

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 595**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/25** (2006.01)

**G01N 21/552** (2014.01)

**G01N 21/78** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 21/65** (2006.01)

**B82Y 30/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2018 PCT/US2018/049883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2019 WO19051181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2018 E 18854207 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3679354**

54 Título: **Métodos de nanosensor y aparatos para la determinación de analitos**

30 Prioridad:

**08.09.2017 US 201762556186 P**

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

**12.11.2024**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (100.0%)  
17 Quincy Street  
Cambridge, Massachusetts 02138, US**

72 Inventor/es:

**QUAN, QIMIN y  
LIANG, FENG**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 986 595 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos de nanosensor y aparatos para la determinación de analitos

**5 Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 62/556.186, presentada el 8 de septiembre de 2017, titulada "Nanosensor Methods and Apparatuses for Determination of Analytes", de Quan, *et al.*

10

**Campo técnico**

La presente invención se refiere de manera general a artículos y a métodos relacionados con nanosensores para la determinación de moléculas y otras características, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial, cambios de color, o similares.

15

**Antecedentes**

Se han usado inmunoensayos extensamente para diagnóstico de enfermedades. Los inmunoensayos convencionales (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, inmunotransferencia de tipo Western) tienen una sensibilidad de detección limitada normalmente a 100 pg/ml y por encima, debido a la medición en masa de señales fluorescentes o colorimétricas derivadas de moléculas marcadas de manera fluorescente o reacciones enzimáticas. Además, los inmunoensayos actuales sólo pueden realizarse en un gran número de células. La tecnología de células individuales existente incluye citometría de flujo, que está limitada por la elección de anticuerpos, dado que los métodos de citometría de flujo típicos sólo son compatibles con el 10 % de los anticuerpos disponibles. Ninguna de las tecnologías disponibles actuales puede detectar moléculas intracelulares a nivel de células individuales en un formato altamente multiplexado.

20

25

El documento WO 2016/168386 A1 describe sustratos estructurados y métodos para fabricar sustratos estructurados que mejoran la capacidad de detección de emisiones ópticas proporcionadas por sitios de reacción diferenciados. Por ejemplo, los sustratos estructurados pueden aumentar una intensidad de una luz de excitación experimentada por sustancias biológicas en los sitios diferenciados, pueden aumentar una intensidad de las emisiones ópticas a partir de las sustancias biológicas, y/o pueden controlar una direccionalidad de las emisiones ópticas. En esta solicitud también se presentan métodos de detección de emisiones ópticas a partir de una matriz de sitios diferenciados. Los sitios diferenciados pueden ser cavidades de reacción formadas dentro de un cuerpo de sustrato o zonas localizadas a lo largo de una superficie de un sustrato de dispositivo. Las emisiones ópticas pueden generarse, por ejemplo, mediante fluorescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, electroluminiscencia, radioluminiscencia, y similares. En esta solicitud también se presentan sustratos estructurados que tienen una densidad mayor de sitios diferenciados (o un paso menor entre sitios adyacentes) que los sistemas conocidos y métodos de fabricación de los mismos.

30

35

40

Por consiguiente, se necesitan mejoras en los límites de detección para pronóstico de enfermedades y desarrollo de fármacos.

**45 Sumario**

La presente invención se refiere de manera general a un artículo tal como se define en la reivindicación independiente 1 adjunta y a un método tal como se define en la reivindicación independiente 8 adjunta. En las reivindicaciones dependientes adjuntas se definen realizaciones particulares.

50

Independientemente de lo que se mencione en la siguiente descripción, el alcance de "la invención" está definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas. El objeto de la presente divulgación implica, en algunos casos, productos interrelacionados, soluciones alternativas a un problema particular, y/o una pluralidad de usos diferentes de uno o más sistemas y/o artículos.

55

En un aspecto, la presente divulgación se refiere de manera general a un artículo según la reivindicación 1. En un conjunto de realizaciones, el artículo comprende una matriz de micropocillos que comprende un pocillo que comprende una nanopartícula posicionada de manera distal en un extremo de una nanoestructura, en el que la nanopartícula interactúa con luz incidente mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética.

60

Según otro conjunto de realizaciones, el artículo comprende una matriz de micropocillos que comprende un pocillo, y una matriz de nanosensores que comprende una nanopartícula posicionada de manera distal en el extremo de una nanoestructura contenida dentro del pocillo, en el que la nanopartícula está dimensionada para interactuar con luz visible incidente mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la luz visible incidente.

65

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere de manera general a un método de ensamblaje del artículo. El método comprende inmovilizar un primer sustrato que comprende una matriz de micropocillos que comprende un pocillo con respecto a un segundo sustrato que comprende una matriz de nanoestructuras, comprendiendo al menos algunas de las nanoestructuras nanopartículas posicionadas de manera distal en un extremo de las nanoestructuras, de tal manera que las nanoestructuras están posicionadas dentro de los pocillos.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere de manera general a un método según la reivindicación 8. En un conjunto de realizaciones, el método comprende aplicar radiación electromagnética a una nanopartícula posicionada de manera distal en un extremo de una nanoestructura, en el que la nanopartícula interacciona con la radiación electromagnética mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y determinar la radiación electromagnética alterada.

El método, según otro conjunto de realizaciones, comprende posicionar una célula dentro de un pocillo de una matriz de micropocillos, en el que el pocillo comprende además una nanopartícula posicionada de manera distal en el extremo de una nanoestructura y una entidad de reacción al menos parcialmente recubierta sobre la nanopartícula. En otro conjunto de realizaciones, el método comprende además someter a lisis la célula dentro del pocillo para liberar un analito que se sospecha que es capaz de unirse a la entidad de reacción, y aplicar radiación electromagnética a la nanopartícula, en el que la nanopartícula interacciona con la radiación electromagnética mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y determinar la radiación electromagnética alterada para determinar el analito.

Todavía otro conjunto de realizaciones se refiere a un método que comprende adquirir una primera imagen óptica de una matriz de nanoestructuras en un sustrato, en el que las nanoestructuras tienen una dimensión en sección transversal, ortogonal a la dirección en la que se adquiere la primera imagen óptica, de menos de 700 nm, y en el que las nanoestructuras están al menos parcialmente recubiertas con una entidad de reacción. En otro conjunto de realizaciones, el método comprende además provocar una interacción entre la entidad de reacción y un analito, adquirir una segunda imagen óptica a color de la matriz de nanoestructuras, y determinar un cambio de color entre la primera imagen óptica y la segunda imagen óptica, en el que el cambio de color está provocado por la interacción entre la entidad de reacción y el analito.

En un conjunto de realizaciones, el método comprende posicionar una muestra en un pocillo de una matriz de micropocillos, en el que el pocillo comprende además una nanopartícula posicionada de manera distal en el extremo de una nanoestructura, y aplicar radiación electromagnética a la nanopartícula, en el que la nanopartícula interacciona con la radiación electromagnética mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y determinar la radiación electromagnética alterada.

Otro conjunto de realizaciones es un método que comprende añadir una muestra que se sospecha que contiene un analito a un pocillo de una matriz de micropocillos, en el que el pocillo comprende además una nanopartícula posicionada de manera distal en un extremo de una nanoestructura, estando la nanopartícula al menos parcialmente recubierta con una entidad de reacción. En otro conjunto de realizaciones, el método comprende aplicar radiación electromagnética a la nanopartícula, en el que la nanopartícula interacciona con luz incidente mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y determinar la radiación electromagnética alterada para determinar la interacción de la entidad de reacción con el analito.

En otro conjunto de realizaciones, un método comprende exponer una disolución que se sospecha que contiene un analito a una nanopartícula posicionada de manera distal en el extremo de una nanoestructura, en el que la nanoestructura comprende además una entidad de reacción capaz de interaccionar con el analito, aplicar radiación electromagnética a la nanopartícula, en el que la nanopartícula interacciona con la radiación electromagnética mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y determinar la radiación electromagnética alterada.

El método, según otro conjunto de realizaciones, comprende adquirir una primera y segunda imágenes ópticas a color de una matriz de nanoestructura en un sustrato, en el que la nanoestructura tiene una dimensión en sección transversal de entre 400 nm y 700 nm, y determinar un cambio de color entre la primera y segunda imágenes ópticas a color.

Ventajas y características novedosas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones no limitativas de la divulgación cuando se consideran junto con las figuras adjuntas.

#### Breve descripción de los dibujos

Se describirán realizaciones no limitativas de la presente divulgación a modo de ejemplo con referencia a las figuras

- adjuntas, que son esquemáticas y no se pretende que estén dibujadas a escala. Para propósitos de claridad, no todos los componentes están etiquetados en todas las figuras, ni se muestran todos los componentes de cada realización de la divulgación cuando la ilustración no es necesaria para permitir a los expertos habituales en la técnica entender la divulgación. Algunos signos de referencia en las figuras se usan más de una vez para diferentes características en diferentes figuras. Por tanto, la descripción y los signos de referencia deben interpretarse en el contexto de la figura en cuestión. En las figuras:
- 5
- La figura 1 muestra, según algunas realizaciones, una ilustración de la interacción entre nanosensor y analito, que altera la radiación electromagnética incidente.
- 10
- Las figuras 2A-2B muestran, según algunas realizaciones, el cambio en la luz visible producida por un nanosensor tras la unión de un analito.
- 15
- La figura 3 muestra, según algunas realizaciones, una matriz de micropocillos con una membrana semipermeable que comprende un nanosensor y diversas concentraciones de analito, que producen luz óptica.
- La figura 4 muestra, según algunas realizaciones, una ilustración de una matriz de micropocillos.
- 20
- La figura 5 muestra una representación a modo de ejemplo del atrapamiento de células HEK293 con una eficiencia de atrapamiento de células individuales de aproximadamente el 70 %.
- La figura 6 muestra una representación a modo de ejemplo de nanosensores de nanobarra de silicio.
- 25
- Las figuras 7A-7B muestran representaciones a modo de ejemplo del color de nanobarras de silicio en una imagen de campo oscuro.
- Las figuras 8A-8D muestran, según algunas realizaciones, múltiples formas de nanosensores de silicio, incluyendo nanoconos, nanoagujas, nanohilos, y nanopartículas.
- 30
- Las figuras 9A-9D muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanosensores a medida que aumenta la concentración de proteínas de BSA.
- Las figuras 10A-10C muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanosensores a medida que aumenta la concentración de estreptavidina.
- 35
- Las figuras 11A-11C muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanosensores con diversos diámetros a medida que aumenta la concentración de estreptavidina.
- 40
- La figura 12 muestra, según algunas realizaciones, nanobarras con un diámetro de ~100 nm y una separación de ~400 nm.
- 45
- Las figuras 13A-13C muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanobarras con diámetros de ~100 nm con diversas concentraciones de proteínas de BSA a medida que se absorben las proteínas sobre la metasuperficie.
- 50
- La figura 14 muestra, según algunas realizaciones, nanobarras con un diámetro de ~180 nm y una separación de ~420 nm.
- Las figuras 15A-15C muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanobarras con un diámetro de ~180 nm con diversas concentraciones de proteínas de BSA a medida que se absorben las proteínas sobre la metasuperficie.
- 55
- Las figuras 16A-16B muestran representaciones a modo de ejemplo del desplazamiento de tono de color de nanobarras con un diámetro de ~180 nm con diversas concentraciones de proteínas de BSA a medida que se absorben las proteínas sobre la metasuperficie con una nanopartícula de oro con un diámetro de 1,8 nm como marcador secundario para amplificar el desplazamiento de color.
- 60
- La figura 17 muestra una representación a modo de ejemplo de una imagen de campo oscuro de la matriz de micropocillos con matrices de 3x3 nanosensores individuales en cada pocillo.
- Las figuras 18A-18C muestran una gotita de 20 microlitros de una suspensión de células individuales aplicada sobre un chip de sensor de una matriz de micropocillos y una matriz de nanosensores.
- 65
- Las figuras 19A-19C muestran representaciones a modo de ejemplo de la unión de proteínas sobre nanosensores que inducen un desplazamiento de color que se correlaciona con la concentración de proteína.

La figura 20 muestra, según algunas realizaciones, un portaobjetos de vidrio de 75 mm x 25 mm con 10 matrices de micropocillos.

5 Las figuras 21A-21C muestran representaciones a modo de ejemplo de nanosensores encima de agujas de silicio de tamaño nano o micrométrico separadas con la misma periodicidad que micropocillos.

Las figuras 22A-22I muestran representaciones a modo de ejemplo de matrices de nanosensores para detectar concentraciones de proteína de 0,1 a 10 pM.

10 **Descripción detallada**

La presente invención se refiere de manera general a artículos y a métodos definidos por las reivindicaciones adjuntas y que se refieren a nanosensores para la determinación de moléculas y otras características, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, resonancia magnética, cambios de color, o similares. Estos artículos y métodos pueden usarse, por ejemplo, para la detección de muestras. Los artículos de la invención incluyen una matriz de micropocillos y una matriz de nanosensores. Las matrices de nanosensores usan nanopartículas posicionadas sobre nanoestructuras que son capaces de interactuar con una muestra que se sospecha que contiene un analito, tal como una célula individual. La interacción entre nanopartículas y una muestra puede detectarse mediante un cambio en la energía aplicada, tal como radiación electromagnética alterada provocada por resonancia de plasmón superficial de luz visible incidente, y/u otros tipos de resonancia. Puede aplicarse radiación electromagnética a una matriz de micropocillos y nanosensor, y puede alterarse la radiación electromagnética aplicada a medida que un nanosensor interactúa con una muestra que se sospecha que contiene un analito. Además, en algunas realizaciones, las matrices de nanosensores pueden usar nanoestructuras y la unión de analitos puede determinarse basándose en cambios ópticos o de color.

25 La presente divulgación se refiere de manera general a sistemas y a métodos para detectar biomoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo, que surgen de células u otras fuentes. En algunas realizaciones, se determinan biomoléculas, de manera cualitativa y/o cuantitativa, usando nanoagujas u otras nanoestructuras usadas como sensores. Estos pueden estar presentes, por ejemplo, dentro de una matriz, tal como una matriz de pocillos.

30 En un conjunto de realizaciones, una partícula en un extremo de la nanoaguja tiene un espectro de banda estrecha. La unión de biomoléculas u otros analitos a la partícula, por ejemplo, mediante entidades de reacción, puede afectar a la capacidad de la partícula para producir resonancia en luz incidente, por ejemplo, debido a resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética. Los ejemplos de entidades de reacción incluyen anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, u otras entidades tales como las descritas a continuación. Determinando diferencias en la resonancia, por ejemplo, aplicando luz a las partículas y determinando refracción y/o absorbancia, pueden determinarse interacciones de unión para las partículas y las biomoléculas.

40 Como ejemplo no limitativo, la figura 1 muestra un sistema 10, en el que un analito 15 puede interactuar con una entidad 20 de reacción inmovilizada con respecto a una nanopartícula 25. La interacción puede ser, por ejemplo, específica o no específica, covalente o no covalente, etc. La nanopartícula 25 puede estar posicionada en el extremo 30 de una nanoaguja 35 u otra nanoestructura adecuada. En algunos casos, la nanoaguja puede estar posicionada en un pocillo 40 (por ejemplo, un pocillo aislado o un pocillo de una micromatriz, etc.), aunque, en otros casos, la nanoaguja puede estar posicionada en un sustrato, opcionalmente en una nanoestructura adecuada, y no necesariamente dentro de un pocillo. Luz 45 incidente de una fuente 50 puede interactuar con la nanopartícula 25 y puede interactuar con la partícula mediante el efecto de resonancia de plasmón. Además, algo de luz 55 puede dirigirse a un detector 60, por ejemplo, mediante refracción a partir de la partícula. Determinando diferencias en la luz que llega al detector, pueden determinarse diversas interacciones entre el analito 15 y la entidad 20 de reacción.

50 En otro conjunto de realizaciones, la unión de biomoléculas u otros analitos puede determinarse usando cambios de color, por ejemplo, luz visible. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que determinados tipos de nanoagujas u otras nanoestructuras son capaces de vibrar (por ejemplo, en respuesta a luz visible) únicamente en un modo fundamental. El modo fundamental puede cambiar, por ejemplo, tras la unión de una biomolécula a la nanoaguja, por ejemplo debido a una entidad de reacción. Por consiguiente, pueden usarse cambios en las propiedades visibles de las nanoagujas (por ejemplo, cambios de color y/o intensidad) para determinar interacciones de unión entre las nanoagujas y las biomoléculas.

60 Como ejemplo no limitativo, la figura 2A muestra el sistema 10, en el que la nanoaguja 15 y la entidad 20 de reacción posicionadas en el pocillo 25 producen color de luz 30 visible. El analito 35 no interactúa con la nanoaguja 15 o la entidad 20 de reacción, y no produce luz visible. En el sistema 40 en la figura 2B, la nanoaguja 15 y la entidad 20 de reacción posicionadas en el pocillo 25 se unen al analito 35. La interacción da como resultado un cambio de color óptico o aspecto, producido por la luz 45 visible, que puede ser diferente de la luz 30 visible.

65 En algunos casos, las biomoléculas (u otros analitos) surgen de células. Por ejemplo, pueden someterse células a lisis dentro de pocillos de una placa de micropocillos, y determinarse, de manera cualitativa y/o cuantitativa, usando nanoagujas u otras nanoestructuras usadas como sensores tal como se comenta en el presente documento. En

algunos casos, también pueden estar presentes partículas. Las biomoléculas pueden determinarse usando efectos de resonancia de plasmón, cambios de color, o similares, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, pueden introducirse células en partículas y sellarse en las mismas, por ejemplo, usando membranas. Las células pueden someterse a lisis de manera individual dentro de pocillos independientes, por ejemplo, para evitar la contaminación de un pocillo con otro pocillo a partir de lisados celulares. En realizaciones según la invención, se usan membranas semipermeables para permitir la entrada de reactivo de lisis (por ejemplo, un tampón de lisis) para que entre en los pocillos, pero para evitar que el lisado salga de los pocillos. Por tanto, los lisados de células individuales pueden determinarse de manera individual según determinadas realizaciones.

La figura 3 presenta un ejemplo no limitativo del sistema 10, que incluye los pocillos 25 y 30. La célula 15 y la célula 20 están posicionadas dentro de los pocillos 25 y 30, respectivamente. Las células 15 y 20 pueden someterse a lisis, por ejemplo, con la adición de tampón de lisis en los pocillos 25 y 30. En la matriz 35 de micropocillos está posicionada una membrana 55 semipermeable para evitar la contaminación del contenido del pocillo 25 y el pocillo 30. La membrana semipermeable puede añadirse, por ejemplo, tras la introducción de las células en los pocillos, y antes o después de la lisis de las células.

La interacción de la nanopartícula 45 con analitos de la célula 15 puede dar como resultado luz 60 óptica, mientras que la interacción de la nanopartícula 45 con analitos de la célula 20 (más concentrada que la célula 15) puede dar como resultado luz 65 óptica. Por ejemplo, puede aplicarse luz incidente, y parte de la luz puede absorberse por las nanoagujas. Diferencias en analitos (por ejemplo, concentraciones, tipos, etc.) pueden dar como resultado diferente luz óptica o aspectos de los diferentes pocillos o nanoagujas. Como otro ejemplo, los pocillos pueden comprender nanosensores que comprenden la nanoaguja 40 y la nanopartícula 45 posicionada en el extremo 50 de la nanoaguja 35. La luz incidente puede interactuar con tales sistemas mediante el efecto de resonancia de plasmón, que puede dar como resultado diferente luz refractada o aspectos basándose en diferentes interacciones entre analitos y nanopartículas (por ejemplo, mediante entidades de reacción). Determinando tal luz, pueden determinarse los analitos.

Lo anterior representa diversos ejemplos no limitativos de determinadas realizaciones de la invención, definidos por las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, dentro del alcance definido por las reivindicaciones, también son posibles otras realizaciones. Por consiguiente, más generalmente, ahora se describen diversos ejemplos y realizaciones de la invención en relación con nanosensores para la determinación de moléculas y otras características, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial, cambios de color, o similares.

Algunos artículos y métodos de la presente divulgación se refieren a un sensor que comprende una partícula (por ejemplo, una nanopartícula) que está posicionada en una nanoestructura, por ejemplo, de manera distal en un extremo de la nanoestructura. En algunos casos, la partícula puede interactuar con un analito, por ejemplo, tal como se comenta a continuación, de tal manera que pueden determinarse interacciones entre el analito y la nanoestructura y/o la partícula (por ejemplo, de manera cualitativa y/o cuantitativa) determinando cómo interacciona la luz con la partícula. Por ejemplo, la luz puede interactuar con la partícula mediante efectos de resonancia de plasmón superficial, y pueden usarse cambios en la luz para determinar el analito. En algunos casos, pueden producirse otras resonancias, tales como resonancias eléctricas y/o resonancias magnéticas.

Puede determinarse una variedad de muestras en diversas realizaciones de la divulgación. Por ejemplo, en determinados aspectos, una muestra puede comprender una célula. El nanosensor puede usarse para interrogar de manera óptica o estudiar una muestra, por ejemplo, una célula. En algunos casos, una característica de la célula u otra muestra, tal como la presencia o concentración de un analito o muestra, puede interactuar con el nanosensor y/o una entidad de reacción en el nanosensor, que puede determinarse de manera óptica. Los ejemplos de técnicas de interrogación óptica que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, fluorescencia, fosforescencia, resonancia de plasmón superficial, resonancia plasmónica superficial, resonancia de plasma superficial localizada, espectroscopía de Raman, espectroscopía de Raman potenciada en superficie, o similares.

En determinadas realizaciones, la nanopartícula comprende un metal, por ejemplo, oro, plata, cobre, o similares. Según algunas realizaciones, la nanopartícula comprende oro. En otro conjunto de realizaciones, la nanopartícula comprende plata, un punto cuántico, o una nanopartícula semiconductor.

En algunas realizaciones, las partículas están dimensionadas para interactuar con luz visible incidente mediante el efecto de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, para alterar la luz visible incidente. Por ejemplo, parte de la luz incidente puede absorberse, reflejarse, refractarse, etc., tras la interacción con una partícula. Esto puede producir cambios en la luz, que pueden determinarse de alguna manera. Además, en algunos casos, las partículas están dimensionadas para interactuar con luz visible incidente mediante efectos de resonancia eléctrica y/o magnética.

En realizaciones según la invención, la partícula es una nanopartícula. Por ejemplo, la partícula puede tener un diámetro característico de menos de aproximadamente 1 micrómetro. La partícula puede ser esférica o no esférica. El diámetro característico puede tomarse como el diámetro de una esfera perfecta que tiene el mismo volumen que la partícula no esférica. Según determinadas realizaciones, el diámetro de la nanopartícula es de al menos 0,5 nm,

al menos 1,0 nm, al menos 1,5 nm, al menos 2,0 nm, al menos 2,5 nm, al menos 3 nm, al menos 4 nm, al menos 5 nm, al menos 7 nm, al menos 10 nm, al menos 30 nm, al menos 100 nm, al menos 300 nm, etc. En algunas realizaciones, el diámetro de la nanopartícula es de menos de 1000 nm, menos de 500 nm, menos de 300 nm, menos de 100 nm, menos de 50 nm, menos de 30 nm, menos de 10 nm, menos de 7 nm, menos de 5 nm, menos de 4 nm, menos de 3,0 nm, menos de 2,5 nm, menos de 2,0 nm, menos de 1,5 nm, o menos de 1,0 nm. Además, también son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos; por ejemplo, el diámetro característico puede estar en un intervalo de 0,5 a 3,0 nm.

En algunas realizaciones, la partícula y/o la nanoestructura está al menos parcialmente recubierta con una entidad de reacción. El término "entidad de reacción" se refiere a cualquier entidad que puede interactuar con un analito de tal manera que se provoca un cambio detectable en una propiedad, por ejemplo, de un elemento, tal como una propiedad química, una propiedad óptica, una propiedad mecánica, una propiedad de vibración, etc. La interacción entre la entidad de reacción y el analito puede ser unión específica o no específica, y puede incluir una variedad de interacciones. La interacción de la entidad de reacción con un analito puede ser determinable tal como se comenta en el presente documento, por ejemplo, debido a un cambio en luz.

La entidad de reacción puede comprender una pareja de unión a la que se une el analito en algunas realizaciones. La entidad de reacción puede comprender una pareja de unión específica o no específica del analito. Por ejemplo, la entidad de reacción puede ser un compuesto químico o un compuesto bioquímico, tal como un metal, un ácido nucleico, un anticuerpo, un aptámero, un azúcar, un hidrato de carbono, una proteína, un polímero, un oligonucleótido, un catalizador, un punto cuántico, etc. Como ejemplo no limitativo, en determinadas realizaciones, la entidad de reacción que recubre al menos parcialmente la nanopartícula es un anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo adecuado, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, etc. En algunas realizaciones, la entidad de reacción comprende un producto de reacción enzimática inducido por un sustrato cromogénico marcado en el analito. Los sustratos cromogénicos pueden incluir, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), y similares.

La pareja de unión puede ser una molécula que puede experimentar unión con un analito particular, e incluye parejas de unión específica, semiespecífica, y no específica tal como conocen los expertos habituales en la técnica. El término "se une específicamente", cuando se refiere a una pareja de unión (por ejemplo, proteína, aptámero, ácido nucleico, anticuerpo, etc.), se refiere a una reacción que es determinativa de la presencia y/o identidad de uno u otro miembro del par de unión en una mezcla de moléculas heterogéneas (por ejemplo, proteínas y otros compuestos biológicos). Por tanto, por ejemplo, en el caso de un par de unión de receptor/ligando, el ligando seleccionará de manera específica y/o preferible su receptor a partir de una mezcla compleja de moléculas, o viceversa. Una enzima se unirá específicamente a su sustrato, un ácido nucleico se unirá específicamente a su complemento, un anticuerpo se unirá específicamente a su antígeno. Otros ejemplos incluyen ácidos nucleicos que se unen (hibridan) específicamente a su complemento, anticuerpos que se unen específicamente a su antígeno, y similares. La unión puede ser mediante uno o más de una variedad de mecanismos incluyendo, pero sin limitarse a, interacciones iónicas, interacciones covalentes, interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals, y/o enlaces de hidrógeno, etc.

Como otro ejemplo, la entidad de reacción puede comprender platino, que puede usarse para determinar hidrógeno. Como aún otro ejemplo, la entidad de reacción puede comprender un hidrogel, que puede usarse para determinar agua o humedad. Los ejemplos no limitativos de entidades de reacción incluyen los divulgados en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/175398.

En algunos casos, puede inmovilizarse una o más partículas con respecto a una nanoestructura, por ejemplo, directa o indirectamente, por ejemplo, mediante uno o más grupos de unión o espaciadores. Por ejemplo, las partículas pueden unirse a cualquier ubicación adecuada en la nanoestructura, tal como un lado o un extremo. Como ejemplo, las nanoestructuras pueden unirse a un sustrato en un primer extremo, y una partícula puede unirse a un segundo extremo distal con respecto al primer extremo.

La nanoestructura puede tener cualquier forma y/o tamaño adecuados. En algunos casos, por ejemplo, la nanoestructura puede ser una nanoaguja, un nanohilo, una nanobarra, un nanocono, o similares. Véase, por ejemplo, la figura 8. También son posibles otras formas, por ejemplo, nanocintas, nanofilamentos, nanotubos, nanopilares, o similares. En determinadas realizaciones, las nanoestructuras están verticalmente alineadas, aunque también son posibles otros ángulos o alineaciones.

En algunas realizaciones, la nanoestructura tiene una longitud, determinada desde un extremo o un punto de unión con un sustrato, de menos de aproximadamente 100 micrómetros, menos de aproximadamente 50 micrómetros, menos de aproximadamente 30 micrómetros, menos de aproximadamente 20 micrómetros, menos de aproximadamente 10 micrómetros, menos de aproximadamente 5 micrómetros, menos de aproximadamente 3 micrómetros, menos de aproximadamente 2 micrómetros, menos de aproximadamente 1 micrómetro, menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 50 nm, menos de aproximadamente 30 nm, menos de

aproximadamente 20 nm, menos de aproximadamente 10 nm, etc. En algunos casos, la longitud puede ser de al menos aproximadamente 10 nm, al menos aproximadamente 20 nm, al menos aproximadamente 30 nm, al menos aproximadamente 50 nm, al menos aproximadamente 100 nm, al menos aproximadamente 200 nm, al menos aproximadamente 300 nm, al menos aproximadamente 500 nm, al menos aproximadamente 1 micrómetro, al menos aproximadamente 2 micrómetros, al menos aproximadamente 3 micrómetros, al menos aproximadamente 5 micrómetros, al menos aproximadamente 10 micrómetros, al menos aproximadamente 20 micrómetros, al menos aproximadamente 30 micrómetros, al menos aproximadamente 50 micrómetros, al menos aproximadamente 100 micrómetros, etc. Son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos, por ejemplo, la longitud de la nanoestructura puede ser de entre 0,2 y 2 micrómetros.

La nanoestructura puede tener cualquier forma en sección transversal adecuada, por ejemplo, forma cuadrada, circular, triangular, elipsoidal, poligonal, de estrella, irregular, etc. La nanoestructura puede mantener la misma forma en sección transversal a lo largo de su longitud, o puede haber diferentes formas en sección transversal en diferentes porciones de la nanoestructura. Además, las nanoestructuras pueden tener cualquier diámetro en sección transversal adecuado. El diámetro en sección transversal puede ser constante (por ejemplo, como en una nanoaguja o una nanobarra), o variable (por ejemplo, como en un nanocono). El diámetro promedio puede ser, por ejemplo, de menos de aproximadamente 1000 nm, menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 50 nm, menos de aproximadamente 30 nm, menos de aproximadamente 20 nm, menos de aproximadamente 10 nm, etc. En algunos casos, la longitud puede ser de al menos aproximadamente 10 nm, al menos aproximadamente 20 nm, al menos aproximadamente 30 nm, al menos aproximadamente 50 nm, al menos aproximadamente 100 nm, al menos aproximadamente 200 nm, al menos aproximadamente 300 nm, al menos aproximadamente 500 nm, al menos aproximadamente 1000 nm, etc. También son posibles combinaciones en diversas realizaciones. Por ejemplo, el diámetro promedio de la nanoestructura puede ser de entre 50 nm y 300 nm.

La nanoestructura puede estar formada por cualquier material adecuado, y puede ser igual o diferente de un sustrato sobre el que está unida, por ejemplo, en vertical. En un conjunto de realizaciones, las nanoestructuras se forman a partir de silicio y/u otros materiales semiconductores adecuados (por ejemplo, germanio). Los ejemplos no limitativos adicionales de materiales incluyen metales (por ejemplo, níquel o cobre), sílice, vidrio, o similares. En algunos casos, la nanoestructura (que puede estar unida a un sustrato) puede estar formada a partir de un material unitario.

Puede usarse cualquier método adecuado para formar la nanoestructura. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, técnicas litográficas tales como litografía por haz de electrones, fotolitografía, litografía por rayos X, litografía por ultravioleta extrema, litografía por proyección de iones, etc. como otro ejemplo, en algunas realizaciones, la nanoestructura puede estar formada a partir de uno o más materiales que son sensibles a grabado con un agente de grabado adecuado. Por ejemplo, la nanoestructura puede comprender materiales tales como sílice o vidrio, que pueden grabarse usando HF (ácido fluorhídrico) o BOE (grabado de óxido tamponado). Como otro ejemplo, la nanoestructura puede comprender un metal tal como cobre, hierro, níquel, y/o acero, que puede grabarse usando ácidos tales como HCl (ácido clorhídrico), HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y/u otros compuestos de grabado tales como cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) o sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). Como aún otro ejemplo, la nanoestructura puede comprender silicio u otros materiales semiconductores, que pueden grabarse usando agentes de grabado tales como EDP (una disolución de etilendiamina y pirocatecol), KOH (hidróxido de potasio), y/o TMAH (hidróxido de tetrametilamonio). La nanoestructura también puede comprender, en algunos casos, un plástico o un polímero, por ejemplo, poli(metacrilato de metilo), poliestireno, poli(perfluorobutenil vinil éter), etc., que pueden grabarse usando (hidróxido de potasio), y/u otros ácidos tales como los descritos en el presente documento.

La nanoestructura puede comprender o consistir esencialmente en un material, o más de un material en algunas realizaciones. Por ejemplo, en una realización, la nanoestructura está formada a partir de una pieza unitaria o maciza de material que puede grabarse tal como se comenta en el presente documento.

Determinadas realizaciones de la divulgación también se refieren generalmente a matrices de micropocillos, por ejemplo, que comprenden uno o más pocillos, que pueden ser circulares o no circulares. Pueden estar presentes cualquier número de pocillos, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 500, etc. Los micropocillos también pueden comprender uno o más sensores tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, que comprenden una o más nanoagujas u otras nanoestructuras. En algunas realizaciones, las micromatrices están dimensionadas según normas ANSI/SLAS comercialmente disponibles, por ejemplo, con 6 pocillos, 12 pocillos, 24 pocillos, 48 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos o 1536 pocillos, etc. Las matrices de micropocillos pueden estar formadas de cualquier material adecuado, incluyendo plásticos o polímeros, tales como poliestireno, polipropileno, policarbonato, ciclo-olefina, etc., sílice, vidrio, metales, o similares.

En determinadas realizaciones, un pocillo puede tener un diámetro en un intervalo de 10 micrómetros a 50 micrómetros. Según algunas realizaciones de la divulgación, el diámetro del pocillo es de al menos 10 micrómetros, al menos 20 micrómetros, al menos 30 micrómetros, o al menos 40 micrómetros. En determinadas realizaciones, el diámetro del pocillo es de menos de 50 micrómetros, menos de 40 micrómetros, menos de 30 micrómetros, o menos de 20 micrómetros. También son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos,

por ejemplo, el pocillo puede tener un diámetro de 20 a 40 micrómetros.

Según determinadas realizaciones, la profundidad del pocillo es de al menos 20 micrómetros, al menos 30 micrómetros, al menos 40 micrómetros, o al menos 50 micrómetros. En determinados aspectos de la divulgación, la profundidad del pocillo es de menos de 60 micrómetros, menos de 50 micrómetros, menos de 40 micrómetros, o menos de 30 micrómetros. También son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos, por ejemplo, un pocillo puede tener una profundidad en un intervalo de 20 micrómetros a 60 micrómetros.

En algunas realizaciones, los pocillos pueden tener un paso (o una separación de pocillo a pocillo) de no más de aproximadamente 1000 micrómetros, no más de aproximadamente 700 micrómetros, no más de aproximadamente 500 micrómetros, no más de aproximadamente 300 micrómetros, no más de aproximadamente 100 micrómetros, no más de aproximadamente 50 micrómetros, no más de aproximadamente 40 micrómetros, no más de aproximadamente 30 micrómetros, no más de aproximadamente 25 micrómetros, no más de aproximadamente 20 micrómetros, no más de aproximadamente 15 micrómetros, no más de aproximadamente 10 micrómetros, no más de aproximadamente 5 micrómetros, no más de aproximadamente 3 micrómetros, no más de aproximadamente 2 micrómetros, no más de aproximadamente 1 micrómetro, etc. En algunos casos, el paso puede ser de al menos aproximadamente 1 micrómetro, al menos aproximadamente 3 micrómetros, al menos aproximadamente 5 micrómetros, al menos aproximadamente 10 micrómetros, al menos aproximadamente 15 micrómetros, al menos aproximadamente 20 micrómetros, al menos aproximadamente 25 micrómetros, al menos aproximadamente 30 micrómetros, al menos aproximadamente 40 micrómetros, al menos aproximadamente 50 micrómetros, al menos 100 micrómetros, al menos 300 micrómetros, al menos 500 micrómetros, al menos 700 micrómetros, al menos 1000 micrómetros, etc. Además, también son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos; por ejemplo, el paso puede ser entre aproximadamente 10 micrómetros y 100 micrómetros.

En algunos casos, la matriz de micropocillos puede estar configurada para contener una o más células. Por ejemplo, uno o más lisados que surgen de una célula pueden determinarse en uno o más pocillos, usando uno o más sensores tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, debe entenderse que no se requieren células (o lisados celulares), y otras realizaciones de la divulgación pueden referirse a lisados que surgen de otras fuentes, incluyendo analitos biológicos y no biológicos.

En algunos casos, la matriz de micropocillos puede cargarse para tener una célula por pocillo, o más de una célula por pocillo. Diferentes pocillos pueden tener números iguales o diferentes de células que están presentes. La célula puede ser una célula aislada, un agregado celular, o una célula encontrada en un cultivo celular, en un constructo tisular que contiene células, o similares. Los ejemplos de células incluyen, pero no se limitan a, una bacteria u otro organismo unicelular, una célula eucariota, una célula vegetal, o una célula animal. Si la célula es una célula animal, la célula puede ser, por ejemplo, una célula de vertebrado (por ejemplo, una célula de una mosca de la fruta), una célula de pez (por ejemplo, una célula de pez cebra), una célula de anfibio (por ejemplo, una célula de rana), una célula de reptil, una célula de ave, o un ser humano o mamífero no humano. Si la célula es de un organismo multicelular, la célula puede ser de cualquier parte del organismo.

En algunas realizaciones, se añaden una o más células a uno o más pocillos, y opcionalmente se sellan en su sitio (por ejemplo, para evitar la contaminación o interacción entre diferentes pocillos), por ejemplo, usando una membrana tal como una membrana semipermeable. Sin embargo, según algunas realizaciones, pueden someterse células a lisis dentro de los pocillos para liberar uno o más analitos de interés, tales como proteínas, ácidos nucleicos, o similares.

Puede usarse una variedad de técnicas para someter células a lisis. Por ejemplo, las células pueden someterse a lisis mediante exposición a un compuesto químico de lisis o un tampón de lisis celular (por ejemplo, un tensioactivo tal como Triton® X o SDS, una enzima tal como lisozima, lisostafina, zimolasa, celulasa, mutanolisina, glicanasas, proteasas, manasa, proteinasa K, etc.), o una condición física (por ejemplo, ultrasonidos, luz ultravioleta, agitación mecánica, etc.). Si se usa un compuesto químico de lisis, el compuesto químico de lisis puede añadirse a los pocillos antes y/o después de añadir células. En algunos casos, el compuesto químico de lisis puede añadirse antes o después de añadir una membrana, por ejemplo, para contener la célula dentro del pocillo. En algunos casos, la membrana es permeable y/o semipermeable, lo cual puede facilitar la entrada del compuesto químico de lisis.

En realizaciones según la divulgación, generalmente se aplica una membrana semipermeable que sella el pocillo a la matriz de micropocillos y/o sustrato de nanoestructura, por ejemplo, para contener células u otras muestras dentro de los pocillos. En determinados casos, la membrana semipermeable está dimensionada para evitar el paso de células pero permitir el paso de compuestos más pequeños.

En determinadas realizaciones de la divulgación, puede posicionarse una membrana semipermeable entre la matriz de micropocillos y el sustrato de nanoestructura, o encima de la matriz de micropocillos o el sustrato de nanoestructura. En algunos casos, la membrana semipermeable puede retirarse de la matriz de micropocillos y/o el sustrato de nanoestructura. En determinadas realizaciones, la membrana semipermeable se evalúa mediante microscopía, tal como microscopía de campo oscuro u otras técnicas de microscopía óptica.

Puede usarse una variedad de membranas semipermeables, por ejemplo, que tienen diversas permeabilidades. Por ejemplo, la membrana semipermeable puede ser hidrófila o hidrófoba, porosa o no porosa, etc. En determinadas realizaciones, la membrana semipermeable puede comprender polímeros tales como policarbonato. Otros ejemplos de membranas semipermeables incluyen membranas de intercambio catiónico, membranas de intercambio aniónico, o similares.

Tal como se mencionó anteriormente, realizaciones de los artículos y métodos pueden incluir un sustrato de nanoestructura que se refiere directa o indirectamente a la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones de la divulgación, el sustrato de nanoestructura comprende múltiples nanosensores que se describen en el presente documento. Según determinadas realizaciones, la matriz de micropocillos y el sustrato de nanoestructura son separables. En algunos casos, la separación puede realizarse sin el uso de herramientas. En otras realizaciones de la divulgación, la matriz de micropocillos y el sustrato de nanoestructura son inseparables. En determinadas realizaciones de la divulgación, la matriz de micropocillos y el sustrato de nanoestructura están directamente unidos entre sí, por ejemplo, de tal manera que un nanosensor está presente en al menos un pocillo de la matriz de micropocillos.

En algunas realizaciones, puede aplicarse luz al nanosensor, por ejemplo, para determinar un analito tal como se comenta en el presente documento. En algunos casos, la luz puede interactuar con el nanosensor (por ejemplo, una nanopartícula en el nanosensor) mediante resonancia de plasmón superficial, y/u otras resonancias tales como resonancias eléctricas y/o magnéticas, y el efecto de la interacción puede determinarse, por ejemplo, determinando la refracción y/o absorción de la luz. En un conjunto de realizaciones, la luz aplicada al nanosensor puede ser un haz incidente que comprende luz polarizada en el plano a partir de un láser, tal como un láser de He-Ne. También hay otros láseres comercialmente disponibles.

En algunos casos, la luz incidente incide en una superficie de sustrato, tal como una superficie de silicio o superficie de metal (por ejemplo, oro), por ejemplo de una partícula. En algunos casos, la interacción de un analito con el nanosensor (por ejemplo, mediante una entidad de reacción) puede alterar el índice de refracción, u otras características, de la luz incidente, y esto puede determinarse, por ejemplo, usando un detector. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, oscilaciones de plasmón superficial localizadas pueden producir cambios ópticos en los nanosensores, que pueden generar, por ejemplo, absorciones dentro de las regiones de luz ultravioleta y/o visible. Estas pueden determinarse y usarse para determinar la unión u otras interacciones entre un analito y una entidad de reacción, tal como una proteína o ácido nucleico.

En algunos casos, la luz puede detectarse con un microscopio y/o un espectrómetro, u otro detector óptico. Una variedad de detectores ópticos adecuados, incluyendo espectrómetros, están comercialmente disponibles. En algunos casos, pueden estar presentes otros componentes ópticos, por ejemplo, para facilitar interacciones o detección. Los ejemplos de componentes ópticos incluyen, pero no se limitan a, una guía de ondas, un sensor óptico, un detector óptico, una fibra óptica, o similares.

Sin embargo, debe entenderse que hay otros métodos de detección disponibles además, o en lugar, de efectos de resonancia de plasmón superficial tales como los descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los analitos pueden interactuar con entidades de reacción inmovilizadas con respecto a una nanoestructura (es decir, que pueden o no tener una partícula tal como una nanopartícula), y pueden determinarse cambios en el aspecto óptico, por ejemplo, un cambio de color, para determinar la unión del analito a las entidades de reacción. Puede usarse cualquier método adecuado para determinar cambios en el aspecto óptico, por ejemplo, microscopía óptica, espectrofluorimetría, o similares.

En determinadas realizaciones de la divulgación, un analito puede interactuar con un nanosensor provocando cambios en el aspecto óptico a medida que el nanosensor interactúa con luz incidente mediante resonancia eléctrica o resonancia magnética. Sin desear limitarse a ninguna teoría, puede producirse resonancia eléctrica o resonancia magnética tras la interacción de luz con un nanosensor o porción del mismo, tal como una nanopartícula. En algunos casos, las resonancias pueden alterarse, por ejemplo, tras la aplicación de un campo eléctrico o campo magnético adecuado. Una variedad de generadores de campo eléctrico y/o magnético están fácilmente disponibles en el comercio.

En algunos casos, puede controlarse la distancia o paso entre nanoestructuras en una estructura periódica, por ejemplo, de tal manera que las nanoestructuras forman una metasuperficie. Por ejemplo, el paso puede establecerse para ser menor que la longitud de onda de la luz incidente. Por ejemplo, el paso puede ser de menos de 700 nm, menos de 600 nm, menos de 500 nm, etc. y/o más de 400 nm, más de 500 nm, o más de 600 nm. Por ejemplo el paso puede ser de entre 400 nm y 500 nm. Las nanoestructuras pueden tener cualquiera de las dimensiones proporcionadas en el presente documento. En algunos casos, el diámetro en sección transversal promedio de la nanoestructura es menor que la longitud de onda de la luz incidente.

Sin desear limitarse a ninguna teoría, la luz dispersada a partir de las nanoestructuras individuales puede producir interferencias, y la cantidad de interferencia puede ser sensible a los analitos u otras entidades unidas a las nanoestructuras. De esta manera, pueden usarse cambios de color u otras propiedades ópticas para determinar

cambios en las interacciones de analito.

Debe entenderse que pueden usarse otros pasos, por ejemplo, cuando se aplica luz infrarroja o ultravioleta. Por ejemplo, el paso puede ser de menos de 1000 nm, menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 300 nm, menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 50 nm, menos de aproximadamente 30 nm, menos de aproximadamente 20 nm, menos de aproximadamente 10 nm, etc. y/o el paso puede ser de al menos aproximadamente 10 nm, al menos aproximadamente 20 nm, al menos aproximadamente 30 nm, al menos aproximadamente 50 nm, al menos aproximadamente 100 nm, al menos aproximadamente 200 nm, al menos aproximadamente 300 nm, al menos aproximadamente 500 nm, al menos aproximadamente 1000 nm, etc. También son posibles combinaciones de cualquiera de los mismos en diversas realizaciones.

Se hace referencia a la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/175398 A1. Además, se hace referencia a la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 62/556.186, presentada el 8 de septiembre de 2017, titulada "Nanosensor Methods and Apparatuses for Determination of Analytes", de Quan, *et al.*

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren determinadas realizaciones de la presente invención, pero no muestran a modo de ejemplo todo el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### EJEMPLO 1

Se produjeron nanoestructuras de silicio y se usaron como nanosensores libres de etiqueta. La ventaja de usar nanoestructuras de silicio es que el procedimiento de fabricación es compatible con semiconductor de óxido de metal complementario y puede producirse en masa. Las nanoestructuras de silicio producidas pueden estar, por ejemplo, en forma de una nanobarra, en la que el diámetro es de entre 50 y 300 nm y la altura es de entre 0,2 y 2 micrómetros, tal como se muestra en la figura 6 en este ejemplo. El color de nanobarras con diferentes diámetros en una imagen de campo oscuro presenta diversos colores del espectro (véanse las figuras 7A-7B). Para diámetros por debajo de 250 nm, cada nanobarra tiene un color distintivo. Cuando los diámetros son más grandes de aproximadamente 300 nm, el espectro de color se vuelve similar. Las nanoestructuras de silicio también pueden adoptar otras formas, tales como conos, agujas, hilos, y partículas, tal como se muestra en las figuras 8A-8D. Las dimensiones usadas oscilan desde 50 nm hasta 1 micrómetros.

Para someter a prueba la sensibilidad de la nanobarra de silicio, se funcionalizó el chip o la matriz de micropocillos con disolución de APTM al 2% en etanol (v/v) durante 20 minutos. A continuación, se añadieron en gotas glutaraldehído 10 mM, cianoborohidruro de sodio 10 mM, y anticuerpo anti-BSA diluido 1/1000 sobre la matriz de micropocillos, que después se incubó durante 2 horas. Después se aclaró la matriz de micropocillos. Se añadieron en gotas diferentes concentraciones de disoluciones de BSA sobre el nanosensor. Se lavó la matriz de micropocillos con agua desionizada y se obtuvieron imágenes con un microscopio de campo oscuro con un objetivo 20x. Tal como se muestra en las figuras 9A-9D, el tono de color de cada nanosensor se desplazó hacia rojo (es decir, un aumento de la longitud de onda) a medida que aumentó la concentración de proteínas de BSA.

#### EJEMPLO 2

Se sometieron a prueba diferentes concentraciones de estreptavidina en este ejemplo (véanse las figuras 10A-10C). El espectro de color tiene un desplazamiento a rojo a medida que aumenta la concentración de estreptavidina. En el caso de estreptavidina, cada uno de los nanosensores de silicio funciona de manera independiente. Por tanto, se realizaron nueve nanobarras de silicio diferentes con diámetros de 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, y 240 nm y se sometió a prueba su respuesta de color a diferentes concentraciones de disoluciones de estreptavidina en este ejemplo, tal como se muestra en las figuras 11A-11C. La separación entre cada nanosensor de silicio era de 5 micrómetros.

Cuando se redujo la distancia entre nanosensores por debajo de la longitud de onda del fotón, la luz dispersada a partir de nanobarras individuales produce interferencias y forma de manera colectiva una metasuperficie de silicio. La metasuperficie actúa como sensor, que puede usarse para detectar concentraciones de proteínas. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 12, cuando el diámetro de cada nanobarra es de ~100 nm, la separación es de ~400 nm. Esto produce un color generalmente verde en agua desionizada, y a medida que las proteínas se absorben en su superficie, el color global se desplaza a rojo, tal como se muestra en las figuras 13A-13C.

Se redujo el diámetro de cada nanobarra individual hasta ~180 nm (véase la figura 14), mientras que la separación era de ~420 nm. El tono de color global era naranja-verde en agua desionizada, y se desplazó a rojo a medida que se absorbieron proteínas sobre su superficie, tal como se muestra en las figuras 15A-15C. Además, las partículas de oro con un diámetro de 1,8 nm funcionalizadas con anticuerpo anti-BSA se usaron como marcador secundario para amplificar el desplazamiento de color desde el nanosensor de metasuperficie. El desplazamiento del tono de color debido a la unión de nanopartículas es un orden de magnitud más grande que el desplazamiento debido a la unión de analitos moleculares (30 nm frente a 3 nm) (figuras 16A-16B). Los desplazamientos de color tales como estos pueden cuantificarse, por ejemplo, usando un detector colorimétrico adecuado.

EJEMPLO 3

Para detectar expresiones de proteína en células individuales, se fabricaron nanosensores de silicio en una oblea de silicio usando litografía de haz de electrones y grabado iónico reactivo en este ejemplo. Se usó una única capa de PMMA 950K al 2 % (A2). En primer lugar se deshidrató la oblea a 150 °C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó PMMA a 1600 rpm durante 40 segundos, lo cual proporciona un grosor de 100 nm. Se coció previamente la oblea a 200 °C durante 2 minutos. Se usó ELIONIX F125 con una dosificación de 1800 microculombios/cm<sup>2</sup> a 125 keV. Se desarrolló la capa protectora en metil isobutil cetona:alcohol isopropílico 1:3 (v/v) durante 30 segundos y se aclaró en alcohol isopropílico. Después se recubrió la oblea con 30 nm de alúmina usando un evaporador térmico y se desprendió en acetona caliente durante 3 horas. Después se grabó la oblea usando STS-RIE durante 2 minutos. Se analizó la matriz de micropocillos con matrices de 3x3 nanosensores individuales en cada pocillo mediante obtención de imágenes de campo oscuro, tal como se muestra en la figura 17. Cada nanosensor en el grupo de 3x3 tenía dimensiones ligeramente diferentes y, por tanto, parecía tener colores diferentes.

EJEMPLO 4

Se creó una suspensión de células individuales (concentración celular de 20.000/ml) y se añadieron en gotas 20 microlitros sobre la matriz de micropocillos en este ejemplo. Las células se difundieron en los micropocillos con una eficiencia de atrapamiento que era sensible a la geometría de los micropocillos.

Antes de cargar las células sobre la matriz de micropocillos, se incubó la matriz de micropocillos en APTMS al 2 % en etanol (v/v) durante 10 minutos. Se aclaró la matriz de micropocillos exhaustivamente en etanol y se secó por soplado con gas nitrógeno. A continuación, se añadieron en gotas glutaraldehído 10 mM, cianoborohidruro de sodio 10 mM, y anticuerpo anti-beta-actina diluido 1/1000 sobre la matriz de micropocillos y se incubaron durante 2 horas. Después se aclaró la matriz de micropocillos con agua desionizada. Se aplicó una gotita (20 microlitros) de la suspensión de células individuales sobre el chip de sensor, que tenía tanto los micropocillos como nanosensores, tal como se muestra en las figuras 18A-18C. Después de sembrar las células sobre el chip durante 10 minutos, se aplicó una membrana semipermeable hidrófila (membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 10 nm, grosor de 6 micrómetros) sobre la matriz de micropocillos. La membrana selló la superficie debido a la hidrofilia. A continuación, se aplicó una gotita de tampón de lisis celular sobre la membrana, pasando a través de la misma al interior de los micropocillos individuales. Se sometieron las células a lisis dentro de micropocillos individuales y se capturaron proteínas diana mediante los nanosensores. La unión de proteínas sobre los nanosensores indujo un desplazamiento de color, que se correlacionó con las concentraciones de proteína, tal como se muestra en las figuras 19A-19C.

EJEMPLO 5

Para detectar múltiples proteínas a partir de células individuales, se integraron múltiples matrices de micropocillos en un portaobjetos de vidrio en este ejemplo. Una matriz de micropocillos individual tenía un tamaño de 1 cm x 1 cm, conteniendo 1000 trampas celulares, con nanosensores integrados dentro de cada micropocillo. Un portaobjetos de vidrio de 75 mm x 25 mm albergaba 10 micropocillos, tal como se muestra en la figura 20. Cada micropocillo estaba funcionalizado con un anticuerpo diferente. Por tanto, un portaobjetos de vidrio con 10 micropocillos puede detectar 10 proteínas diferentes en 10 grupos de 1000 células individuales.

Para detectar múltiples proteínas en el mismo grupo de células individuales, se fabricaron nanosensores encima de agujas de silicio de tamaño nano o micrométrico. Los nanosensores usaron oro, plata, o silicio. Las nanoagujas estaban separadas con la misma periodicidad que los micropocillos (véanse las figuras 21A-21C). Por tanto, cada nanoaguja podía estar alineada con cada micropocillo. Los nanosensores encima de cada nanoaguja detectaron la concentración de proteína en la lisis celular a partir de cada micropocillo. Para analizar múltiples proteínas a partir del mismo grupo de células individuales, se pusieron diferentes nanoagujas funcionalizadas con diferentes anticuerpos secuencialmente en contacto con la misma matriz de micropocillos.

EJEMPLO 6

cuando el analito en disolución alcanza el nivel de concentración sub-pM, sólo un número máximo de una molécula de analito estará disponible para unirse a cada nanosensor individual, mientras que la mayoría de los nanosensores en la matriz no tienen ninguna molécula unida. En este régimen de detección, un nivel umbral de la señal (por ejemplo, cambio de color, fluorescencia) a partir del nanosensor puede asignarse o bien como 1 o bien como 0. La concentración del analito en la disolución puede derivarse a partir del recuento directo del número de nanosensores que tienen una asignación de señal de 1, suprimiendo por tanto la señal de ruido inherente a mediciones de colorimetría o fluorescencia en volumen tradicionales a concentraciones ultrabajas.

Dado que las matrices de nanosensores tienen un paso típico en el intervalo de 1-10 micrómetros, es posible empaquetar de manera densa de 10.000 a 1.000.000 nanosensores en un área pequeña (por ejemplo, de 1 mm por 1 mm). Las figuras 22A-22I ilustran la señal óptica de matrices de nanosensores en este régimen. En la figura 22A-

221, se fabricaron 16 bloques de matrices de nanosensores en un chip de silicio. Cada bloque tiene una matriz de 32 por 32 nanosensores, con una separación de 2 micrómetros. Cada nanosensor tiene una forma de nanobarra, con un diámetro de 95 nm y una longitud de 200 nm. La figura 22A muestra el chip en obtención de imágenes de campo oscuro, en el que cada nanosensor muestra un punto de dispersión verde, recogido por una cámara a color. Se funcionalizó el nanochip con (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) al 2 % en etanol al 95 % durante 10 minutos, y se lavó con etanol, se calentó a 80 °C durante 2 horas.

Después se funcionalizó el chip con 10 mM de glutaraldehído y 10 mM de cianoborohidruro de sodio durante 1 hora. Se recubrió la superficie de sensor con 1 microgramo/ml de proteínas tau. Después se hicieron fluir diferentes concentraciones de anticuerpos anti-proteínas tau sobre el chip como dianas de detección. El anticuerpo anti-proteína tau se preparó en una disolución de tampón PBS que contenía gelatina al 0,1 % y NaCl 150 mM. El anticuerpo anti-proteína tau estaba marcado con peroxidasa del rábano. Después de la reacción con sustrato cromogénico, se formó una capa de depósito no soluble sobre la superficie de nanosensor, creando un cambio de resonancia óptica del nanosensor.

La figura 22B muestra la imagen de campo oscuro después del ensayo, en la que cada nanosensor ha cambiado de color de verde a amarillo cuando se detecta la captura de proteínas mediante anticuerpos funcionalizados en el nanosensor. La figura 22C muestra el cambio de tono extraído a partir del alineamiento de la figura 22A y la figura 22B y restando los puntos correspondientes. A una concentración de anticuerpo anti-proteína tau 10 pM, todos los nanosensores en la figura 22C presentaron un delta de tono a aproximadamente -40. Las figuras 22D-22F muestran realizaciones en las que la concentración de anticuerpo anti-proteína tau se redujo hasta 1 pM, y las figuras 22G-22I muestran realizaciones en las que las concentraciones de anticuerpo anti-proteína tau se redujeron hasta 0,1 pM. Un subconjunto de los nanosensores tenían un delta de tono observable en las figuras 22D-22F. Tal como se muestra en las figuras 22G-22I, la mayoría de los nanosensores no tienen un delta de tono observable, lo que indica que la mayoría de los nanosensores no tienen proteínas unidas en su superficie.

Aunque se han descrito e ilustrado varias realizaciones de la presente invención en el presente documento, los expertos habituales en la técnica preverán fácilmente, dentro del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas, una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y se considera que cada una de tales variaciones y/o modificaciones está dentro del alcance de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Más generalmente, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que se pretende que todos los parámetros, dimensiones, materiales, y configuraciones descritos en el presente documento sean a modo de ejemplo y que los parámetros, dimensiones, materiales, y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se usen las enseñanzas de la presente invención, definida por las reivindicaciones adjuntas. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando tan sólo experimentación de rutina, muchas variaciones, dentro del alcance de la invención definido por las reivindicaciones adjuntas, para las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Por tanto, debe entenderse que las realizaciones anteriores se presentan únicamente a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otro modo distinto de tal como se describe específicamente. La presente invención se refiere a cada artículo o método que se encuentra dentro del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas. Además, cualquier combinación de dos o más de tales artículos, y/o métodos, si tales artículos, y/o métodos son según las reivindicaciones y no son mutuamente incompatibles, queda incluida dentro del alcance de la presente invención.

Debe entenderse que todas las definiciones, tal como se definen y se usan en el presente documento, rigen con respecto a definiciones de diccionario, y/o significados habituales de los términos definidos.

Debe entenderse que los artículos indefinidos "un" y "una", tal como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, significan "al menos uno".

Debe entenderse que la expresión "y/o", tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, significa "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes de manera conjuntiva en algunos casos y presentes de manera disyuntiva en otros casos. Múltiples elementos indicados con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Opcionalmente pueden estar presentes otros elementos distintos de los elementos específicamente identificados mediante la cláusula "y/o", ya estén relacionados o no relacionados con esos elementos específicamente identificados. Por tanto, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con una expresión abierta tal como "que comprende", puede referirse, en una realización, únicamente a A (incluyendo opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, únicamente a B (incluyendo opcionalmente elementos distintos de A); en aún otra realización, tanto a A como a B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

Tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que "o" tiene el mismo significado que "y/o" tal como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan

5 elementos en una lista, "o" o "y/o" se interpretarán como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero incluyendo también más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, elementos no indicados adicionales. Sólo términos claramente indicados en sentido contrario, tales como "tan sólo uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se usa en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" tal como se usa en el presente documento sólo se interpretará como que indica alternativas exclusivas (es decir "uno u otro pero no ambos") cuando va precedido por términos de exclusividad, tales como "o bien", "uno de", "sólo uno de", o "exactamente uno de".

10 Tal como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero que no incluye necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente indicados dentro de la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan estar opcionalmente presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a la que se refiere la expresión "al menos uno", ya estén relacionados o no relacionados con los elementos específicamente identificados. Por tanto, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o, de manera equivalente "al menos uno de A y/o B") pueden referirse, en una realización, a al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, A, sin B presente (e incluyendo opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, B, sin A presente (e incluyendo opcionalmente elementos distintos de A); en aún otra realización, a al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, A, y al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, B (e incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

25 Cuando se usa el término "aproximadamente" en el presente documento haciendo referencia a un número, debe entenderse que todavía otra realización de la divulgación incluye ese número no modificado por la presencia del término "aproximadamente".

30 También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de una etapa o acción, el orden de las etapas o acciones del método no está necesariamente limitado al orden en el que se mencionan las etapas o acciones del método.

35 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, debe entenderse que todas las expresiones de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que porta", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que sujeta", "compuesto por", y similares son abiertas, es decir, significan que incluye pero sin limitarse a. Sólo las expresiones de transición "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" serán expresiones de transición cerrada y semicerrada, respectivamente.

40 Los números de referencia usados en el presente documento no deben interpretarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Artículo (10), que comprende:
  - 5 una matriz de micropocillos que comprende pocillos (40) para someter células a lisis dentro de los pocillos (40), un pocillo (40) que comprende una nanoestructura y una nanopartícula (25) posicionada de manera distal en un extremo (30) de la nanoestructura, y una membrana (55) semipermeable que sella el pocillo (40), en el que la membrana (55) semipermeable está configurada para permitir la entrada de un reactivo de lisis para que entre en el pocillo (40), pero para evitar que un lisado celular salga del pocillo (40), y en el que la nanopartícula (25) está configurada para interactuar con luz incidente mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética.
2. Artículo (10) según la reivindicación 1, que comprende además:
  - 15 (a) una entidad de reacción inmovilizada con respecto a la nanopartícula (25), opcionalmente en el que la unión de un analito a la entidad de reacción provoca un cambio en la luz refractada a partir de la nanopartícula (25), opcionalmente en el que la entidad de reacción comprende un anticuerpo, un aptámero, una proteína, y/o un oligonucleótido;
  - 20 (b) un detector (60) posicionado para detectar luz refractada a partir de la nanopartícula (25), opcionalmente en el que el detector (60) es un detector espectroscópico; y/o
  - (c) una fuente (50) de luz posicionada para dirigir la luz incidente a la nanopartícula (25), opcionalmente en el que la fuente (50) de luz comprende un láser, opcionalmente en el que el láser es un láser de He-Ne.
3. Artículo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que:
  - 25 (a) la luz incidente está polarizada en el plano;
  - 30 (b) la luz incidente comprende luz visible; y/o
  - (c) la membrana (55) semipermeable comprende policarbonato.
4. Artículo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que sólo hay una nanopartícula (25) unida a la nanoestructura.
5. Artículo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que:
  - 35 (a) la nanopartícula (25) comprende un metal, opcionalmente en el que el metal es oro o plata;
  - 40 (b) la nanopartícula (25) comprende un punto cuántico;
  - (c) la nanopartícula (25) tiene un diámetro promedio de menos de aproximadamente 3 nm; y/o
  - 45 (d) la nanopartícula (25) tiene un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,5 nm.
6. Artículo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que:
  - 50 (a) la nanoestructura es una nanoaguja (35), un nanohilo, una nanobarra, o un nanopilar;
  - (b) la nanoestructura tiene una longitud de menos de aproximadamente 5 micrómetros;
  - (c) la nanoestructura tiene una longitud de al menos 0,1 micrómetros;
  - 55 (d) la nanoestructura tiene un diámetro en sección transversal promedio de al menos aproximadamente 50 nm;
  - (e) la nanoestructura tiene un diámetro en sección transversal promedio de menos de aproximadamente 500 nm;
  - 60 (f) la nanoestructura comprende un semiconductor; y/o
  - (g) la nanoestructura tiene un paso promedio de menos de 100 micrómetros.
7. Artículo (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que:

- (a) la matriz de micropocillos comprende vidrio;
- (b) la matriz de micropocillos comprende una pluralidad de pocillos (40) que comprenden, cada uno, nanopartículas (25) posicionadas de manera distal en el extremo (30) de nanoestructuras;
- (c) la matriz de micropocillos comprende al menos 10 pocillos que comprenden, cada uno, nanopartículas posicionadas de manera distal en el extremo de nanoestructuras;
- (d) la nanoestructura y la matriz de micropocillos tienen sustancialmente la misma composición;
- (e) la nanoestructura y la matriz de micropocillos definen un material unitario;
- (f) el pocillo (40) tiene un diámetro de menos de 50 micrómetros;
- (g) el pocillo (40) tiene una profundidad de al menos 20 micrómetros;
- (h) el pocillo (40) comprende además una célula; y/o
- (i) el pocillo (40) comprende además lisado celular.

8. Método, que comprende:

aplicar radiación electromagnética a una nanopartícula (25), en el que (i) la nanopartícula (25) está configurada para interactuar con la radiación electromagnética mediante resonancia de plasmón superficial, resonancia eléctrica, y/o resonancia magnética para alterar la radiación electromagnética, y (ii) una matriz de micropocillos que comprende pocillos (40) para someter células a lisis dentro de los pocillos (40), un pocillo (40) que comprende una nanoestructura (35) y la nanopartícula (25) está posicionada de manera distal en un extremo (30) de la nanoestructura (35), y una membrana (55) semipermeable que sella el pocillo (40), en el que la membrana (55) semipermeable está configurada para permitir la entrada de un reactivo de lisis para que entre en el pocillo (40), pero para evitar que un lisado celular salga del pocillo (40); y

determinar la radiación electromagnética alterada.

9. Método según la reivindicación 8:

- (a) en el que la radiación electromagnética comprende luz visible;
- (b) que comprende además exponer una disolución que se sospecha que contiene un analito a la nanopartícula (25), en el que la nanoestructura comprende además una entidad de reacción capaz de interactuar con el analito, opcionalmente en el que la disolución comprende una célula sometida a lisis a partir de la cual surge el analito, y/o
- (c) que comprende además determinar la entidad de reacción determinando la radiación electromagnética alterada.

10. Método según la reivindicación 8, que comprende además:

antes de aplicar radiación electromagnética a la nanopartícula (25), posicionar una célula dentro del pocillo (40) de la matriz de micropocillos, en el que una entidad de reacción está al menos parcialmente recubierta sobre la nanopartícula (25);

someter a lisis la célula dentro del pocillo (40) para liberar un analito que se sospecha que es capaz de unirse a la entidad de reacción; y

después de determinar la radiación electromagnética alterada, determinar el analito.

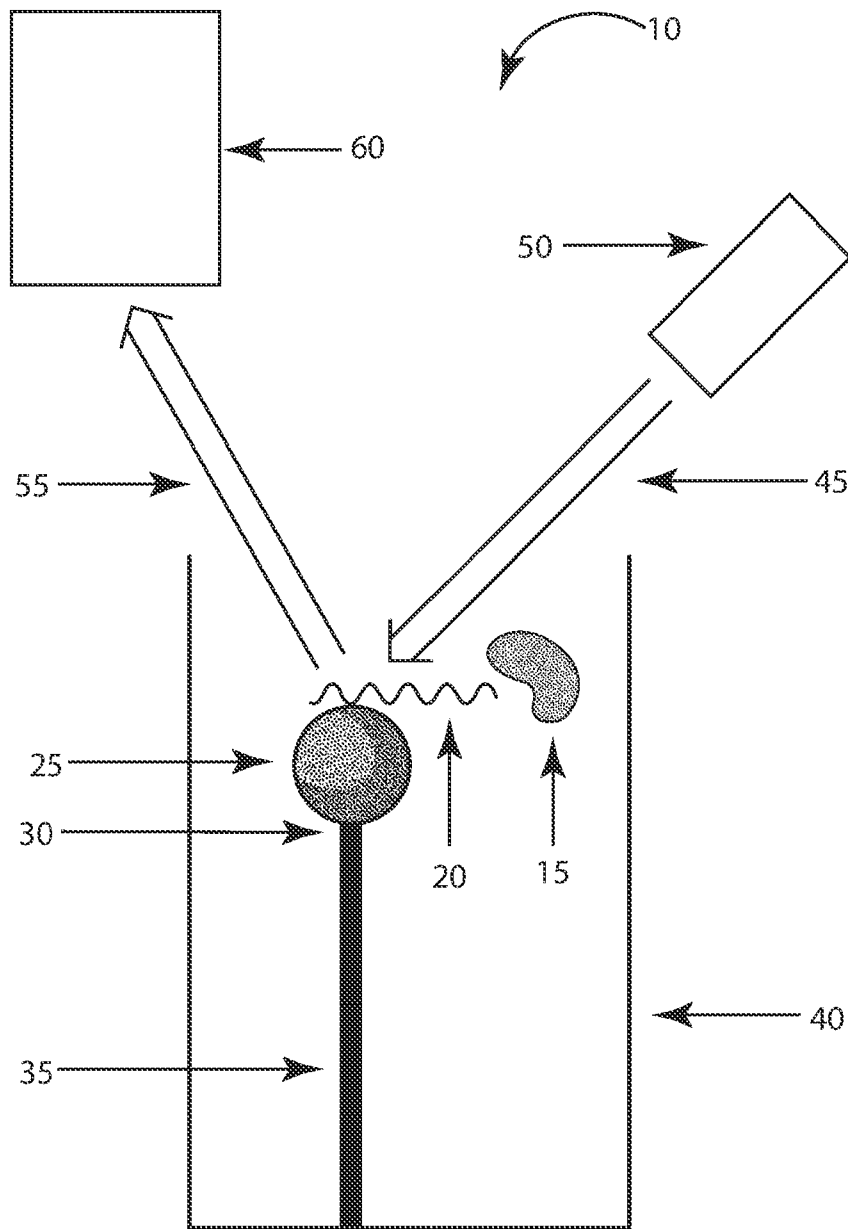


Fig. 1

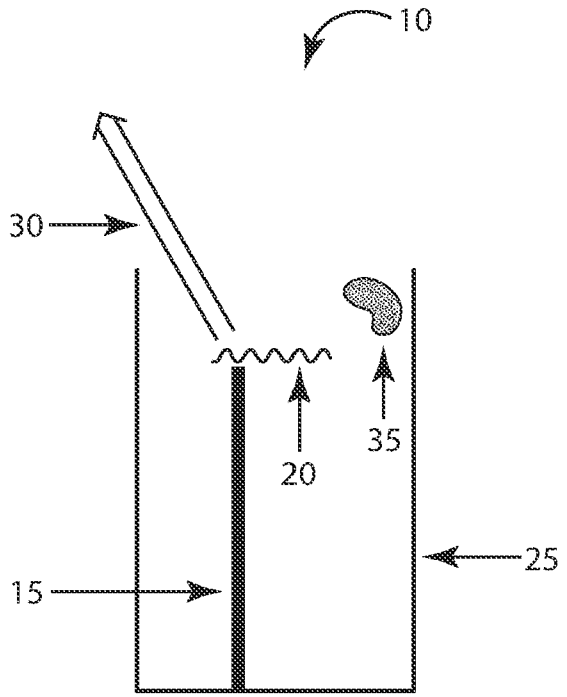


Fig. 2A

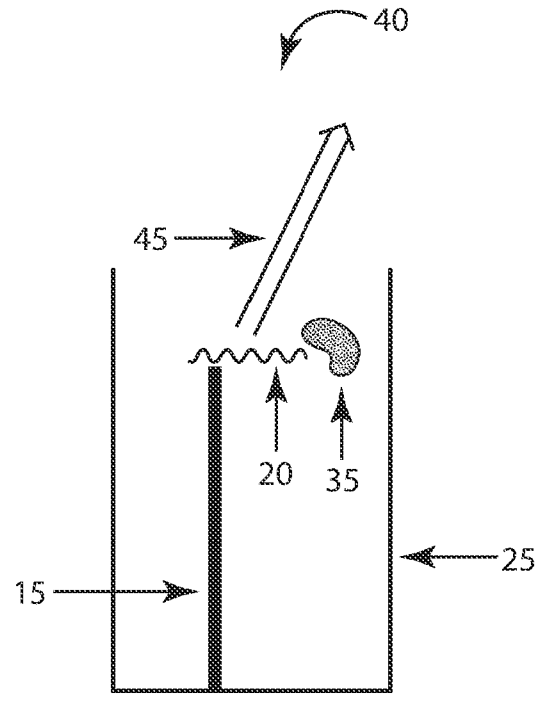


Fig. 2B

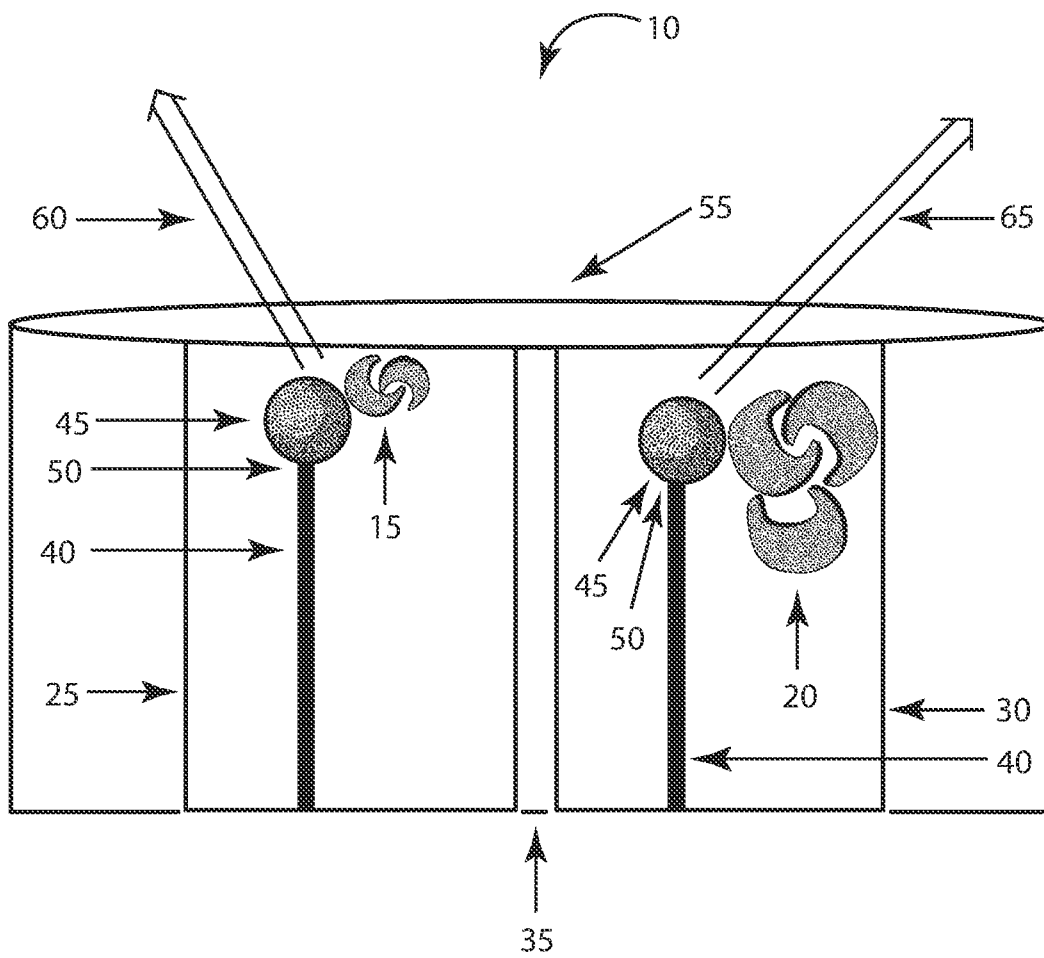


Fig. 3

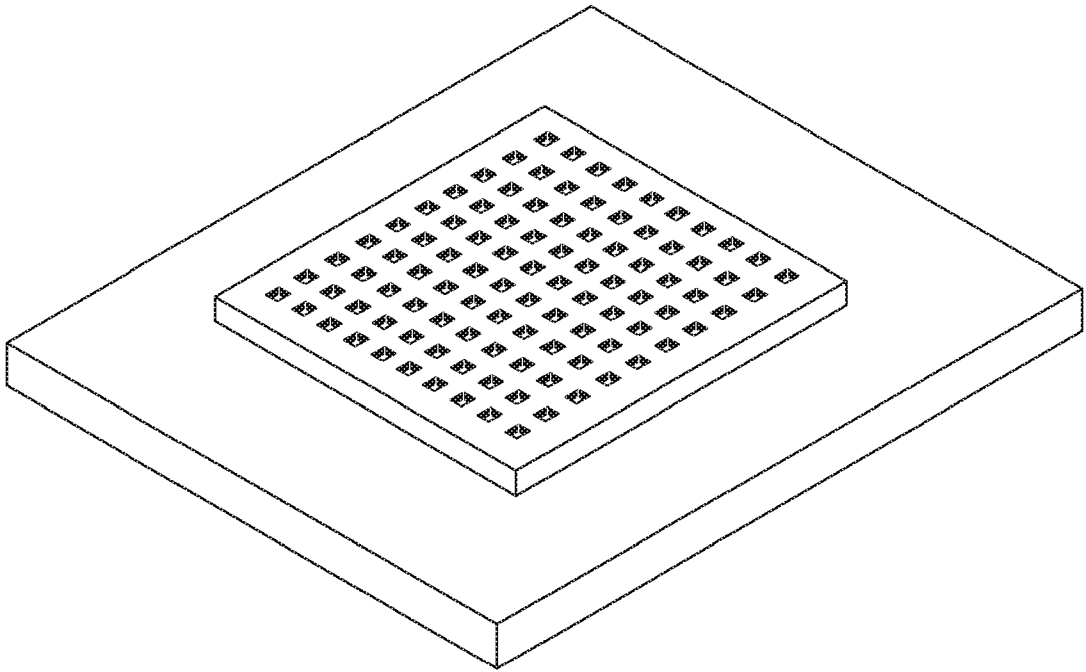


Fig. 4

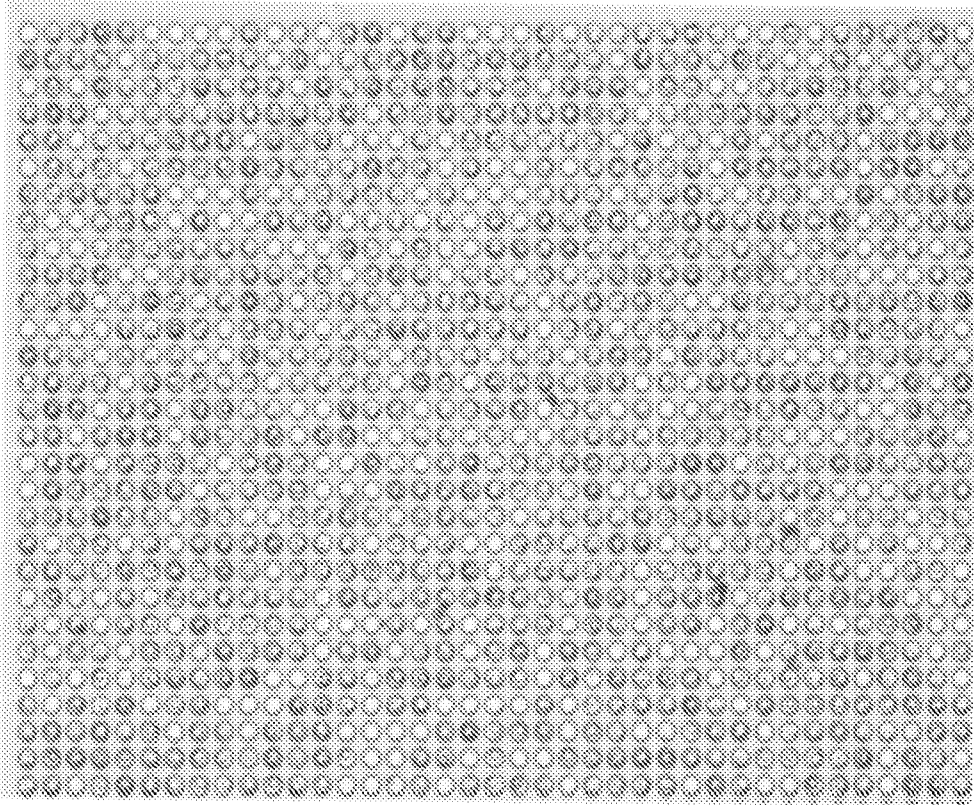


Fig. 5

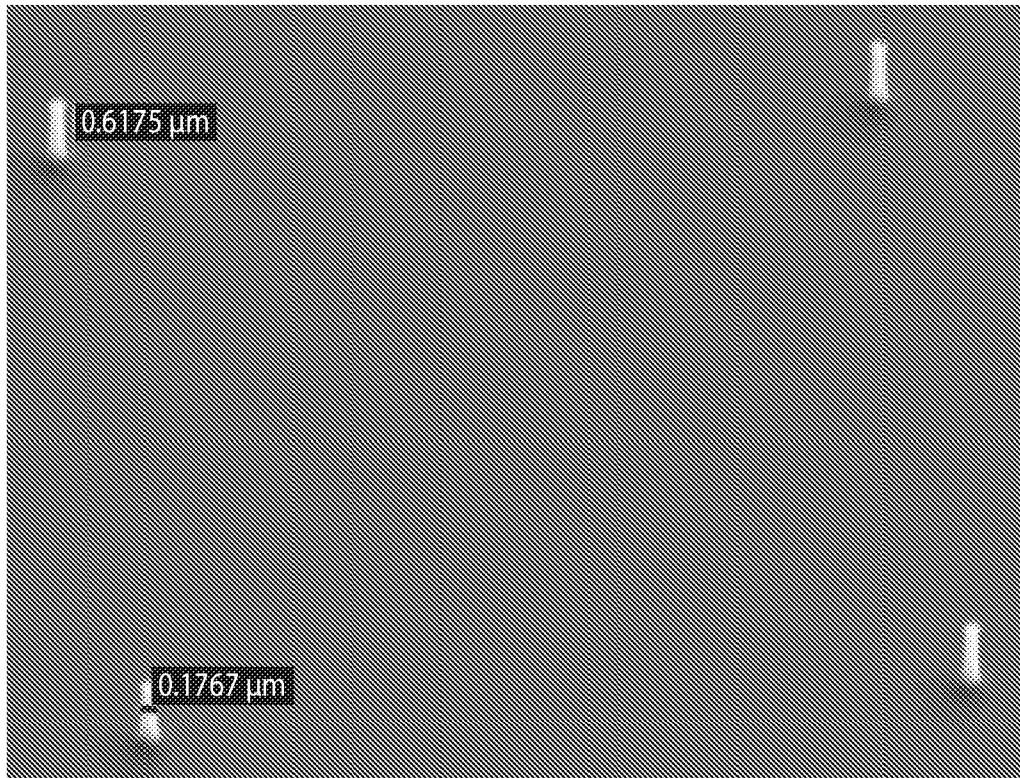


Fig. 6

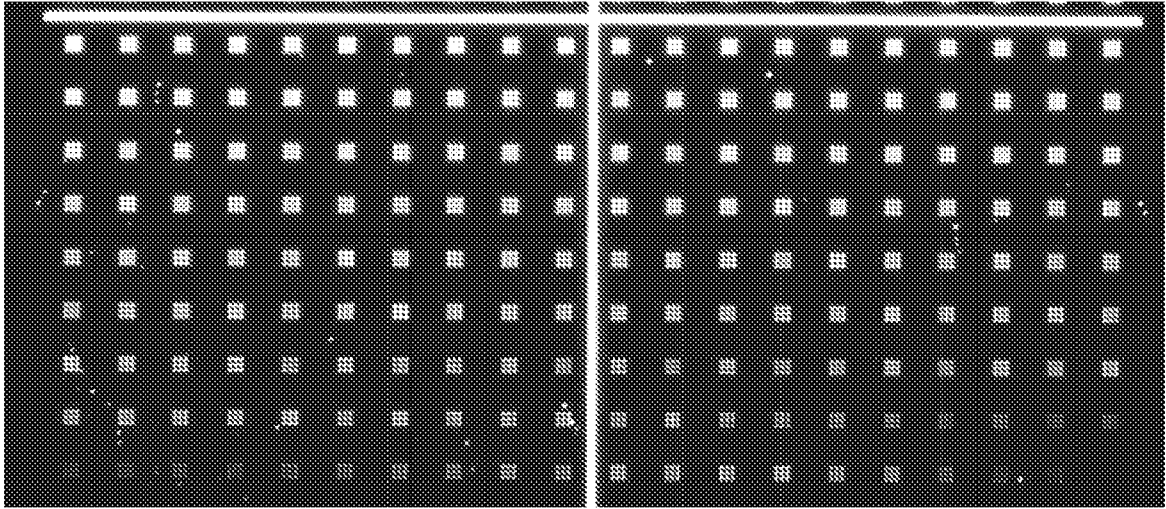


Fig. 7A

Fig. 7B

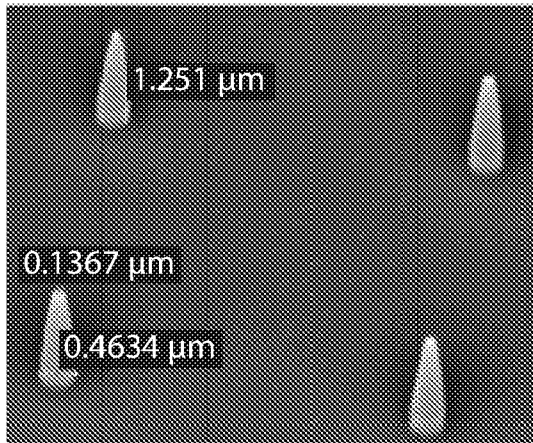


Fig. 8A

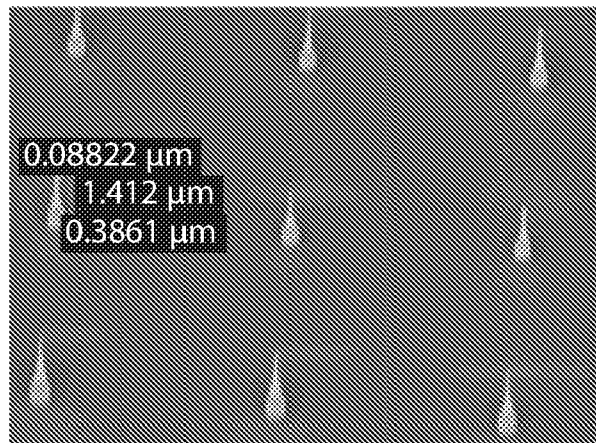


Fig. 8B

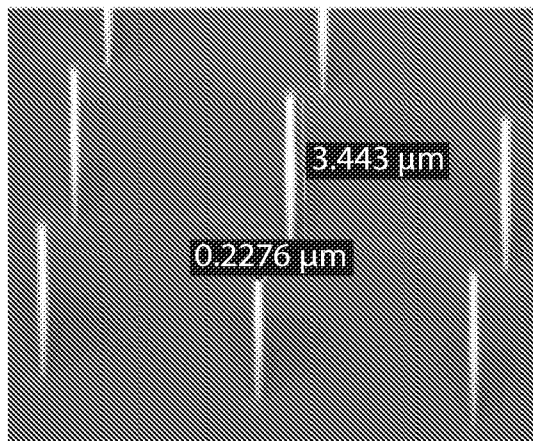


Fig. 8C



Fig. 8D

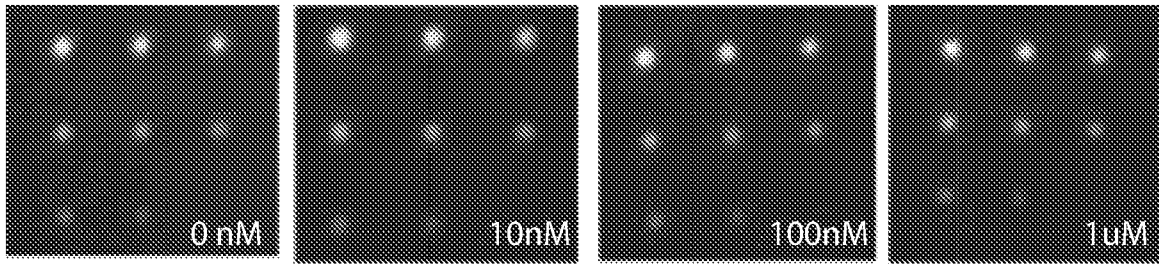


Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9C

Fig. 9D

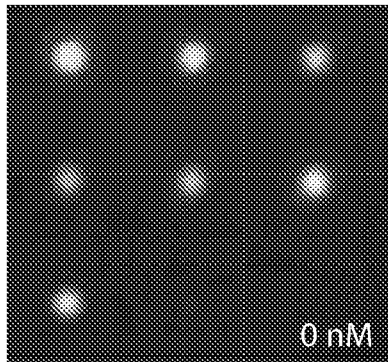


Fig. 10A

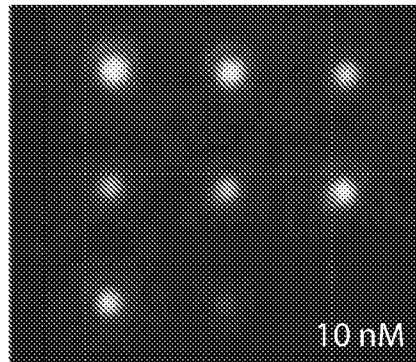


Fig. 10B

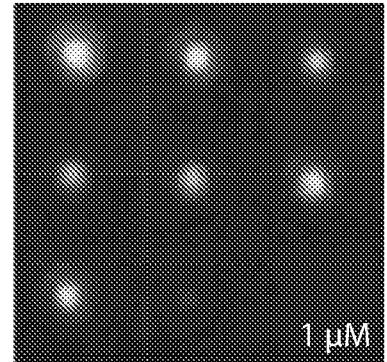


Fig. 10C

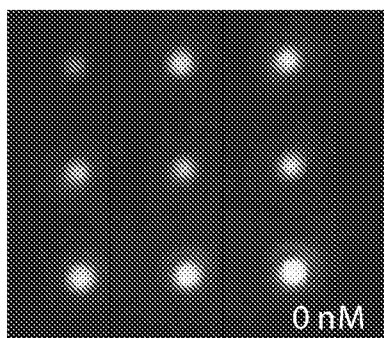


Fig. 11A

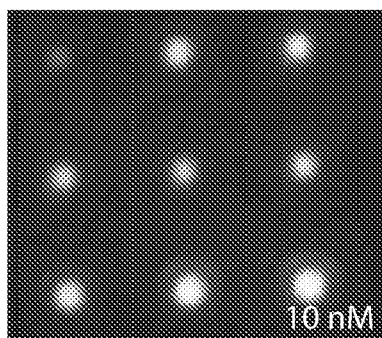


Fig. 11B

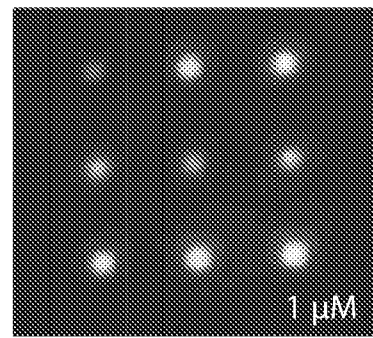


Fig. 11C

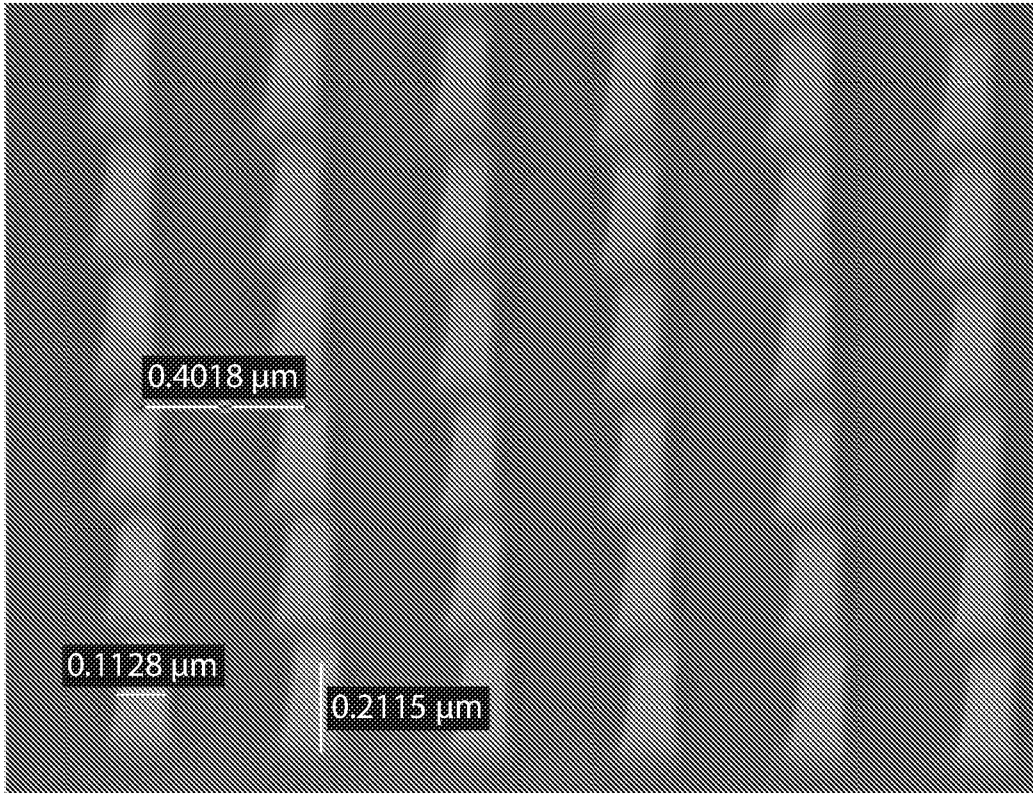


Fig. 12

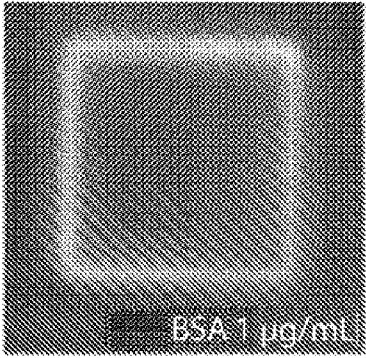


Fig. 13A

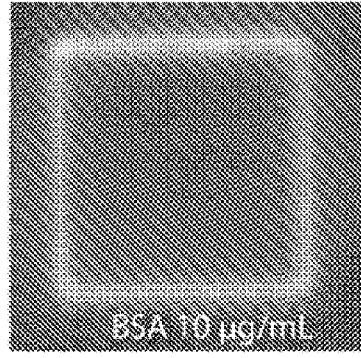


Fig. 13B

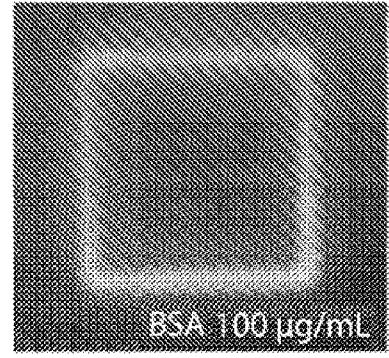


Fig. 13C

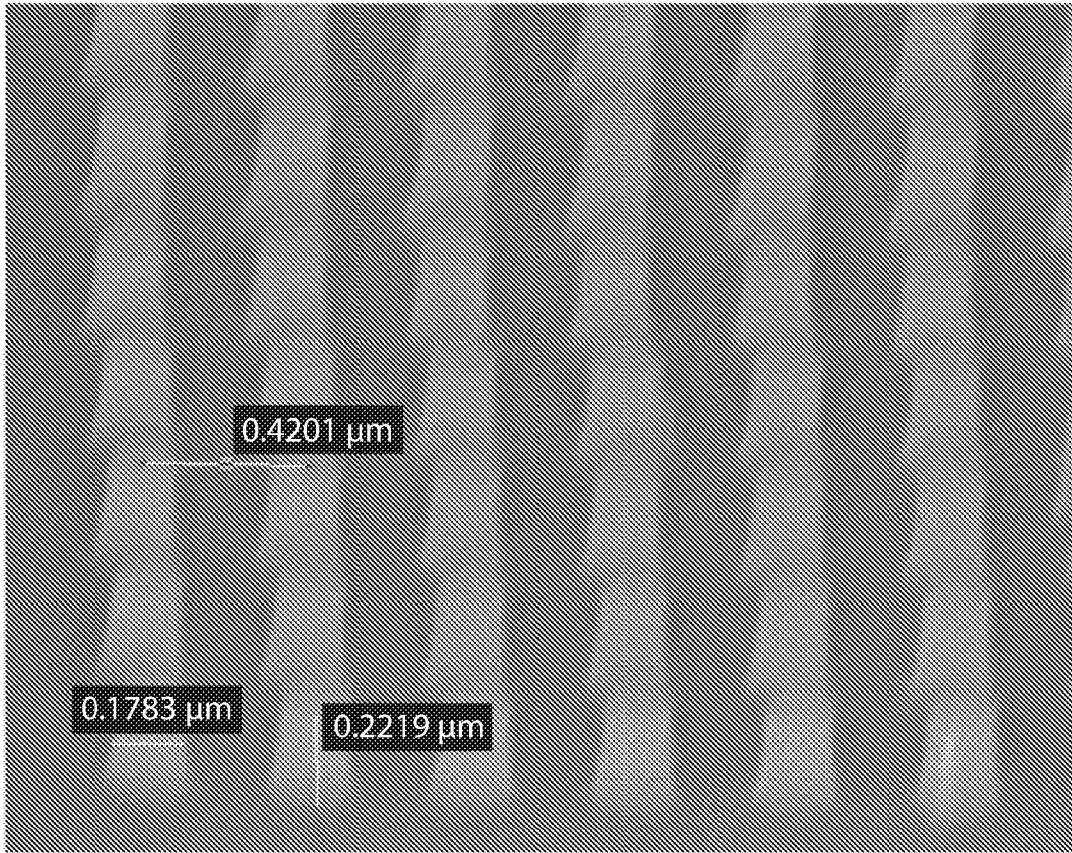


Fig. 14

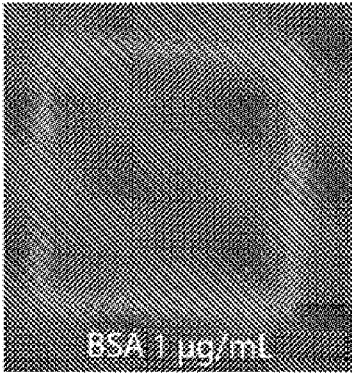


Fig. 15A

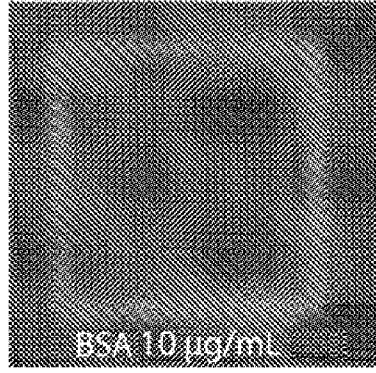


Fig. 15B

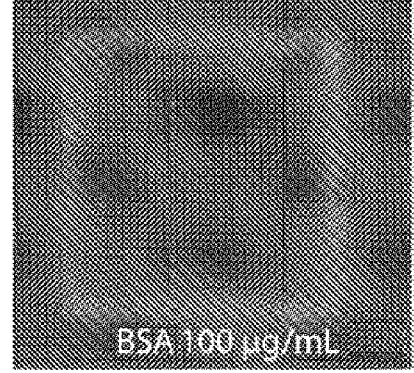


Fig. 15C

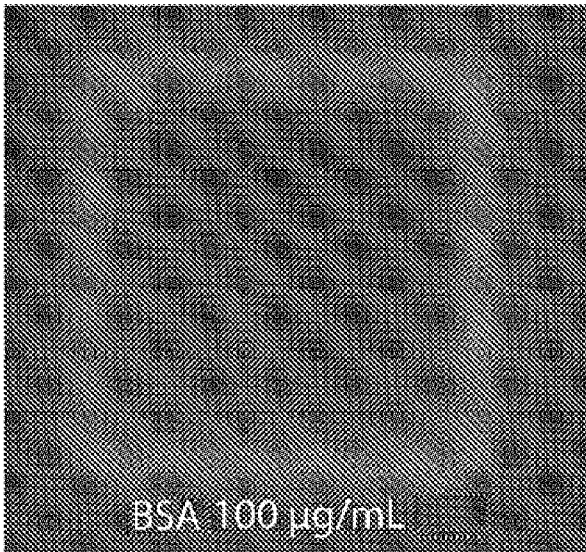


Fig. 16A

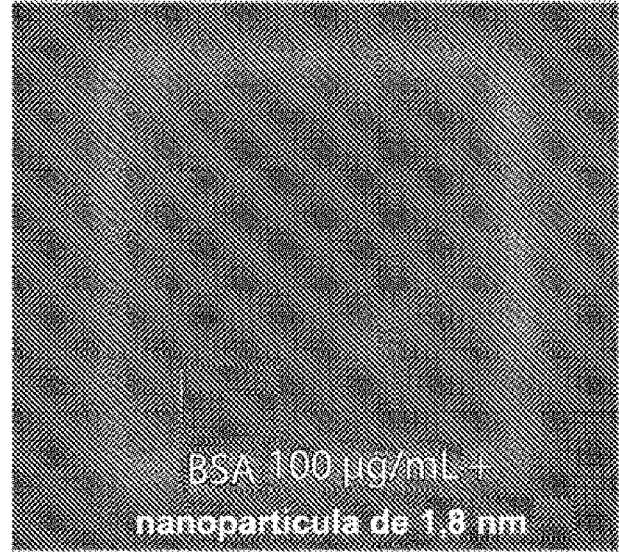


Fig. 16B

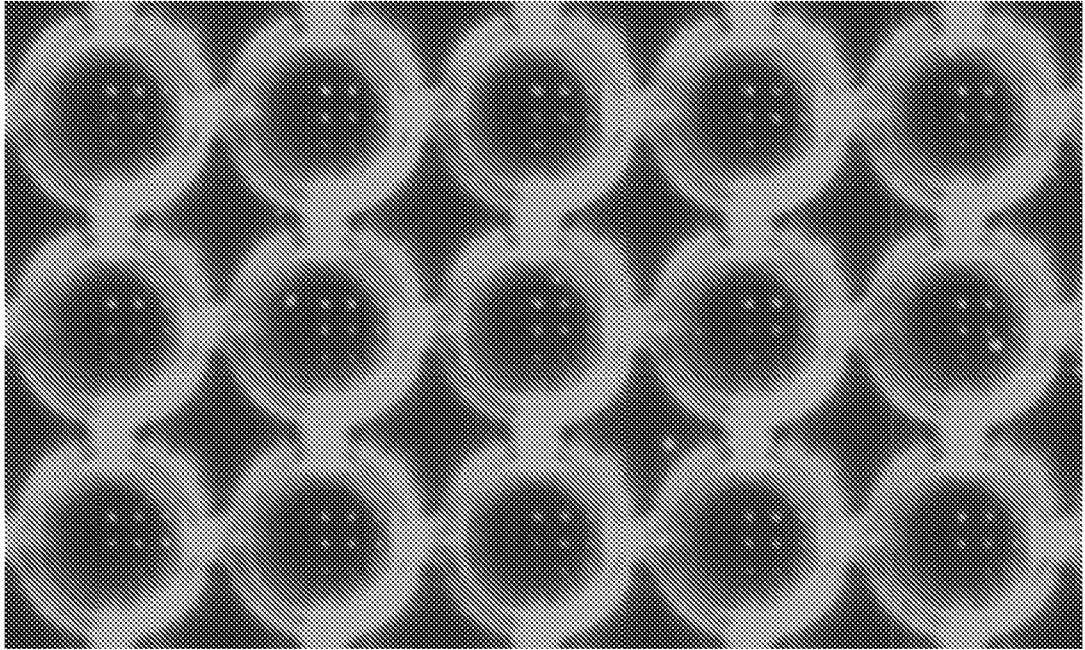


Fig. 17

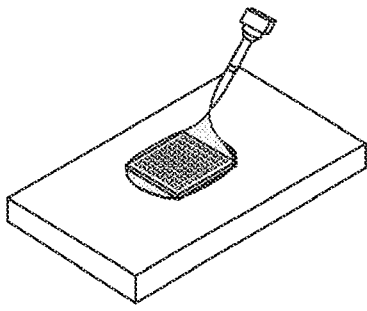


Fig. 18A

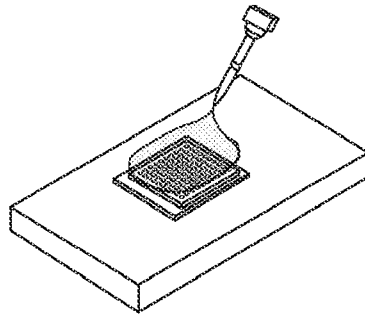


Fig. 18B

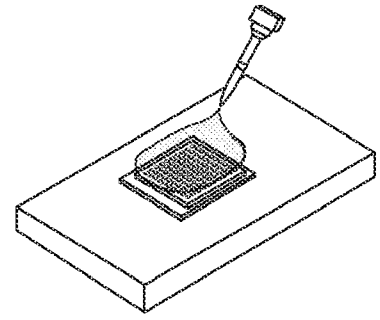


Fig. 18C

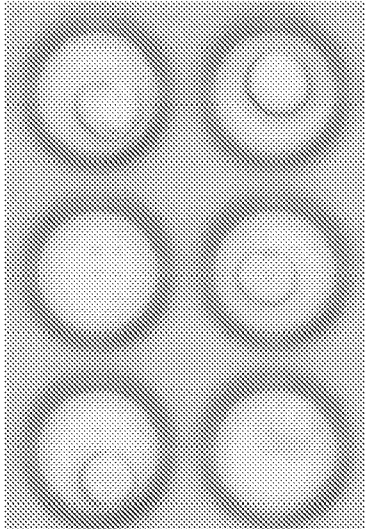


Fig. 19A

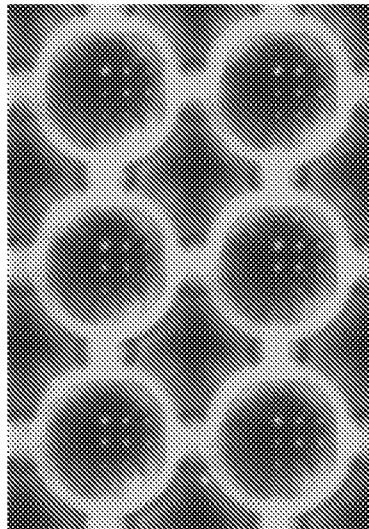


Fig. 19B

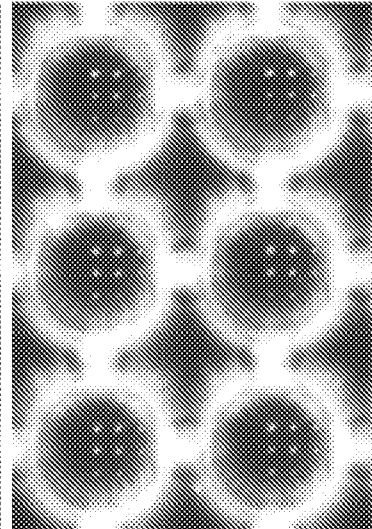


Fig. 19C

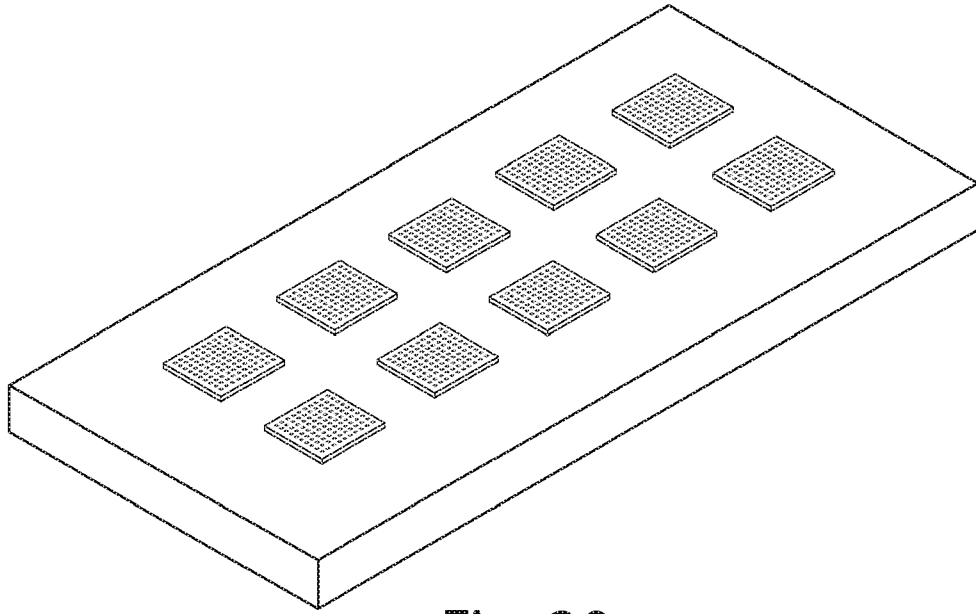


Fig. 20

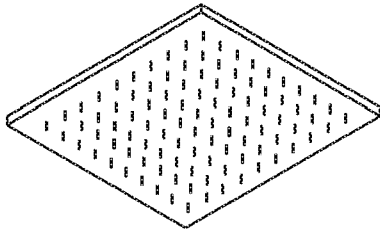


Fig. 21A

+

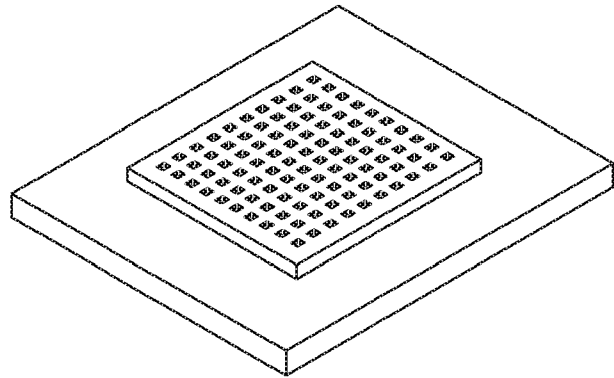


Fig. 21C

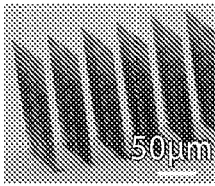


Fig. 21B

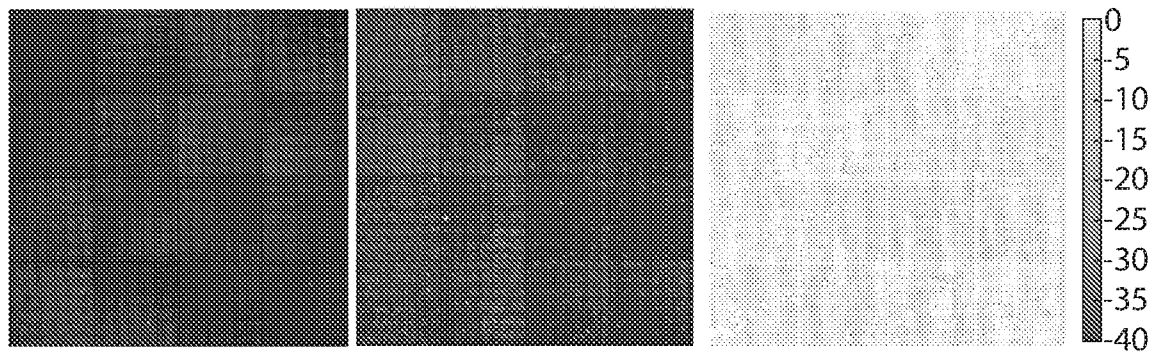


Fig. 22A

Fig. 22B

Fig. 22C

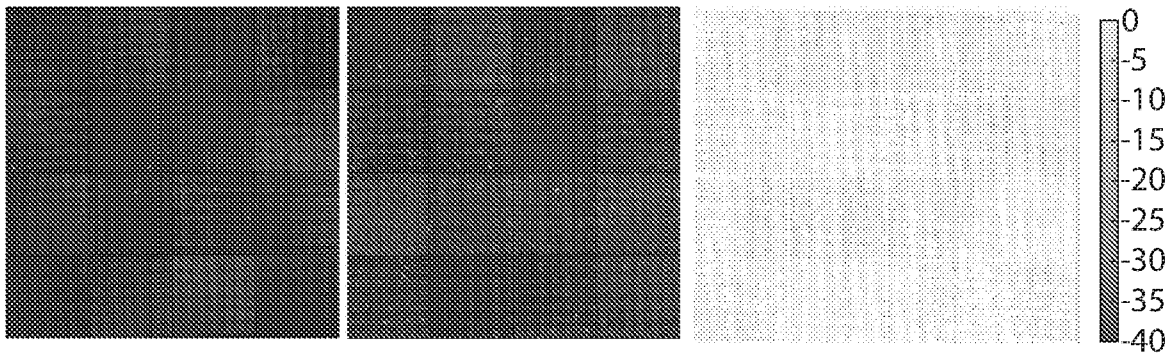


Fig. 22D

Fig. 22E

Fig. 22F

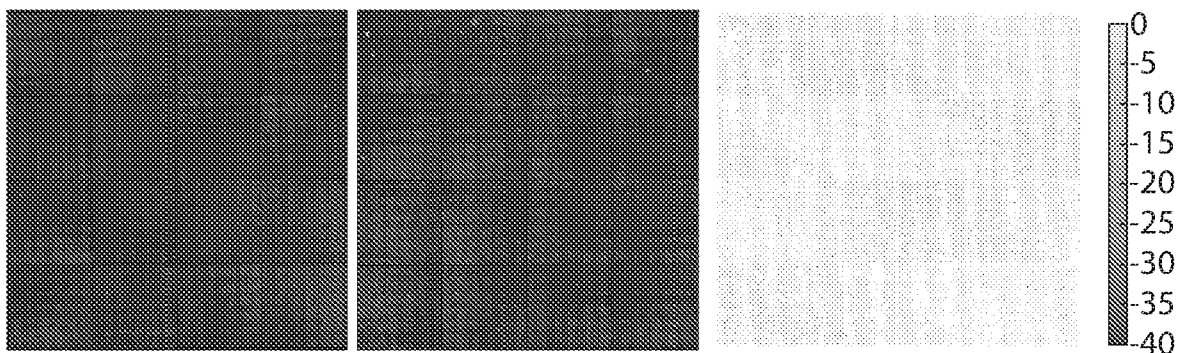


Fig. 22G

Fig. 22H

Fig. 22I