

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 462**

51 Int. Cl.:

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 29/24 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2004 E 04726537 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1613947**

54 Título: **Dispositivo óptico de detección química con transductor piroeléctrico o piezoeléctrico**

30 Prioridad:

10.04.2003 GB 0308324

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

02.09.2013

73 Titular/es:

**VIVACTA LIMITED (100.0%)
100 Guillat Avenue Kent Science Park
Sittingbourne Kent ME9 8GU, GB**

72 Inventor/es:

**CARTER, TIMOTHY JOSEPH NICHOLAS y
ROSS, STEVEN ANDREW**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 421 462 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

Dispositivo óptico de detección química con transductor piroeléctrico o piezoeléctrico

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de detección química que usa un transductor.

El control de analitos en solución, tales como compuestos biológicamente importantes en bioensayos, tiene una amplia aplicabilidad. En consecuencia, una amplia diversidad de dispositivos analíticos y para diagnóstico está disponible. Muchos dispositivos usan un reactivo que experimenta un cambio de color detectable por el ojo en presencia de las especies que se están detectando. El reactivo se lleva a menudo a una tira reactiva y se puede proporcionar la óptica para ayudar en la medida del cambio de color.

10 El documento WO 90/13017 desvela un elemento transductor termoeléctrico piroeléctrico o de otro tipo en forma de tira. Se proporcionan electrodos de película delgada y uno o más reactivos se depositan sobre la superficie del transductor. El reactivo experimenta un cambio colorimétrico selectivo cuando se pone en contacto con las especies que se están detectando. A continuación, el dispositivo se inserta típicamente en un detector en el que el transductor se ilumina normalmente desde abajo mediante una fuente de luz LED y la absorción de luz por el reactivo se detecta como calefacción microscópica en la superficie del transductor. La salida de señal eléctrica desde el transductor se procesa para derivar la concentración de las especies que se están detectando.

15 El sistema del documento WO 90/13017 proporciona el análisis de especies que producen un cambio de color en el reactivo en la reacción o combinación con el reactivo. Por ejemplo, los reactivos incluyen el pH y colorantes indicadores de metales pesados, reactivos (por ejemplo, o-cresol en solución de cobre amoniacal) para la detección de aminofenol en un ensayo de paracetamol, y un colorante de tetrazolio para la detección de una enzima oxidoreductasa en un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, mientras que este sistema es útil en determinadas aplicaciones, se ha considerado adecuado solamente para análisis donde la especie que se está analizando genera un cambio de color en el reactivo ya que es el reactivo que está situado en la superficie del transductor. Por lo tanto, este sistema no se puede aplicar al análisis de especies que no causan un cambio de color en el reactivo o cuando el cambio de color no está en la superficie del transductor. En el campo de bioensayos, esto le da al sistema una aplicabilidad limitada.

20 J.D. Wright *et al*, Sensors and Actuators B 51 (1998) 121-130 desvela un sistema de control químico medioambiental y ocupacional basado en una placa de película polimérica piezoeléctrica. Los cambios de color en los puntos reactivos sobre la película de polímero se miden por iluminación con un LED intermitente. La desintegración no radiativa es transducida por la película polimérica piezoeléctrica hasta una carga que se mide usando un amplificador síncrono. El estudio adicional de los factores genéticos en este sistema de control se establece en C.A. Gibson *et al*, Sensors and Actuators B 51 (1998) 238-243.

25 El documento FR 2 715 226 desvela una disposición para el análisis fototérmico de un material con una estructura en capas para determinar un parámetro físico de una de estas capas. La disposición incluye un sensor piroeléctrico en contacto térmico con las capas.

30 En consecuencia, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar la energía generada por la desintegración no radiativa en un analito o un complejo o derivado del analito al irradiar con radiación electromagnética que comprende una fuente de radiación adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética, un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir la energía generada por el analito o complejo o derivado del analito en una señal eléctrica, al menos un reactivo proximal a la superficie del transductor, reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o al complejo o derivado del analito, un pocillo para contener un líquido que tiene el analito o un complejo o derivado del analito disuelto o suspendido en el mismo en contacto con el transductor, un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor, y un controlador para controlar la fuente de luz y el detector, donde el detector está adaptado para determinar el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica y donde el detector está colocado para detectar solamente la señal eléctrica generada por el transductor hasta un tiempo de retardo seleccionado para distinguir la concentración del analito o de un complejo o derivado del analito a diferentes distancias desde la superficie del transductor.

35 La presente invención se basa en el descubrimiento por el solicitante de que la energía, típicamente calor, generada por la desintegración no radiativa en una sustancia al irradiar con radiación electromagnética, denominada en el presente documento "luz", se puede detectar con un transductor incluso cuando la sustancia no está en contacto con el transductor y además, que el tiempo de retardo entre la irradiación con radiación electromagnética y la señal eléctrica producida por el transductor es una función de la distancia de la sustancia desde la superficie de la película. Este hallazgo tiene una amplia aplicabilidad en los campos de los ensayos y el control.

65

La presente invención también proporciona un método para detectar un analito o un complejo o derivado del analito disuelto o suspendido en una muestra líquida, que comprende las etapas de exponer la muestra líquida a un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio en la energía a una señal eléctrica, transductor que tiene al menos un reactivo proximal al mismo, reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o al complejo o derivado del analito, siendo capaces el analito o el complejo o derivado del analito de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiativa;

5 irradiar el reactivo con una serie de pulsos de radiación electromagnética, transducir la energía generada en una señal eléctrica;

10 detectar la señal eléctrica y el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica, donde el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica corresponde a la posición del analito o de un complejo o derivado del analito en una cualquiera o más posiciones a diferentes distancias desde la superficie del transductor y donde el tiempo de retardo se selecciona para distinguir la concentración del analito o de un complejo o derivado del analito a diferentes distancias desde la superficie del transductor.

Las realizaciones preferentes de la presente invención se describirán a continuación con referencia a los dibujos, en los que

20 la Figura 1 muestra una representación esquemática del dispositivo de detección química de la presente invención;

la Figura 2 muestra un inmunoensayo de tipo sándwich que usa el dispositivo de la presente invención;

la Figura 3 muestra un gráfico del valor lector frente al tiempo para (a) un anticuerpo marcado en una película piezoeléctrica y (b) un anticuerpo marcado en solución, siendo ambos reforzados por deposición catalítica de plata metálica;

25 la Figura 4 muestra los resultados del ensayo de tipo sándwich que usa un anticuerpo marcado con oro coloidal que está potenciado por deposición catalítica de plata metálica sobre la superficie de la película piezoeléctrica;

la Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de tipo sándwich que usa un anticuerpo marcado con oro seguido de la deposición de plata metálica sobre la superficie de la película piezoeléctrica usando cinco concentraciones de analito diferentes;

30 la Figura 6 muestra un gráfico de los recuentos frente al espesor de la película que demuestran transferencia de energía a través de una capa de color por encima de una capa incolora que transfiere energía a una película piezoeléctrica; y

la Figura 7 muestra un gráfico de los recuentos frente al retardo de correlación que demuestran transferencia de energía a través de la capa de color y de una capa sin colorear que transfiere energía a la película piezoeléctrica.

La Figura 1 muestra una parte de un dispositivo de detección química I de acuerdo con la presente invención que se basa en la generación de calor en una sustancia 2, un analito o un complejo o derivado del analito (véase también la

40 Figura 2), por irradiación de la sustancia 2 con radiación electromagnética. La Figura 1 muestra el dispositivo de detección química 1 en presencia de una sustancia 2. El dispositivo 1 comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico 3 que tiene revestimientos de los electrodos 4, 5. El transductor 3 es preferentemente una película de fluoruro de polivinilideno polarizado. Los revestimientos de los electrodos 4,5 se forman preferentemente a partir de óxido de indio y estaño que tiene un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque es posible casi cualquier espesor a partir un límite inferior de 1 nm por debajo del cual la conductividad es demasiado baja y un límite superior de 100 nm por encima del cual la transmisión óptica es demasiado baja (no debería ser inferior a un 95% de T). Una sustancia 2 se mantiene proximal al transductor piezoeléctrico 3, que se muestra aquí unida al revestimiento del electrodo superior 4. Se pueden depositar una pluralidad de sustancias. Preferentemente, la sustancia 2 es adsorbida en el electrodo superior, por ejemplo, acoplada covalentemente o unida mediante fuerzas intermoleculares tales como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Una característica clave de la presente invención es que la sustancia 2 genera calor cuando se irradia mediante una fuente de radiación electromagnética 6, tal como luz, preferentemente luz visible. La fuente de luz puede ser, por ejemplo, un LED. La fuente de luz 6 ilumina la sustancia 2 con luz de la longitud de onda apropiada (por ejemplo, un color complementario). Aunque no se desea quedar ligado por la teoría, se cree que la sustancia 2 absorbe la luz para generar un estado excitado que después experimenta desintegración no radiativa generando por lo tanto energía, indicada por las líneas curvas en la Figura 1. Esta energía está principalmente en forma de calor (es decir, movimiento térmico en el medio ambiente) aunque también se pueden generar otras formas de energía, por ejemplo, una onda de choque. La energía, sin embargo, es detectada por el transductor y se convierte en una señal eléctrica. El dispositivo de la presente invención se calibra para la sustancia en particular que se está midiendo y por lo tanto no es necesario determinar la forma precisa de la energía generada por la desintegración no radiativa. A menos que se especifique de otro modo, el término "calor" se usa en el presente documento para hacer referencia a la energía generada por la desintegración no radiativa. La fuente de luz 6 se coloca de modo que ilumine la sustancia 2. Preferentemente, la fuente de luz 6 se coloca por debajo del transductor 3 y los electrodos 4, 5 y la sustancia 2 se ilumina a través del transductor 3 y los electrodos 4, 5. La fuente de luz puede ser una fuente de luz interna dentro del transductor en el que la fuente de luz es un sistema de ondas guiadas. La guía de las ondas puede ser el transductor en sí mismo o la guía de las ondas puede ser una capa adicional unida al transductor.

La energía generada por la sustancia 2 es detectada por el transductor 3 y se convierte en una señal eléctrica. La señal eléctrica es detectada por un detector 7. Tanto la fuente de luz 6 como el detector 7 están controlados por el controlador 8. La fuente de luz 6 genera una serie de pulsos de luz (el término "luz" usado en el presente documento se refiere a cualquier forma de radiación electromagnética a menos que se mencione una longitud de onda específica) que se denomina "luz picada". En principio, un único destello de luz, es decir, un pulso de radiación electromagnética, sería suficiente para generar una señal desde el transductor 3. Sin embargo, para obtener una señal reproducible, se usa una pluralidad de destellos de luz que en la práctica requieren luz picada. La frecuencia a la que se aplican los pulsos de radiación electromagnética se puede variar. En el límite inferior, el tiempo de retardo entre los pulsos debe ser suficiente para el tiempo de retardo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica a determinar. En el límite superior, el tiempo de retardo entre cada pulso no debe ser tan grande como para que el periodo necesario para registrar los datos se convierta en excesivamente prolongado. Preferentemente, la frecuencia de los pulsos es de 2-50 Hz, más preferentemente 5-15 Hz y lo más preferentemente 10 Hz. Esto corresponde a un tiempo de retardo entre pulsos de 20-500 ms, 66-200 ms y 100 ms, respectivamente. Además, la llamada relación de "marca-espacio", es decir, la relación de la señal de encendido a la señal de apagado es preferentemente uno aunque se puede usar otras relaciones sin efecto perjudicial. Las fuentes de radiación electromagnética que producen luz picada con diferentes frecuencias de picado o diferentes relaciones de marca-espacio son conocidas en la técnica. El detector 7 determina el tiempo de retardo (o "retardo de correlación") entre cada pulso de luz a partir de la fuente de luz 6 y la correspondiente señal eléctrica detectada por el detector 7 desde el transductor 3. El solicitante ha encontrado que este tiempo de retardo es una función de la distancia, d .

Dentro del alcance de las reivindicaciones 1 y 14, se puede usar cualquier método para determinar el tiempo de retardo entre cada pulso de luz y la correspondiente señal eléctrica que proporciona resultados reproducibles. Preferentemente, al tiempo de retardo se mide desde el comienzo de cada pulso de luz hasta el punto en el que un máximo en la señal eléctrica que corresponde a la absorción de calor es detectado por el detector 7.

El hallazgo de que la sustancia 2 se puede separar de la superficie del transductor y de que una señal aún se puede detectar es sorprendente ya que el experto en la materia habría esperado que el calor se dispersara en el medio circundante y por lo tanto que no fuera detectable por el transductor 3 o al menos que ninguna señal significativa fuera recibida por el transductor. El solicitante ha encontrado, sorprendentemente, que no solamente la señal se puede detectar a través de un medio de intervención capaz de transmitir energía al transductor 3, sino que se pueden distinguir diferentes distancias, d (ésto se ha denominado "perfil de profundidad") y que la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la sustancia 2 a la distancia en particular, d , desde la superficie del transductor 3. Además, el solicitante ha encontrado que la naturaleza del medio en sí misma influye en el tiempo de retardo y en la magnitud de la señal en un tiempo de retardo dado. Estos hallazgos proporcionan un gran número de nuevas aplicaciones para dispositivos de detección química que usan un transductor.

En una realización, la presente invención proporciona un dispositivo como se define en la reivindicación 1 donde la sustancia es un analito o un complejo o derivado del analito, dispositivo que se usa para detectar el analito en una muestra, dispositivo que comprende adicionalmente al menos un reactivo proximal al transductor, reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o al complejo o derivado del analito, donde el analito o el complejo o el derivado del analito es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía, típicamente calor, donde, en uso, la energía, típicamente calor, generada se transduce en una señal eléctrica por el transductor y es detectada por el detector, y el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica corresponde a la posición del analito en cualquiera de una o más posiciones a diferentes distancias de la superficie del transductor. La presente invención también proporciona un método que se define en la reivindicación 14 para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de exponer la muestra a un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio en la energía, típicamente calor, a una señal eléctrica, transductor que tiene al menos un reactivo proximal al mismo, reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o al complejo o derivado del analito, siendo capaces el analito o el complejo o el derivado del analito de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía, típicamente calor; irradiar el reactivo con una serie de pulsos de radiación electromagnética, transducir la energía, típicamente calor, generada en una señal eléctrica; detectar la señal eléctrica y el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica, donde el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica corresponde a la posición del analito en cualquiera de una o más posiciones a diferentes distancias de la superficie del transductor. Dicho dispositivo y método tienen aplicabilidad, por ejemplo, en inmunoensayos y en ensayos basados en ácidos nucleicos. En un ejemplo preferente de un inmunoensayo, el reactivo es un anticuerpo y el analito es un antígeno.

En un inmunoensayo típico, un anticuerpo específico para un antígeno de interés se une a un soporte polimérico tal como una lámina de cloruro de polivinilo o poliestireno. Una gota de extracto celular o una muestra de suero o de orina se coloca en la lámina, que se lava después de la formación del complejo anticuerpo-antígeno. A continuación se añade anticuerpo específico para un sitio diferente en el antígeno, y la lámina se lava de nuevo. Este segundo anticuerpo lleva una marca de modo que se puede detectar con alta sensibilidad. La cantidad del segundo anticuerpo unido a la lámina es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Este ensayo y otras variaciones en este tipo de ensayo son bien conocidos, véase, por ejemplo, "The Immunoassay Handbook, 2nd Ed."

David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001. El dispositivo de la presente invención se puede usar en cualquiera de estos ensayos.

5 A modo de ejemplo, la Figura 2 muestra un ensayo típico de anticuerpo de captura que usa el dispositivo de la presente invención. Un dispositivo incluye un transductor 3 y un pocillo 9 para contener un líquido 10 que contiene un analito 11 disuelto o suspendido en el mismo. El transductor 3 tiene un número de reactivos, es decir, el anticuerpo 12, unido al mismo. El anticuerpo 12 se muestra unido a la película en la Figura 2 y esta unión puede ser a través de un enlace covalente o mediante adsorción no covalente sobre la superficie, tal como por puentes de hidrógeno. El anticuerpo se muestra como unido al transductor.

10 Por ejemplo, una capa adicional puede separar el anticuerpo 12 y el transductor 3, tal como una capa de polímero de silicona, o el anticuerpo se podría unir a las partículas inertes y las partículas inertes se unen a continuación al transductor 3. Como alternativa, el anticuerpo 12 podría ser atrapado dentro de una capa de gel que está revestida sobre la superficie del transductor 3.

15 En uso, el pocillo se llena con un líquido 10 (o cualquier fluido) que contiene un antígeno 11. El antígeno 11 se une a continuación al anticuerpo 12. El anticuerpo marcado adicional 13 se añade al líquido y se forma un complejo denominado "de tipo sándwich" entre el anticuerpo unido 12, el antígeno 11 y el anticuerpo marcado 13. Se añade un exceso de anticuerpo marcado 13 de modo que todo el antígeno unido 11 forma un complejo de tipo sándwich. Por lo tanto, la muestra contiene el antígeno marcado unido 13a y el antígeno marcado sin unir 13b libre en solución.

20 Durante o después de la formación del complejo de tipo sándwich, la muestra se irradia usando una serie de pulsos de radiación electromagnética, tal como luz. El tiempo de retardo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica por el transductor 3 es detectada por un detector. El tiempo de retardo apropiado se selecciona para medir solamente la energía (calor) generada por el antígeno marcado unido 13a. Ya que el tiempo de retardo es una función de la distancia de la marca desde el transductor 3, el anticuerpo marcado unido 13a se puede distinguir del antígeno marcado unido 13b. Esto proporciona una ventaja significativa sobre el inmunoensayo de tipo sándwich convencional por que se elimina la necesidad de etapas de lavado. En un inmunoensayo de tipo sándwich convencional, el anticuerpo marcado sin unir se debe separar del anticuerpo marcado unido antes de tomar cualquier medida ya que el antígeno marcado sin unir interfiere con la señal generada por el antígeno marcado unido. Sin embargo, a causa del "perfil de profundidad" proporcionado por la presente invención, se puede distinguir el antígeno marcado unido y sin unir. En efecto, la capacidad para distinguir entre sustancias proximales al transductor y las sustancias en la solución a granel es una ventaja particular de la presente invención.

35 El anticuerpo marcado se marca preferentemente con una marca seleccionada entre una molécula de colorante, una partícula de oro, una partícula de polímero coloreado (por ejemplo, una partícula de látex coloreado), una molécula fluorescente, una enzima, un glóbulo rojo, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética y una partícula de carbono. Sin embargo, cualquier marca capaz de interactuar con la radiación electromagnética para generar calor sería aceptable. En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es radiación de radiofrecuencia. Todas las otras marcas que se han mencionado anteriormente en el presente documento usan luz. En el caso de una partícula de oro, la marca se mejora usando una solución de iones de plata y un agente reductor. El oro cataliza/activa la reducción de los iones de plata a plata metálica y es la plata metálica la que absorbe la luz. Todas estas marcas son convencionales.

45 El anticuerpo marcado, o de hecho uno cualquiera o más reactivos adicionales se almacenan preferentemente en una cámara incorporada en el dispositivo de la presente invención.

50 El antígeno es típicamente una proteína, tal como una hormona a base de proteínas, aunque se pueden detectar moléculas más pequeñas, tales como fármacos. El antígeno también puede formar parte de una partícula más grande, tal como un virus, una bacteria, una célula (por ejemplo un glóbulo rojo) o un prion.

55 Como un ejemplo adicional de los inmunoensayos conocidos, la presente invención se puede aplicar a ensayos competitivos en los que la señal eléctrica detectada por el detector es inversamente proporcional a la presencia de un antígeno sin marcar en la muestra. En este caso, lo que es de interés es la cantidad de antígeno sin marcar en la muestra.

60 En un inmunoensayo competitivo, un anticuerpo se une al transductor como se muestra en la Figura 2. A continuación se añade una muestra que contiene el antígeno. Sin embargo, en lugar de añadir un anticuerpo marcado, se añade a la solución una cantidad conocida de antígeno marcado. Los antígenos marcados y sin marcar después compiten por la unión a los anticuerpos unidos al transductor 3. La concentración del antígeno marcado unido después es inversamente proporcional a la concentración de antígeno sin marcar unido y por lo tanto, ya que se conoce la cantidad de antígeno marcado, se puede calcular la cantidad de antígeno sin marcar en la solución inicial. También se pueden usar con los antígenos los mismos niveles especificados con referencia a los anticuerpos.

65

En una realización de la presente invención, el analito que se está detectando está presente en una muestra de sangre entera. En muchos ensayos convencionales, la presencia de otros componentes de la sangre en solución o en suspensión, tal como glóbulos rojos, interfiere con la detección del analito de interés en particular. Sin embargo, en el dispositivo de la presente invención, ya que la señal solamente se determina a una distancia conocida desde el transductor 3, los otros componentes de la sangre que están libres en solución o en suspensión no interfieren con la detección. Esto simplifica el análisis de una muestra de sangre ya que no es necesaria una etapa de separación separada. Un aparato para medir los niveles de analito en una muestra de sangre comprende preferentemente un lector portátil transportable y un dispositivo desechable que contiene la película piezoeléctrica. Se obtiene una pequeña muestra de sangre (aproximadamente 10 microlitros) y se transfiere a una cámara dentro del dispositivo desechable. Un lado de la cámara está fabricado con la película piezoeléctrica revestida con un anticuerpo capaz de unirse al analito de interés. A continuación se puede añadir una solución adicional que contiene, por ejemplo, anticuerpo marcado o una concentración conocida de antígeno marcado como se ha descrito anteriormente. Se permite que la reacción transcurra y el dispositivo desechable se inserta a continuación en el lector que activa el proceso de medida. Los resultados del ensayo se indican a continuación en una pantalla en el lector. El dispositivo desechable que contiene la película piezoeléctrica se retira a continuación y se desecha.

Una fuente potencial de interferencias de fondo es la sedimentación de partículas suspendidas sobre la superficie del transductor piroeléctrico o piezoeléctrico. Por ejemplo, esto podría ocurrir en algunos dispositivos que usan la generación de partículas de plata. Esta fuente de interferencia se puede evitar mediante la colocación del transductor por encima de la solución a granel, por ejemplo, en la superficie superior de la cámara de reacción. Por lo tanto, si se produce alguna sedimentación, no interferirá con el transductor. Como alternativa, las partículas podrían ser menos densas que el medio y por lo tanto flotar a la superficie de la solución a granel en lugar de sedimentar sobre la superficie del transductor. Esta y otras modificaciones están incluidas en el alcance de la presente invención.

El dispositivo de la presente invención no está limitado solamente a la detección de un analito en solución. Ya que el dispositivo proporciona "perfil de profundidad", se pueden detectar diferentes analitos usando reactivos que se unen selectivamente a cada analito que se está detectando donde los reactivos están a diferentes distancias desde la superficie del transductor 3. Por ejemplo, se pueden detectar dos analitos usando dos reactivos, estando el primer reactivo colocado a una primera distancia desde la película y estando el segundo reactivo colocado a una segunda distancia desde la película. El tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética y la generación de señal eléctrica serán diferentes para los dos analitos unidos al primer y el segundo reactivos.

Además de proporcionar diferentes profundidades, se pueden realizar ensayos múltiples usando diferentes tipos de reactivos, por ejemplo, diferentes anticuerpos, en partes diferentes del transductor. Como alternativa, o además, se pueden realizar ensayos múltiples usando reactivos/analitos que responden a diferentes longitudes de onda de la radiación electromagnética.

La sustancia que genera la energía, típicamente calor, puede estar en la superficie de la película, sin embargo, la sustancia está preferentemente a al menos 5 nm de la superficie de la película y, preferentemente, la sustancia no está a más de 500 μm de la superficie de la película.

Como alternativas a las reacciones anticuerpo-antígeno, el reactivo y el analito pueden ser un primer y segundo ácido nucleico donde el primer y el segundo ácidos nucleicos son complementarios, o un reactivo que contiene avidina o derivados de la misma y un analito que contiene biotina o derivados de la misma, o viceversa. El sistema tampoco está limitado a ensayos biológicos y se puede aplicar, por ejemplo, a la detección de metales pesados en agua.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el solicitante ha encontrado que el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética en la generación de una señal eléctrica en el transductor es proporcional a la distancia de la sustancia desde la película. Además, el solicitante ha encontrado que el tiempo de retardo depende de la naturaleza del medio en sí mismo. Inicialmente, era sorprendente que un medio líquido no amortiguara totalmente la señal. Sin embargo, el solicitante ha encontrado que los cambios en la naturaleza del medio pueden alterar el tiempo de retardo (es decir, hasta que se alcanza la señal máxima), la magnitud de la señal y de la forma de la onda de la señal, (es decir, la variación de la respuesta con el tiempo).

Estos cambios en la naturaleza se pueden deber, entre otras cosas, a variaciones en el espesor del medio, la elasticidad del medio, la dureza del medio, la densidad del medio, la deformabilidad del medio, la capacidad de calor del medio o la velocidad a la que las ondas del sonido/choque se pueden propagar a través del medio.

Ejemplos

Un fluoruro de polivinilideno polarizado biformo, revestido en óxido de indio y estaño, se usó como el dispositivo de detección en los ejemplos que siguen a continuación.

En los Ejemplos 1-4 y en los Ejemplos Comparativos 1-3, el dispositivo de detección se revistió por inmersión en una solución de poliestireno para dar una capa de poliestireno en la parte superior del óxido de indio y estaño. "Arandelas" circulares de poliestireno con un diámetro interno de 5 mm y una altura de 5 mm se unieron a la superficie de poliestireno (usando un adhesivo sensible a la presión) para formar pocillos de reacción, que podrían contener los líquidos eficazmente por encima de la superficie del dispositivo de detección. Los pocillos presentan un volumen total de hasta 100 μ l de líquido. Las arandelas de poliestireno se habían tratado con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) y Tween (RTM) 20 (monolaurato de sorbitán polioxietileno) para evitar la unión no específica de moléculas de proteína a las paredes del pocillo de reacción.

10 Ejemplo 1

La Figura 4 muestra los resultados de dos experimentos de prueba de principio que detectan la presencia de (a) un anticuerpo marcado unido a una película piezoeléctrica y (b) un anticuerpo marcado en solución. Los dos experimentos se realizaron en pocillos de reacción sobre la superficie de la película piezoeléctrica revestida con poliestireno. En el primer experimento (a) se añadieron al pocillo de reacción 50 μ l de solución de antiperoxidasa de rábano picante marcada con oro (HRP) (5 μ g / ml, 250 ng en total) en tampón de fosfato (pH 7,2, 100 mM) y se incubó durante 1 hora, después se enjuagó y se secó. En el segundo experimento (b) la superficie de la película de poliestireno se bloqueó por incubación con una solución de albúmina de suero bovino (1%) y Tween (RTM) 20 (0,5%), después se enjuagó y se secó.

Se añadieron 50 μ l de solución de potenciador de plata mezclada previamente (Sigma SE-100) al primer pocillo de reacción para iniciar la reacción de potenciación. Se añadieron 50 μ l de solución de potenciador de plata mezclada previamente que contenía 250 ng de anti-HRP marcado con oro al segundo pocillo para iniciar la reacción de potenciación.

Los pocillos se irradiaron a continuación con luz picada de longitud de onda de 654 nm con una frecuencia de conmutación de 10 Hz. Se midió la magnitud de la señal máxima detectada por la película piezoeléctrica a una correlación de retardo de alrededor de 10-15 ms. La señal se mostró en un convertidor analógico a digital. La Figura 4 muestra los resultados de estas reacciones de potenciación. El eje y muestra la señal recibida por el detector, denominada "Valor de la lectura (recuentos de ADC)" y el eje x muestra el tiempo en segundos.

En el primer experimento (a), la anti-HRP marcada con oro unida a la superficie media la reacción entre los iones de plata y el agente reductor en la superficie de la película, lo que lleva a la deposición de plata metálica sobre la superficie del transductor. En el segundo experimento (b), la anti-HRP marcada con oro en solución media la reacción entre los iones de plata y el agente reductor en solución, lo que lleva a la precipitación de partículas de plata. El perfil cinético de estas reacciones se puede controlar con el tiempo, con medidas tomadas cada 10 segundos. Ya que la solución a granel está a una distancia mayor desde la película piezoeléctrica que la marca unida, se detecta poca o ninguna señal a una correlación de retardo de alrededor 10-15 ms. Las cantidades de anti-HRP usada garantizan que la cantidad de anti-HRP sobre la superficie en el primer experimento (a) debe ser igual a o inferior a la cantidad de anti-HRP en solución en el segundo experimento (b).

Por otro lado, si se detecta una señal a una correlación de retardo de aproximadamente 50-60 ms, la señal para el anticuerpo en la solución a granel se mediría en lugar del anticuerpo unido sobre la superficie del transductor, aunque debido a la amortiguación de la señal por el medio, la fuerza de la señal se puede reducir.

45 Ejemplo 2

30 μ l de una dilución a 1:30 en tampón de fosfato 100 mM, de inmunoglobulina G de conejo conjugada con antiperoxidasa de rábano picante (HRP) a pH 7,2 (Sigma, N° de cat. P7899) (IgG) se incubaron en el pocillo de reacción durante una hora a temperatura ambiente para permitir la adsorción de anticuerpos sobre la superficie del poliestireno. La solución después se aclaró y se trató con albúmina de suero bovino (1%) y Tween (RTM) 20 (0,05%) en un tampón de fosfato (30 μ l) para bloquear cualquier sitio de adsorción restante en la superficie de poliestireno. El pocillo se aclaró con agua desionizada y se secó. A continuación se añadieron al pocillo de reacción 30 μ l de solución de peroxidasa de rábano picante (125 μ g/ml en tampón de fosfato 100 mM) y se incubó durante 1 hora y después se aclaró. Se añadieron 30 μ l de antiperoxidasa de rábano picante de cabra marcada con oro (Fab')₂ (British Biocell) (dilución a 1:10 en tampón de fosfato 100 mM) durante una hora a temperatura ambiente. El pocillo se aclaró a continuación con agua desionizada. A continuación se añadió al pocillo de reacción solución de potenciador de plata (Sigma SE-100, que consistía en 20 μ l de solución A y 20 μ l de solución B, que se mezclaron previamente, inmediatamente antes de su uso) y se controló el desarrollo de la mancha de plata metálica sobre la superficie del sensor por iluminación de la película del sensor usando luz picada (10 Hz) a partir de un LED de luz azul de alta energía (que emite a 470 nm). Se genera un voltaje a través del sensor que se mide usando un amplificador síncrono, que después se convierte en una señal digital arbitraria y se almacena en un PC.

Ejemplo comparativo 1

La reacción se realizó exactamente como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior, excepto en que se omitió la etapa inicial de adsorción de anti-HRP de conejo sobre la superficie del sensor.

Ejemplo comparativo 2

La reacción se realizó exactamente como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior, excepto en que se omitió la etapa de incubación con peroxidasa de rábano picante.

Ejemplo comparativo 3

La reacción se realizó exactamente como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, excepto en que se omitió la etapa de incubación con el anticuerpo antiperoxidasa de rábano picante de cabra (Fab')₂ marcado con oro.

La Figura 5 muestra los resultados del Ejemplo 2 y de los Ejemplos Comparativos 1 a 3 (4 ejecuciones de cada uno). Las cuatro series de datos que dan lugar a una rápida señal se deben al sándwich de anti-HRP de conejo/HRP/anti-HRP de cabra marcado con oro sobre la superficie del sensor (Ejemplo 2). Todas las demás series de datos se deben a reacciones de control (Ejemplos Comparativos 1 a 3).

Ejemplo 3

Inmunoglobulina G de conejo conjugada con antiperoxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, N° de cat. P7899) (IgG) (30 µl de una dilución a 1:30 en tampón de fosfato 100 mM, pH 7,2) se incubó en dos pocillos de reacción durante una hora a temperatura ambiente para permitir la adsorción de anticuerpos sobre la superficie del poliestireno. La solución después se aclaró y se trató con albúmina de suero bovino (1%) y Tween (RTM) 20 (0,05%) en un tampón de fosfato (30 µl) para bloquear cualquier sitio de adsorción restante en la superficie de poliestireno. Los pocillos se aclararon con agua desionizada y se secaron. 10 µl de solución de peroxidasa de rábano picante (125 µg/ml en tampón de fosfato 100 mM) se añadieron a continuación al pocillo de reacción 1, mientras que sólo se añadieron 10 µl de tampón de fosfato al pocillo de reacción 2. Estos se dejaron incubar durante 15 minutos, a continuación se añadieron 30 µl de antiperoxidasa de rábano picante (Fab')₂ de cabra marcada con oro (British Biocell) (dilución a 1:10 en tampón de fosfato 100 mM) tanto al pocillo 1 como al 2 durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de potenciador de plata (Sigma SE-100, que consiste en 20 µl de solución A y 20 µl de solución B, que se mezclaron previamente, inmediatamente antes de su uso) se añadió a continuación a ambos pocillos de reacción y se controló el desarrollo de la mancha de plata metálica sobre la superficie del sensor usando la técnica que se ha descrito anteriormente.

La presencia de HRP en el pocillo 1 como un modelo de analito, permite la formación de un complejo de tipo sándwich sobre la superficie del transductor (anti-HRP de conejo / HRP / anti-HRP de cabra marcado con oro), localizando de este modo algunas de las marcas de oro sobre la superficie en el pocillo 1. La ausencia de HRP en el pocillo 2 significa que el anticuerpo de cabra marcado con oro permanece en solución en el pocillo 2.

El desarrollo de la señal con el tiempo para los pocillos 1 y 2 fue similar a la que se presenta en la Figura 4, que ilustra que la detección del analito puede tener lugar sin etapas de lavado.

Ejemplo 4

Se realizaron una serie de experimentos exactamente como se ha descrito en el Ejemplo 2, usando anti-IgG HRP de conejo adsorbida sobre la superficie del transductor como el anticuerpo de captura, HRP como el analito diana y anti-IgG HRP de cabra marcada con oro como el anticuerpo indicado. Se usaron cinco concentraciones diferentes de HRP (100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml y 1 pg/ml). Estas correspondían con las cantidades totales de HRP iguales a 3 ng, 300 pg, 30 pg, 3 pg y 30 fg. La etapa de potenciación de plata se realizó como se ha descrito anteriormente. La Figura 6 muestra que la señal es dependiente de la cantidad de analito usado en la reacción.

Ejemplo 5

En este ejemplo, que no forma parte de la invención pero que representa la técnica 4 de fondo que es útil para la comprensión de la invención, el transductor está revestido con una capa de silicona. La señal detectada por el transductor depende tanto del espesor como de la elasticidad de la capa de silicona. Las capas de silicona se prepararon con espesores variables, con manchas de colorante de Negro Sudán B colocadas encima las capas de silicona mediante la adición de una solución de colorante (en etanol) mediante una pipeta. Se usaron tres espesores de capa diferentes (200, 133 y 79 µm) y se usaron tres cantidades totales distintas de colorante (mediante la adición de 0,1, 1,0 o 2,5 µl de 10 mmol dm⁻³ de solución de colorante), produciendo un total de nueve medidas. La Figura 7 muestra que la señal aumenta significativamente a medida que el espesor de la capa disminuye (para las tres cantidades de colorante) donde el retardo de correlación es de 10 ms.

Además, el espesor de la capa de silicona que interviene afecta al tiempo necesario para que la señal alcance un máximo (es decir, el retardo de correlación). Esto se ilustra en la Figura 8, donde el espesor de una capa de silicona intermedia entre una mancha de colorante y el transductor se varió entre 100 y 500 μm . El eje y proporciona los recuentos (en miles), mientras que el eje x proporciona el retardo de correlación (retardo de correlación 1 = 5 ms, 2 = 10 ms, 3 = 15 ms, etc). La señal más alta se observa para una capa de silicona de 100 μm con una correlación de retardo de 15 ms para alcanzar este máximo. A medida que el espesor de la capa de silicona aumenta se observa que la señal disminuye, y al mismo tiempo, el tiempo necesario para alcanzar el máximo también aumenta, a 50 ms con un espesor de la capa de silicona de 500 μm .

10

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (1) para detectar la energía generada mediante la desintegración no radiativa en un analito o un complejo o derivado del analito (2, 11) al irradiar con radiación electromagnética que comprende
5 una fuente de radiación (6) adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética, un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico (3) y electrodos (4, 5) que es capaz de transducir la energía generada por el analito o un complejo o derivado del analito (2, 11) en una señal eléctrica, al menos un reactivo (2, 12) proximal a la superficie del transductor (3); teniendo el reactivo (2, 12) un sitio de unión que es capaz de unirse con el analito o el complejo o el derivado del analito (2, 11),
10 un pocillo (9) para contener un líquido (10) que tiene el analito o un complejo o derivado del analito (2, 11) disuelto o suspendido en el mismo en contacto con el transductor (3), un detector (7) que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor (3), y un controlador (8) para controlar la fuente de luz (6) y el detector (7),
15 donde el detector (7) está adaptado para determinar el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación (6) y la generación de la señal eléctrica y donde el detector (7) está colocado para detectar solamente la señal eléctrica generada por el transductor (3) hasta un tiempo de retardo seleccionado para distinguir la concentración del analito o de un complejo o derivado del analito (2, 11) a diferentes distancias desde la superficie del transductor (3).
2. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 1, donde el reactivo es un anticuerpo (12) y el analito es un antígeno (11).
3. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 2, donde el complejo o derivado del analito (2, 11) es un complejo con un anticuerpo marcado (13a).
- 25 4. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 2, donde el analito (2, 11) es un antígeno marcado y la señal eléctrica detectada por el detector (7) es inversamente proporcional a la presencia de un antígeno sin marcar en la muestra.
- 30 5. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 3 o 4, donde el anticuerpo marcado (13a, 13b) o el antígeno está marcado con una marca seleccionada entre una molécula de colorante, una partícula de oro, una partícula de polímero coloreado, una molécula fluorescente, una enzima, un glóbulo rojo, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética y una partícula de carbono.
- 35 6. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 1, donde el reactivo (2, 12) es un primer ácido nucleico y el analito (2, 11) es un segundo ácido nucleico y el primer y el segundo ácidos nucleicos son complementarios.
7. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 1, donde el reactivo (2,12) contiene avidina o derivados de la misma y el analito (2,11) contiene biotina o derivados de la misma, o viceversa.
- 40 8. Un dispositivo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, donde el tiempo de retardo es de al menos 5 milisegundos, preferentemente de al menos 10 milisegundos.
9. Un dispositivo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, donde la radiación electromagnética es luz, preferentemente luz visible.
- 45 10. Un dispositivo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, donde el reactivo (2,12) es adsorbido sobre el transductor (3).
- 50 11. Un dispositivo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente una cámara para almacenar uno o más reactivos adicionales.
12. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 11, donde el reactivo adicional es un anticuerpo marcado para producir el complejo o derivado del analito formado posteriormente.
- 55 13. Un dispositivo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, donde la frecuencia de los pulsos de la radiación electromagnética es 2-50 Hz.
- 60 14. Un método para detectar un analito o un complejo o derivado del analito (2, 11) disuelto o suspendido en una muestra líquida, que comprende las etapas de exponer la muestra líquida a un transductor (3) que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos (4, 5) que es capaz de transducir un cambio de energía a una señal eléctrica, teniendo la superficie del transductor (3) al menos un reactivo (2, 12) proximal al mismo, teniendo el reactivo (2, 12) un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o a un complejo o derivado del analito (2, 11), el analito o el complejo o el derivado del analito (2, 11) siendo capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación (6) para generar energía mediante desintegración no radiativa;
65 irradiar el reactivo (2, 12) con una serie de pulsos de radiación electromagnética,

- transducir la energía generada en una señal eléctrica;
 detectar la señal eléctrica y el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación (6) y la generación de la señal eléctrica, donde el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica corresponde a la posición del analito o de un complejo o derivado del analito (2, 11) en cualquiera de una o más posiciones a distancias diferentes desde la superficie del transductor (3) y donde el tiempo de retardo está seleccionado para distinguir la concentración del analito o de un complejo o derivado del analito (2, 11) a diferentes distancias desde la superficie del transductor (3).
- 5
15. Un método como se reivindica en la reivindicación 14, donde el reactivo es un anticuerpo (12) y el analito es un antígeno (11).
- 10
16. Un método como se reivindica en la reivindicación 15, donde el complejo o el derivado del analito (2, 11) es un complejo con un anticuerpo marcado (13a).
- 15
17. Un método como se reivindica en la reivindicación 15, donde el analito (2, 11) es un antígeno marcado y la señal eléctrica detectada por el detector (7) es inversamente proporcional a la presencia de un antígeno sin marcar en la muestra.
- 20
18. Un método como se reivindica en la reivindicación 16 o 17, donde el anticuerpo marcado (13a, 13b) o el antígeno está marcado con una marca seleccionada entre una molécula de colorante, una partícula de oro, una partícula de polímero coloreado, una molécula fluorescente, una enzima, un glóbulo rojo, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética y una partícula de carbono.
- 25
19. Un método como se reivindica en la reivindicación 14, donde el reactivo (2, 12) es un primer ácido nucleico y el analito es un segundo ácido nucleico y el primer y el segundo ácidos nucleicos son complementarios.
20. Un método como se reivindica en la reivindicación 14, donde el reactivo (2, 12) contiene avidina o derivados de la misma y el analito contiene biotina o derivados de la misma, o viceversa.
- 30
21. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde el método se realiza sin retirar la muestra del transductor (3) entre las etapas de exponer la muestra al transductor (3) e irradiar el reactivo.
- 35
22. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde la frecuencia de los pulsos de radiación electromagnética es 2-50 Hz.

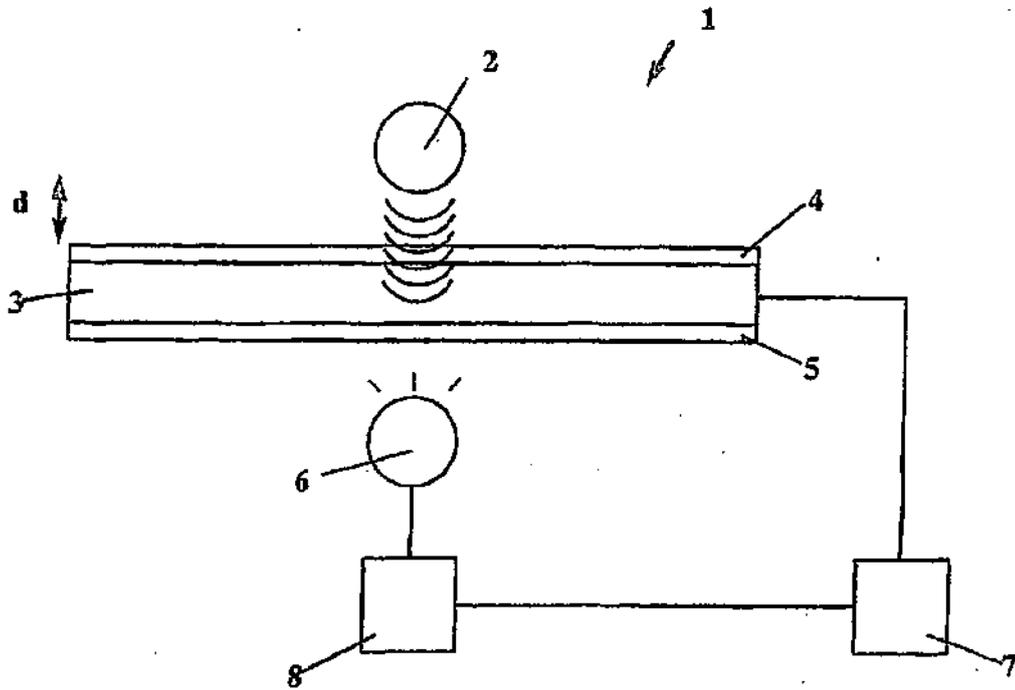


Fig. 1

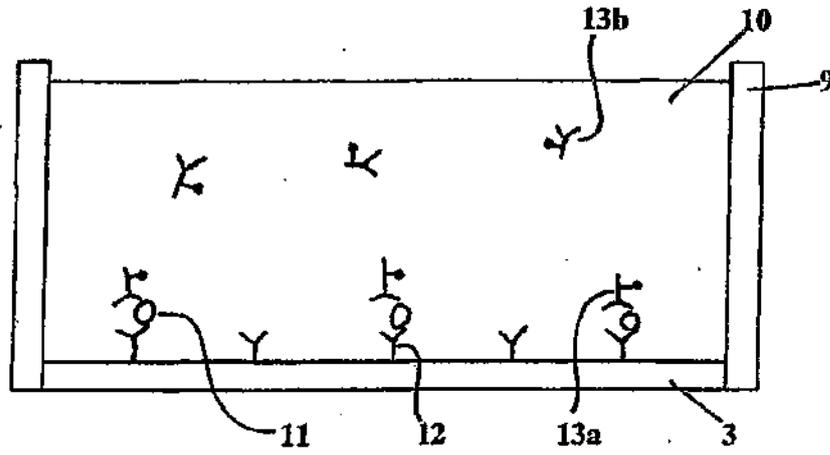


Fig. 2

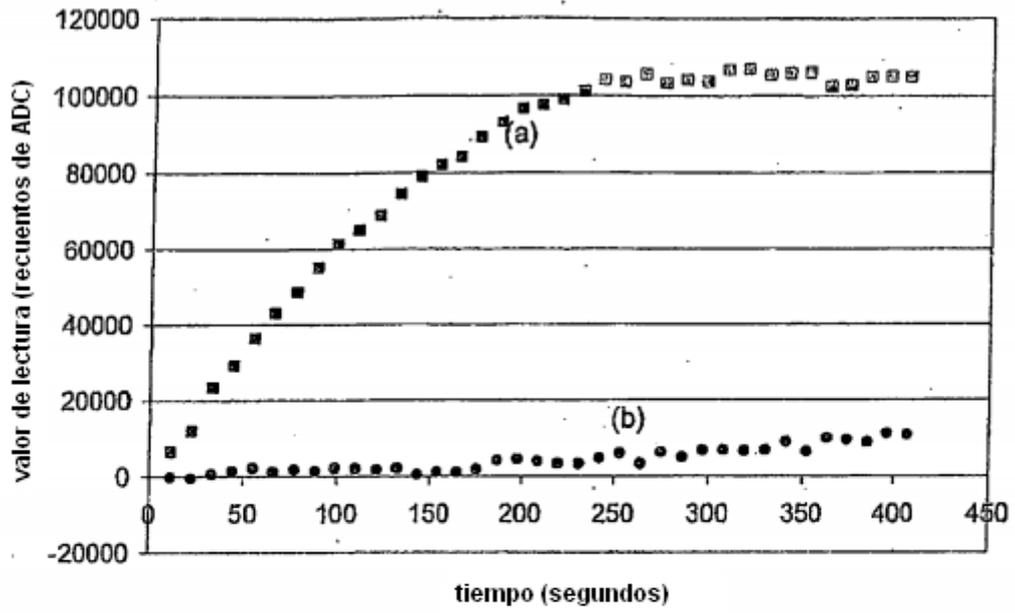


Fig. 3

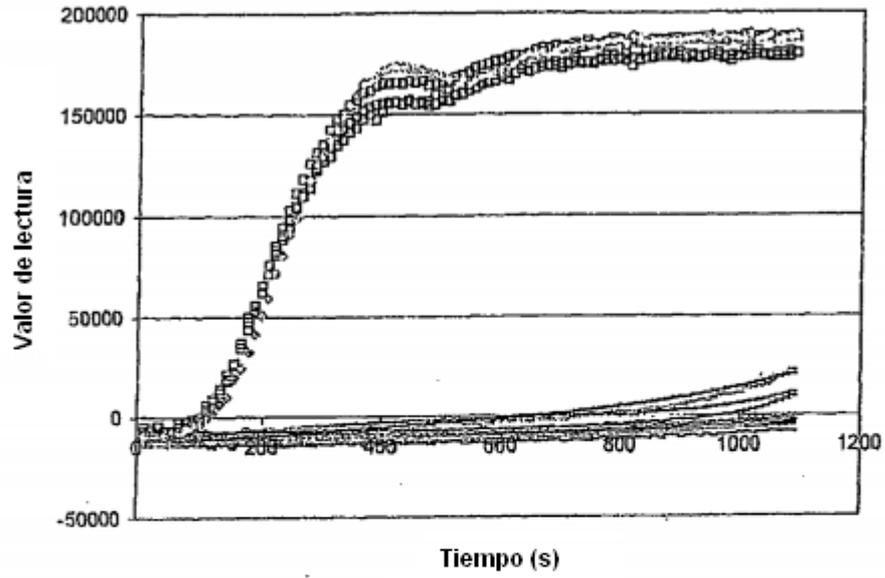


Fig. 4

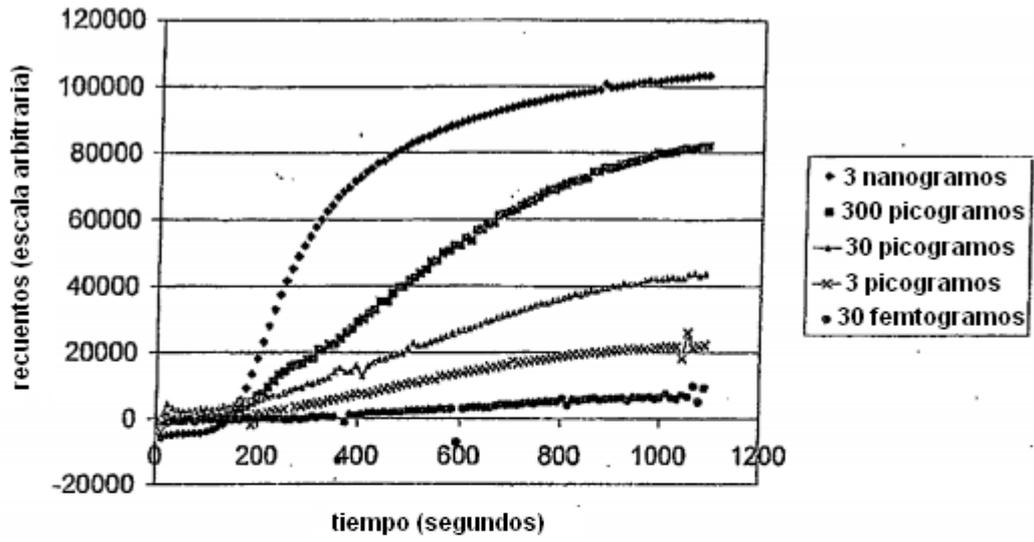


Fig. 5

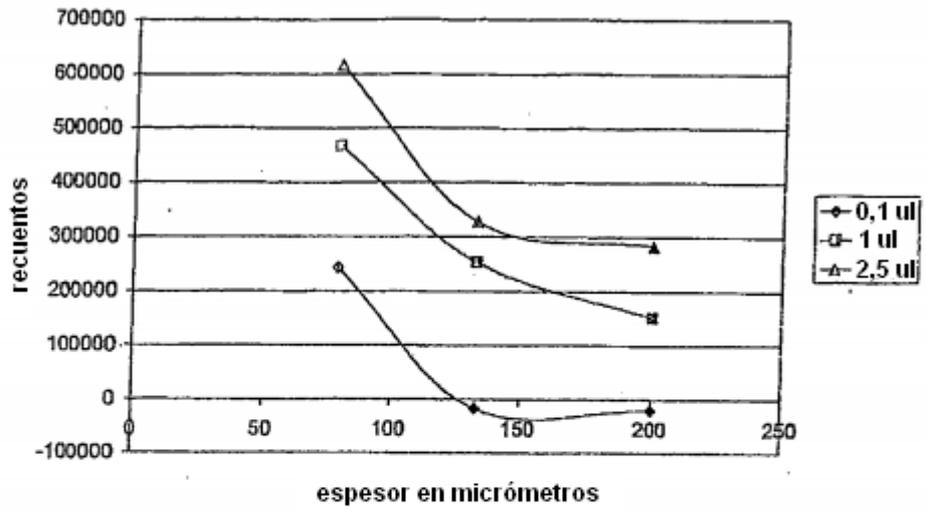


Fig. 6

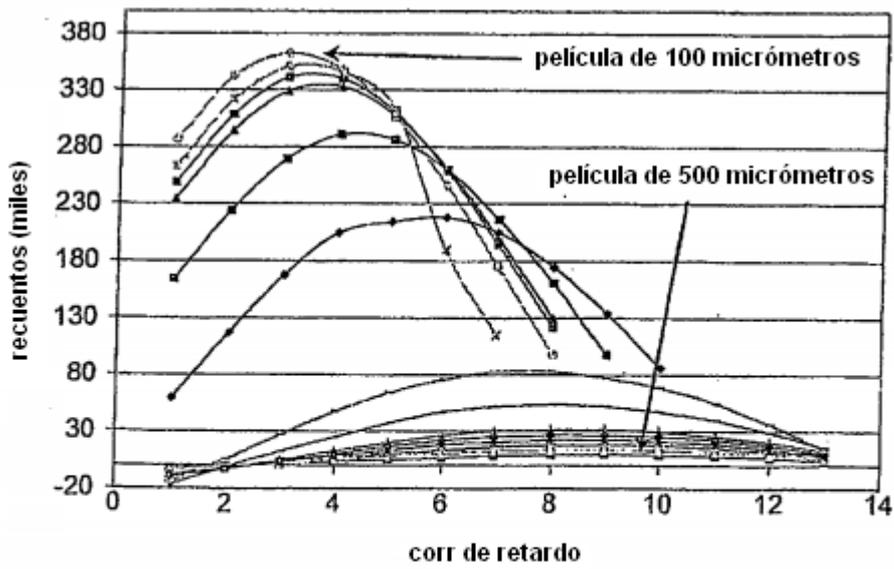


Fig. 7