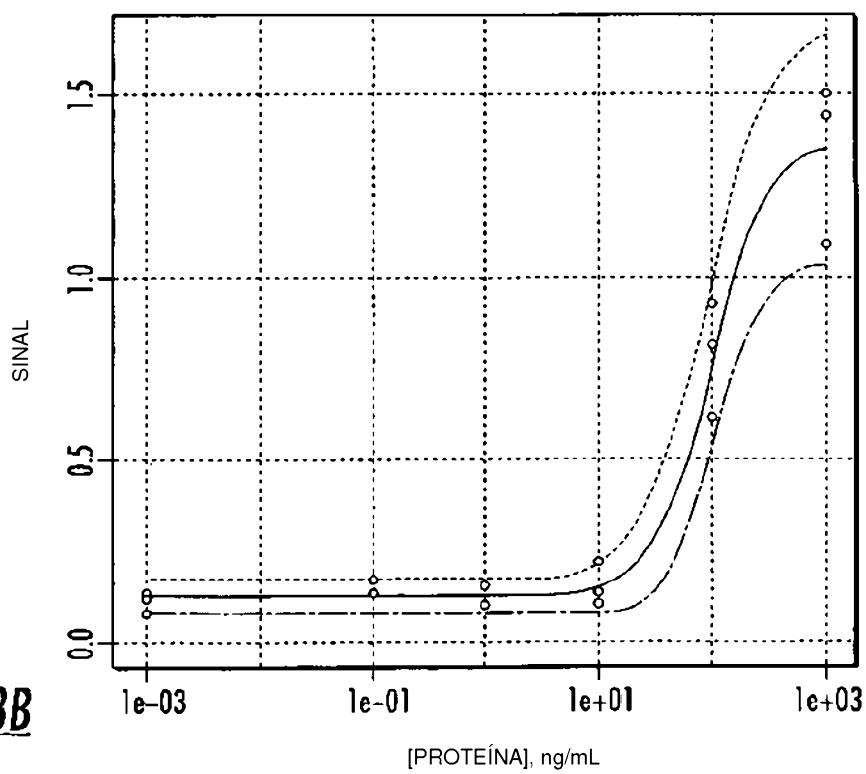


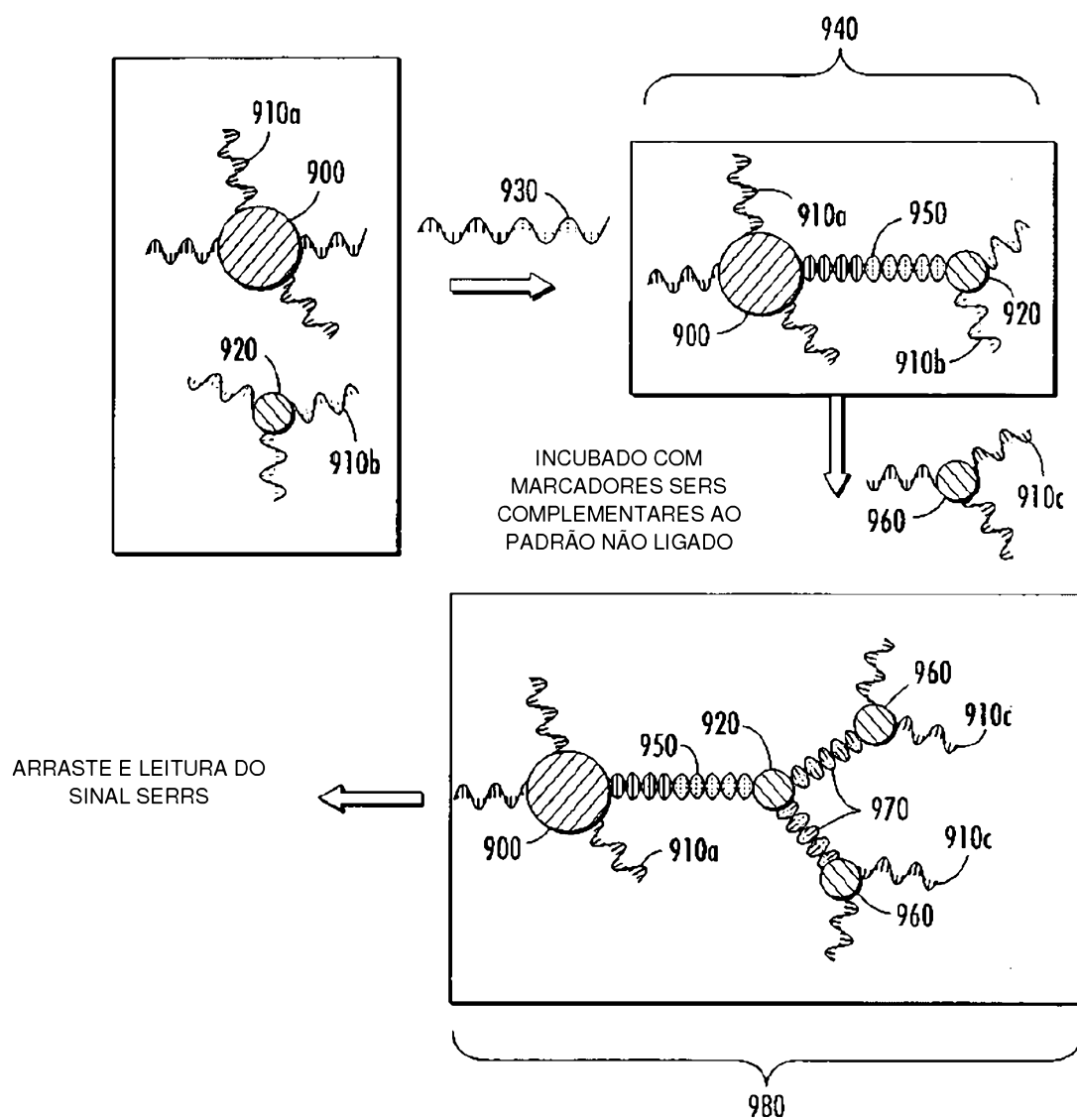
FIG. 4

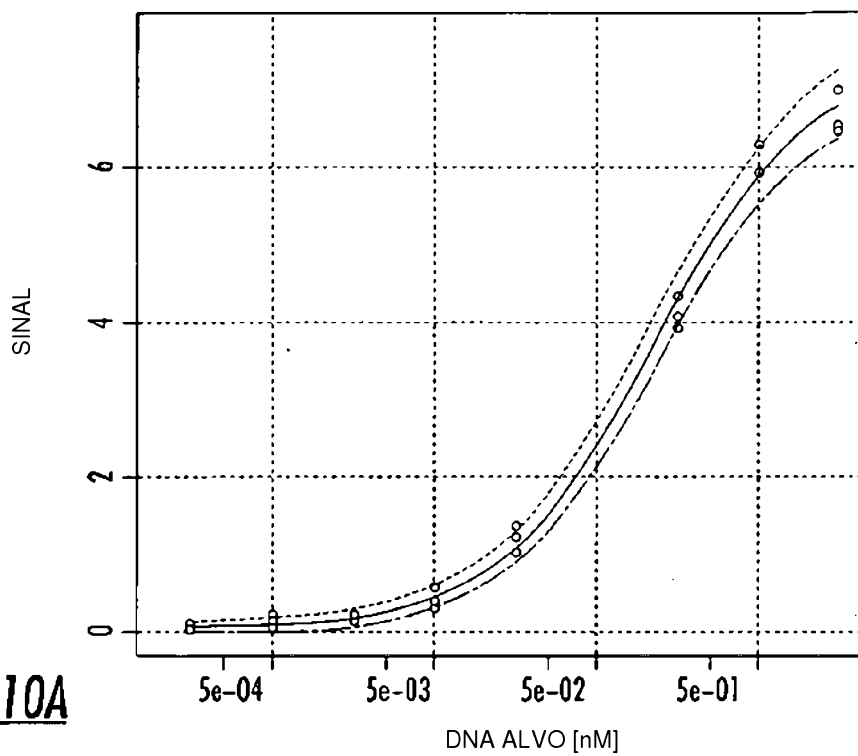
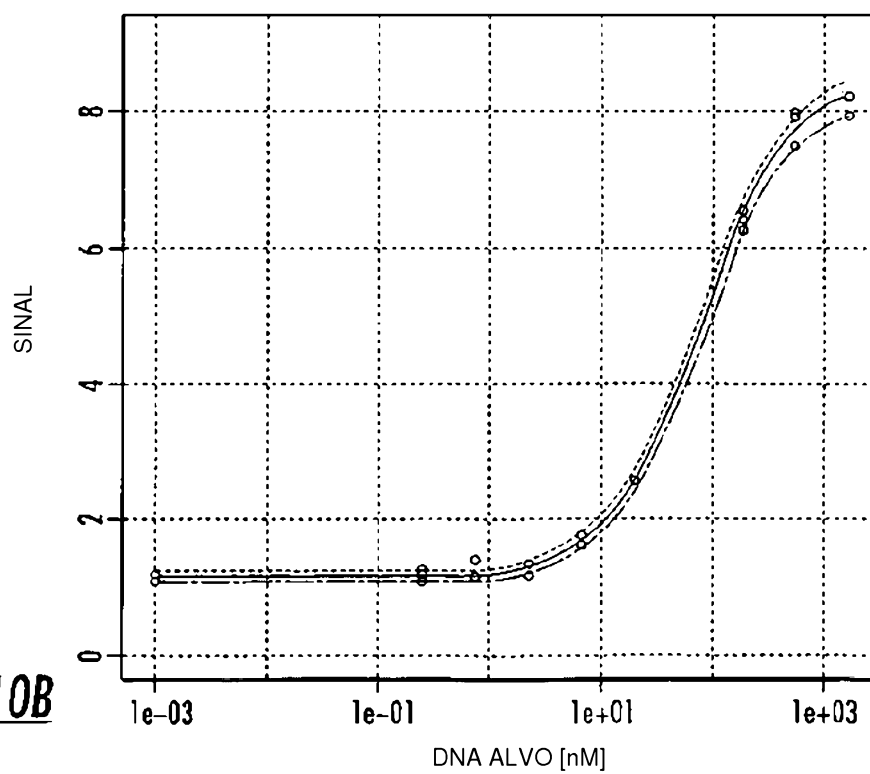


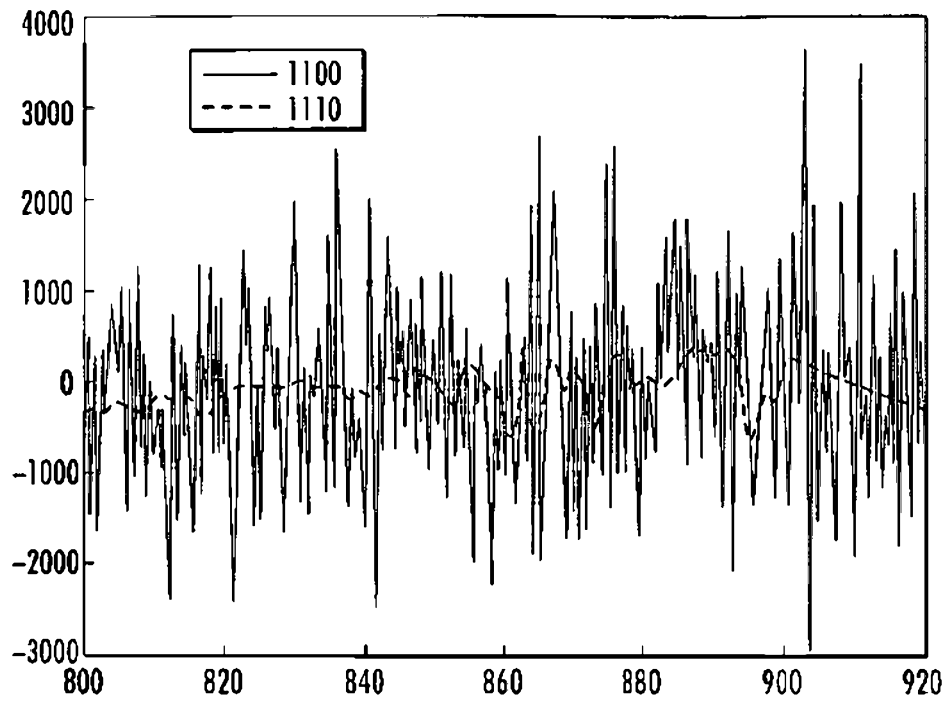
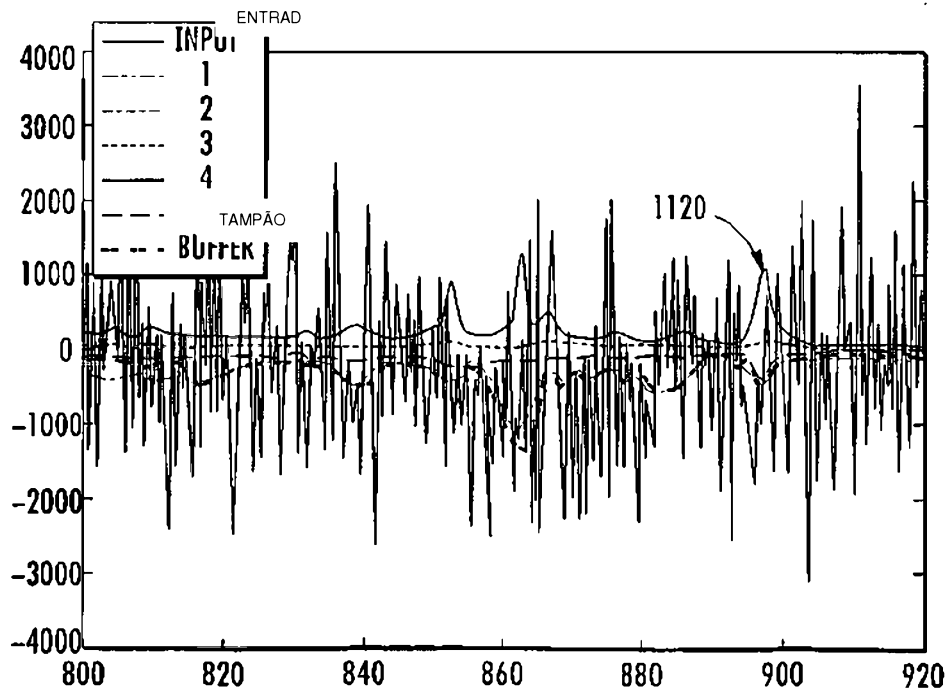
**FIG. 6**

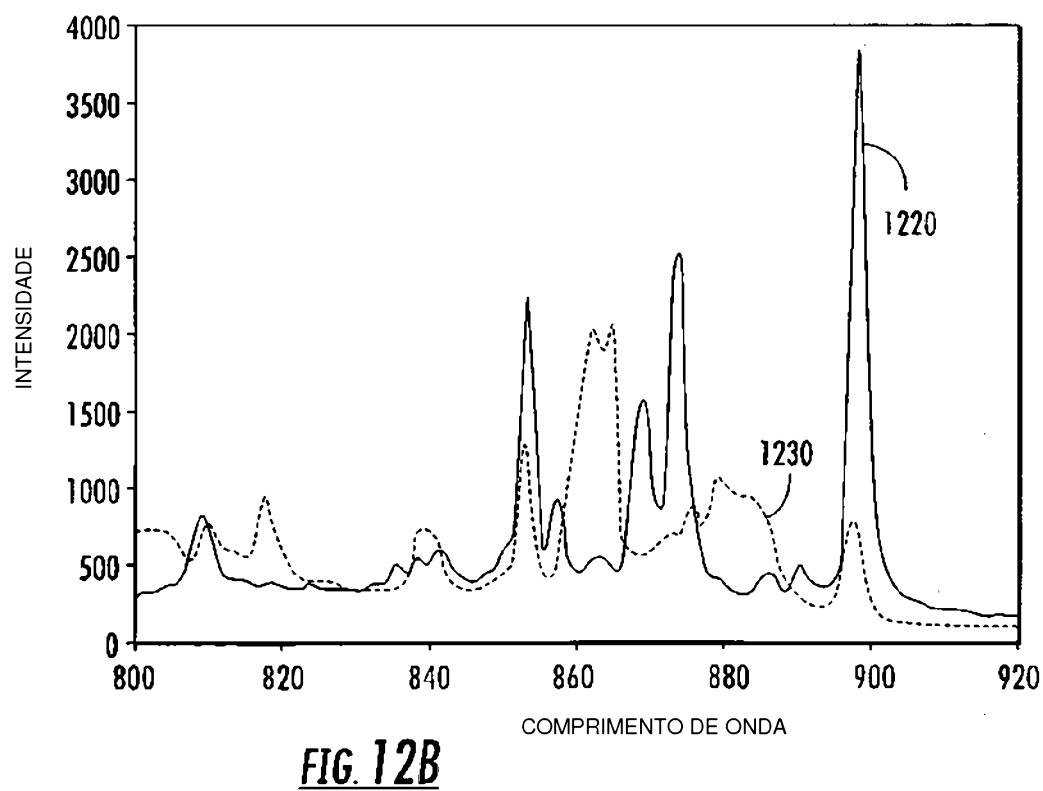
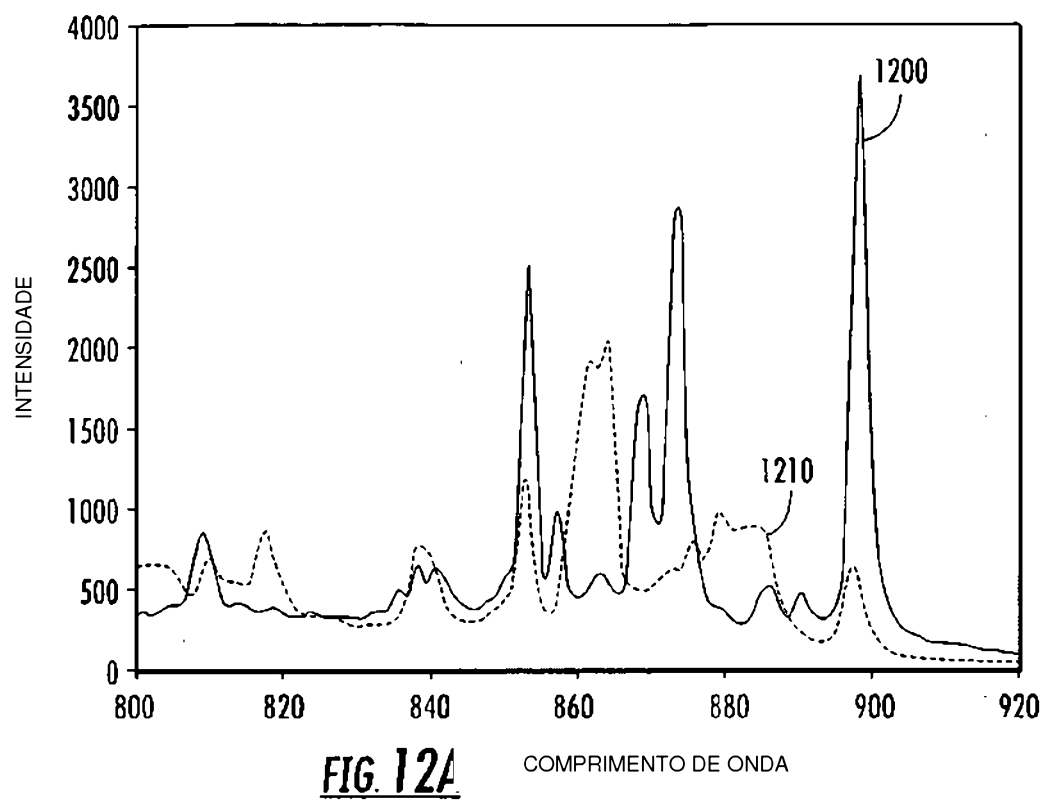
**FIG. 7**

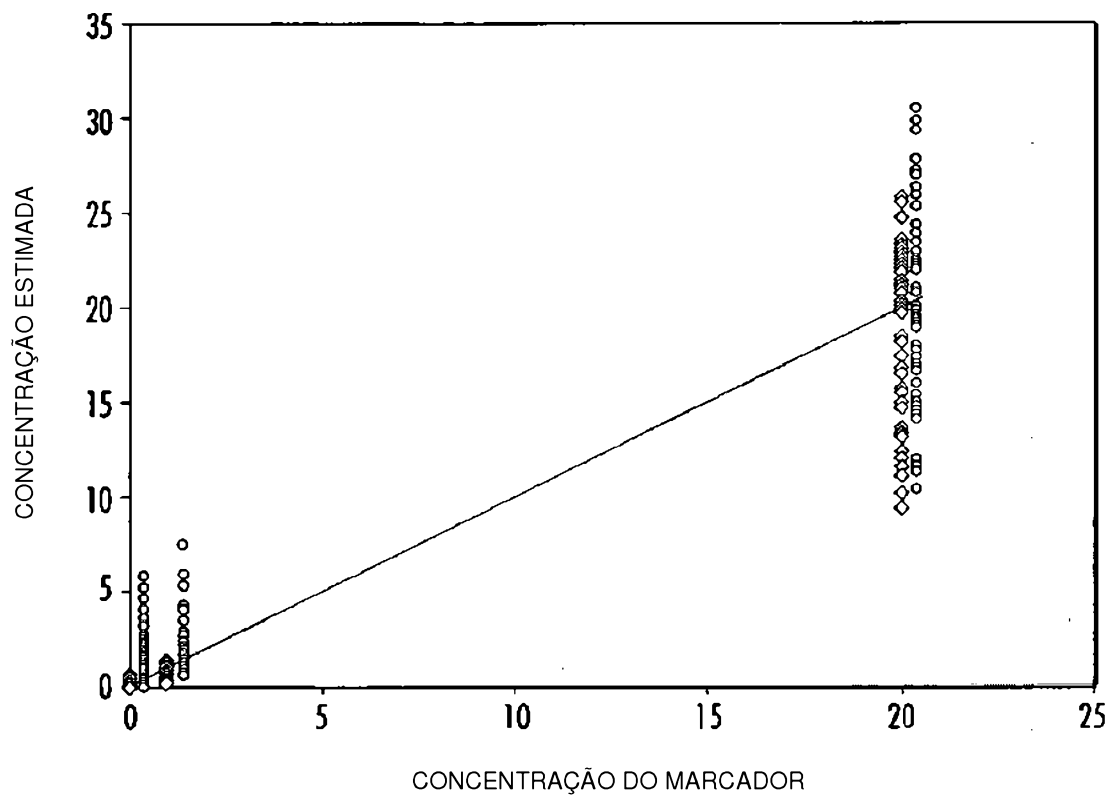
**FIG. 8A****FIG. 8B**

**FIG. 9**

**FIG. 10A****FIG. 10B**

**FIG. 11A****FIG. 11B**



**FIG. 13**

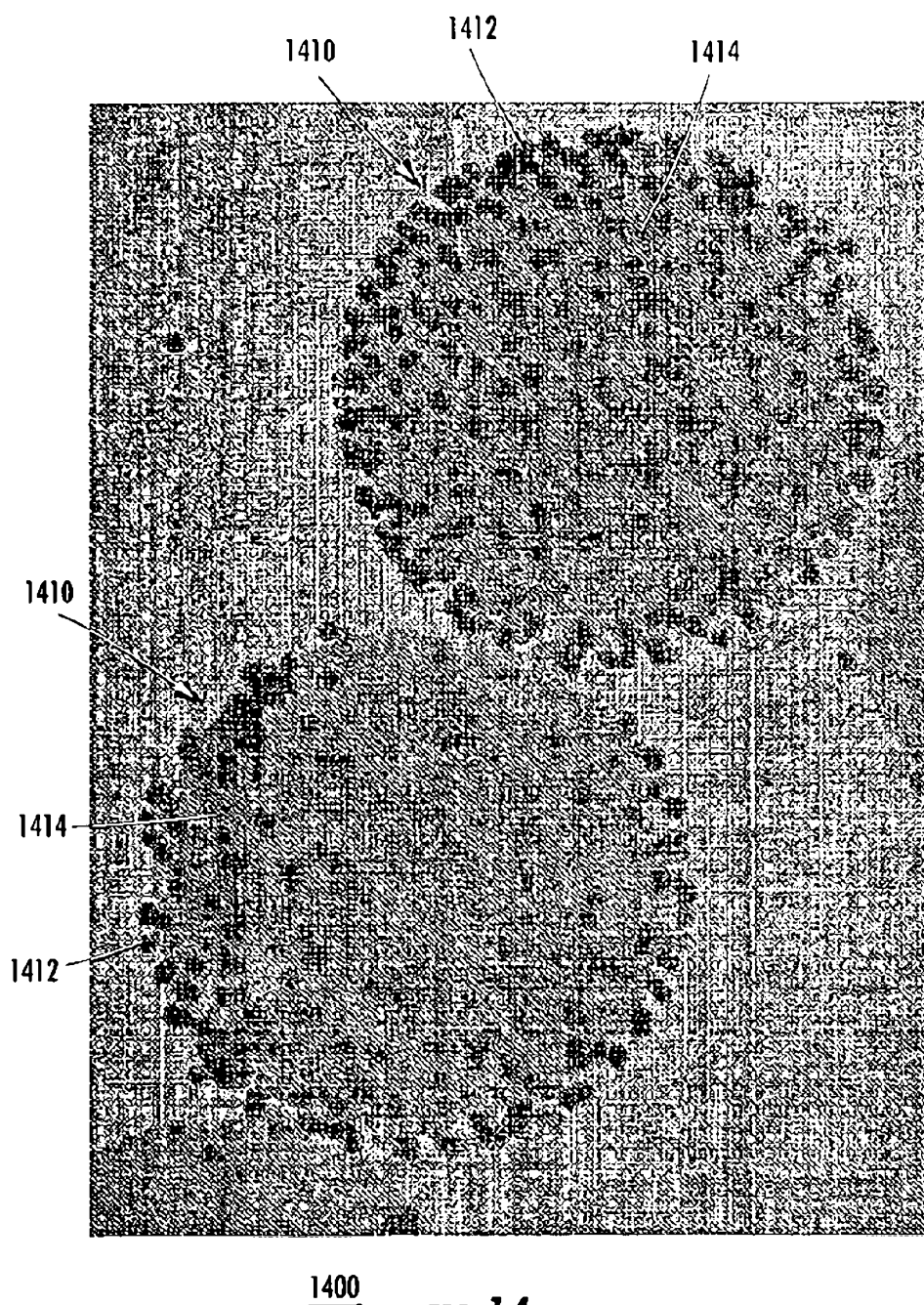


FIG. 14

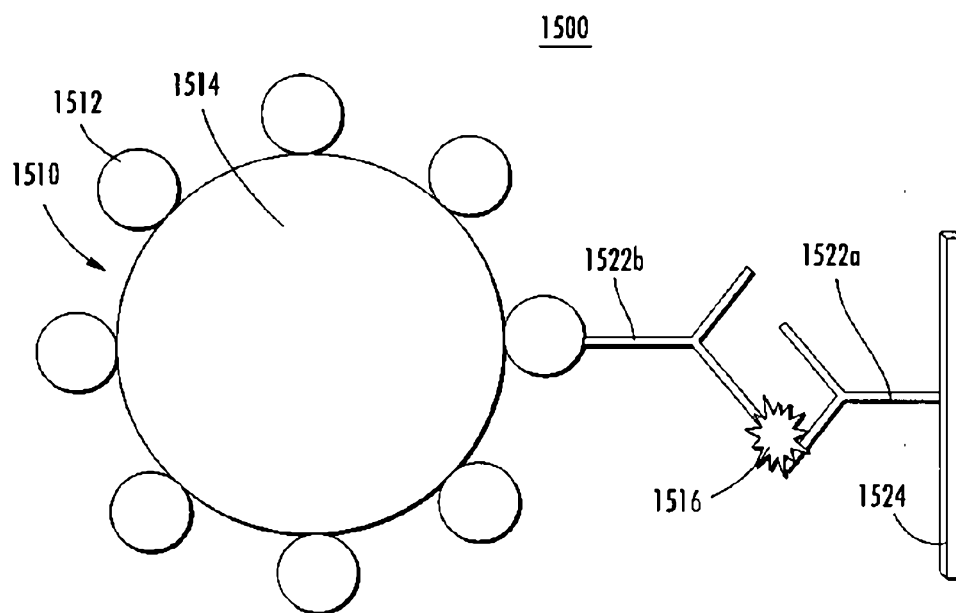


FIG. 15

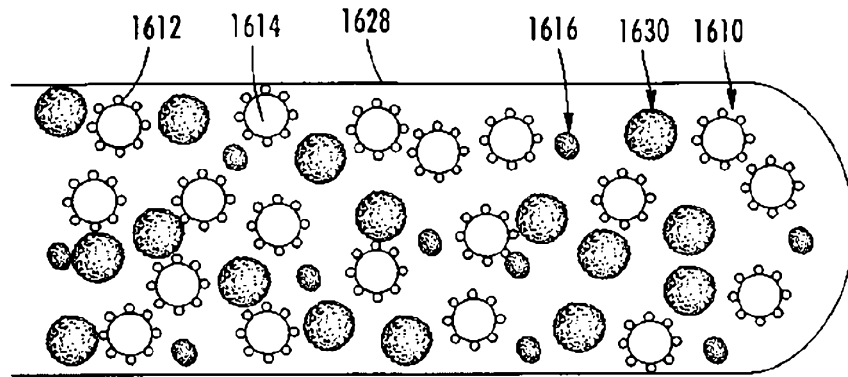


FIG. 16A

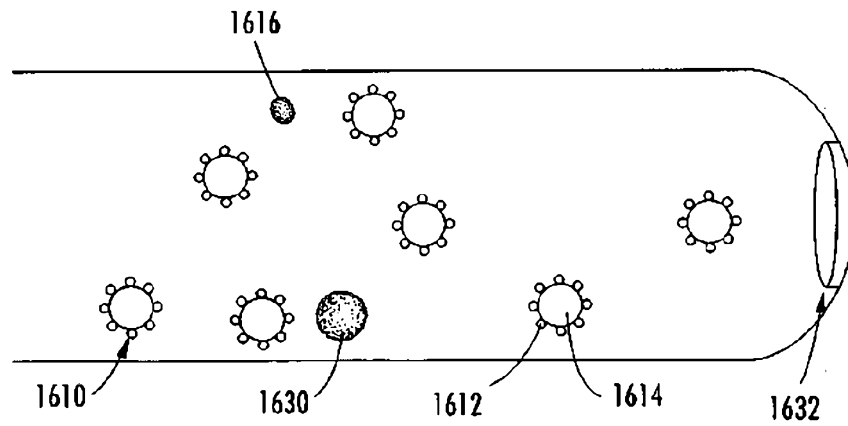


FIG. 16B

1600

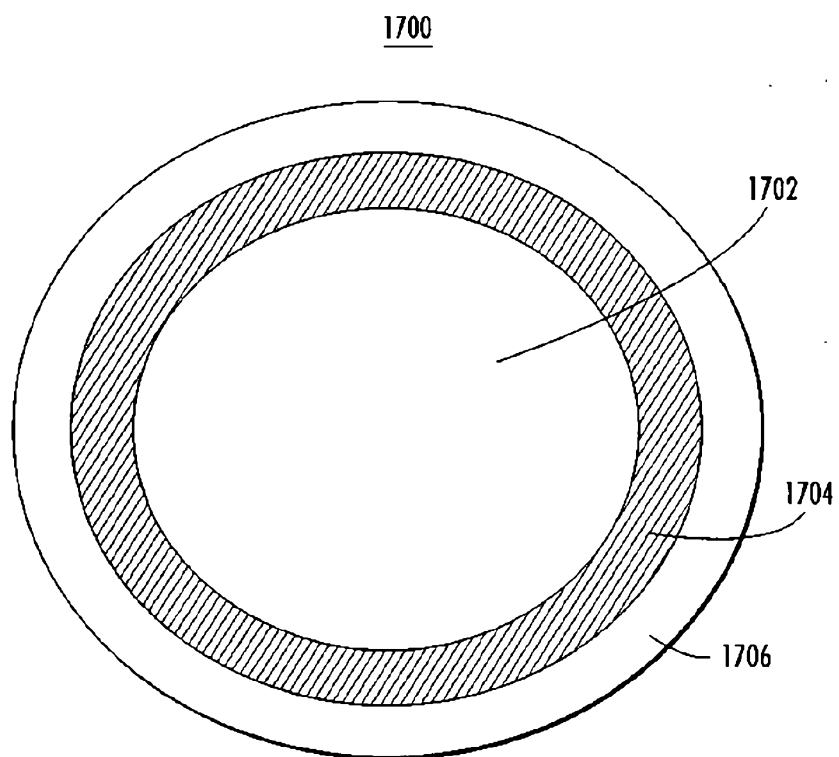
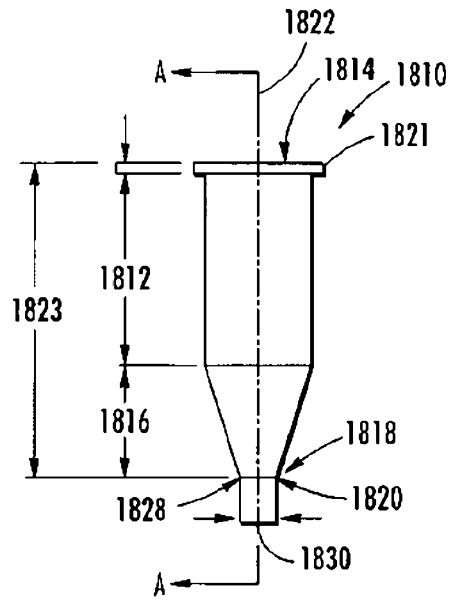
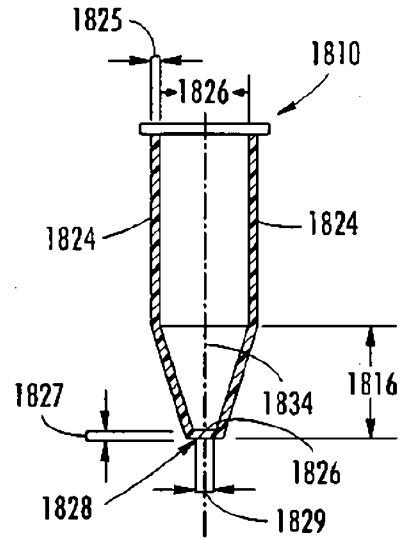
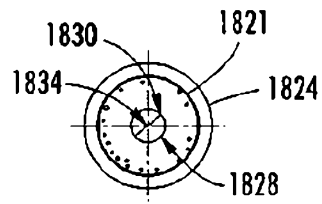
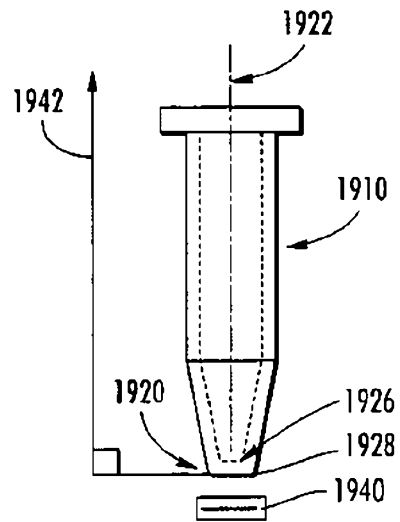
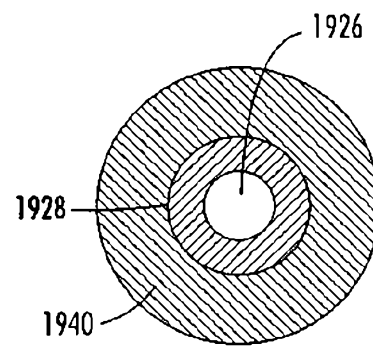
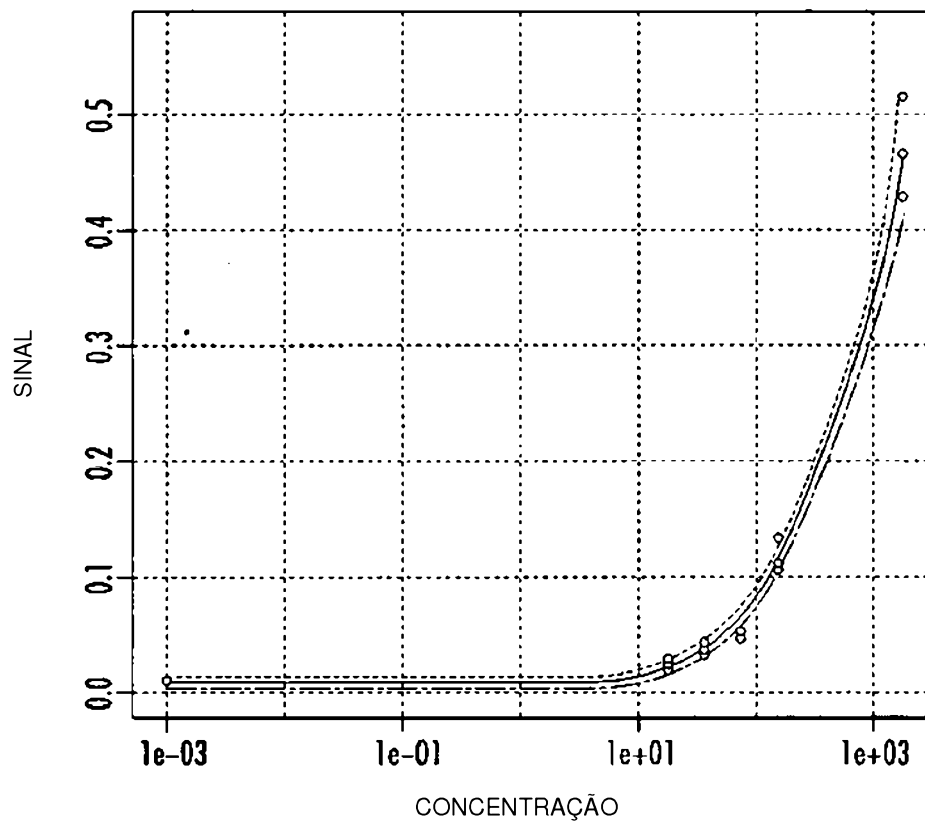


FIG. 17

**FIG. 18A****FIG. 18B****FIG. 18C**

**FIG. 19A****FIG. 19B**

**FIG. 20**