

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 673**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2008 E 08788670 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2185932**

54 Título: **Sensor**

30 Prioridad:

31.08.2007 GB 0716968
31.08.2007 US 969309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2015

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:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

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

ES 2 530 673 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

Sensor.

5 La presente invención se refiere a un sensor y en particular a un sensor y un método para usar un sensor para realizar un ensayo de unión.

10 En un ensayo de unión, tal como un inmunoensayo, se hace uso de la interacción específica de "llave y cerradura" entre el analito (frecuentemente una proteína o hapteno) y una porción de unión (tal como un anticuerpo) dirigida específicamente contra todo o parte (un epítipo) del antígeno (el analito). La unión entre el analito y el anticuerpo es específica, que minimiza las interacciones con las especies relacionadas pero no idénticas, y fuerte, que da buena sensibilidad. Con el objetivo de cuantificar el analito desconocido, una cantidad determinada ya sea del analito marcado con un marcador característico (por ejemplo, una molécula fluorescente o quimioluminiscente) o un segundo anticuerpo (el "reportero") marcado similarmente, se mezcla con la muestra. Las especies marcadas, presentes en exceso, se unirán después al analito y alcanzan finalmente un equilibrio en el cual la mayor parte del analito se asocia con al menos un marcador. Dado que la concentración del marcador es fija, con el objetivo de cuantificar el analito, la parte asociada con el analito (la fracción "unida") debe separarse físicamente de la no asociada (la fracción "libre"). Cualquier fracción puede cuantificarse después, la "unida" que es directamente proporcional y la "libre" que es inversamente proporcional a la concentración del analito. Normalmente, la separación de las fracciones "unida" y "libre" se lleva a cabo mediante el uso de un segundo anticuerpo (el anticuerpo de "captura"), dirigido contra un epítipo diferente en el analito, unido a una fase sólida tal como una superficie de perla o sólida. Esta superficie de perla o sólida puede separarse después físicamente de la solución en masa y realizar la medición, por ejemplo, mediante el uso de un fluorímetro si el marcador es una molécula fluorescente. Varias diferentes formas de interacciones de unión además de las interacciones anticuerpo/antígeno pueden utilizarse en los ensayos de unión, que incluyen pero sin limitarse a las interacciones ADN/ADN, ARN/ARN y de aptámeros. Las modalidades alternativas de tales ensayos se conocen, tales como los ensayos "competitivos", donde el analito se mezcla con una cantidad conocida del analito marcado y los dos compiten después por los sitios activos. La medida del analito marcado unido es entonces inversamente proporcional a la cantidad de analito no marcado en la muestra original.

30 Una manera única de distinguir entre la fracción marcada "unida" y la fracción marcada "libre" sin tener que realizar las etapas de separación y lavado es la descrita en WO 2004/090512, en la cual la fase sólida que incorpora el anticuerpo de captura es una película piezoeléctrica o piroeléctrica, por lo general PVDF. Esta tiene la capacidad única de combinar la función de separación de la fase sólida junto con la técnica de medición. Como se describe en WO 2004/090512 el anticuerpo "reportero" marcado (marcado con un material coloreado adecuado tal como carbono u oro coloidal) se une a la superficie de captura a una velocidad proporcional a la concentración del analito que se mide; esta unión se monitorea simultáneamente mediante la irradiación de la superficie con luz de un color complementario. La energía luminosa se absorbe por el marcador en la superficie y se transfiere mediante desintegración no radiactiva como calor, que se detecta por la película de PVDF. Un beneficio simultáneo de este sistema es que la energía absorbida de manera similar por el marcador no unido en la solución en masa se pierde en el medio líquido sin detectarse por la película de PVDF que efectúa así automáticamente una "separación" entre las fracciones "unida" y "libre". Es conveniente usar una partícula coloidal de suficiente tamaño para permitir que un número significativo de fotones se absorba por la partícula para dar una señal fuerte y por lo tanto buena sensibilidad.

45 El sensor descrito en WO 2004/090512 se usa para monitorear en tiempo real la cinética de unión del marcador a la superficie de captura, la cual es proporcional a la concentración del analito. Este método depende de la velocidad de difusión de las especies marcadas hacia la superficie y la velocidad de unión en la superficie. Si cualquiera de estas velocidades es subóptima, pueden limitarse la sensibilidad total o el tiempo de reacción del ensayo. La velocidad de unión en la superficie puede limitarse por un número de factores, tal como el impedimento estérico entre el anticuerpo marcado (por ejemplo, si una partícula grande de carbono o de oro se usa como el marcador). Adicionalmente, puede existir repulsión electrostática que puede inhibir el acercamiento de una partícula grande (20-500 nm) a una superficie sólida, o pueden existir efectos de orientación donde la partícula se acerca a la fase sólida pero la superficie de unión en la partícula se orienta en la dirección incorrecta para que tenga lugar la unión. Esto es más probable que ocurra con partículas grandes recubiertas de muchos anticuerpos, con sólo una pequeña fracción de estos anticuerpos que se unen al analito, de manera que sólo pequeñas partes del área de la superficie de la partícula están disponibles para unirse a la superficie. Además de estos factores limitantes sobre la velocidad de unión, también existen otros factores que pueden limitar el tamaño de la partícula usada en una prueba de inmunoensayo. Por ejemplo, en las pruebas de tiras inmunocromatográficas de "flujo lateral" convencionales, el tamaño óptimo de la partícula coloidal de oro es de aproximadamente 40 nm, debido a que las partículas más grandes tienden a quedar atrapadas en la membrana de flujo debido a su tamaño y densidad. Finalmente, las partículas más grandes tienen menores velocidades de difusión y así requieren de más tiempo para difundir hacia la superficie de captura, y posiblemente limitan así la señal disponible.

60 Aún queda una necesidad en la técnica, por lo tanto, de mejoras adicionales en la sensibilidad de tales ensayos.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

exponer la muestra a un transductor que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica y que comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, el transductor que comprende fluoruro de polivinilideno y óxido de indio y estaño, el transductor que tiene, además, al menos un reactivo cautivo sobre o proximal al mismo, al menos el único reactivo cautivo que tiene un sitio activo que es capaz de unirse al analito;

introducir un reactivo marcado en la muestra, en donde el reactivo marcado contiene un sitio activo para el analito o el reactivo cautivo y un marcador que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiactiva, en donde el marcador se selecciona de una partícula metálica, una partícula polimérica coloreada, una partícula magnética, una partícula de carbono y una nanopartícula que comprende un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica;

permitir que el reactivo marcado se una al analito o al agente cautivo en un primer periodo en el cual el transductor se orienta de manera que se provoca que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor;

posteriormente, en un segundo periodo, provocar que el reactivo marcado se desprenda mediante la inversión del transductor con respecto a la muestra o invertir parcialmente el transductor con respecto a la muestra de manera que se provoca que el reactivo marcado se separe de la superficie del transductor;

irradiar la muestra con radiación electromagnética durante el primero y el segundo periodos,

transformar la energía generada en una señal eléctrica;

detectar la señal eléctrica.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos, en los cuales:

La Fig. 1 muestra un dispositivo de acuerdo con WO 2004/090512;

La Fig. 2 muestra una representación esquemática del método de la presente invención;

La Fig. 3 muestra un dispositivo para su uso en la presente invención; y

La Fig. 4 muestra un gráfico de conteos contra el tiempo, que usa el método de la presente invención.

Se ha encontrado que cuando el transductor se invierte o se invierte parcialmente, se desprende cualquier "reportero" marcado sin unir a la superficie mediante la interacción específica. Así, el marcador en la proximidad inmediata al transductor generará una señal fuerte cuando se irradie adecuadamente mientras que el marcador distal a la superficie genera una señal débil o insignificante. Existen varias ventajas para tal sistema, específicamente que todo el marcador puede concentrarse cerca de la superficie de unión, y aumentar así la velocidad de unión de las partículas a la superficie. Adicionalmente, dirigir las partículas hacia la superficie bajo la fuerza de gravedad o de flotación puede ayudar a superar cualquier fuerza de repulsión electrostática en la superficie si la partícula y la superficie tienen cargas del mismo signo.

El método de la presente invención usa un sensor del tipo descrito en WO 90/13017 o WO 2004/090512. La Fig. 1 que se reproduce en la presente se corresponde con la Fig. 1 en WO 2004/090512.

Como se explica en WO 2004/090512, la Fig. 1 muestra un dispositivo detector químico 1 del tipo usado con la presente invención. El dispositivo 1 depende de la generación de calor en una sustancia 2 al irradiar la sustancia 2 con radiación electromagnética. (La sustancia 2 usada en la presente invención es en realidad un reactivo marcado sobre o proximal al transductor 3 el cual se discute en más detalle más adelante en la presente.) El dispositivo 1 comprende un transductor, que es un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico 3 que tiene los recubrimientos de electrodo 4, 5. Una sustancia 2 se mantiene sobre o proximal al transductor 3 mediante el uso de cualquier técnica adecuada. La sustancia 2 puede estar en cualquier forma adecuada y puede depositarse una pluralidad de sustancias. Preferentemente, la sustancia 2 se adsorbe en el transductor y en particular en el electrodo superior, por ejemplo, acoplado covalentemente o unido por medio de fuerzas intermoleculares tal como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waal. La sustancia 2 genera calor cuando se irradia por 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 experimenta después desintegración no radiactiva y de ese modo genera energía, indicada por las líneas curvas en la Fig. 1. Esta energía es principalmente en forma de calor (es decir, movimiento térmico en el ambiente) aunque también pueden generarse otras formas de energía, por ejemplo, una onda de choque. La energía, sin embargo, se detecta por el transductor y se convierte en una señal eléctrica. Como se describe en WO 2004/090512, la señal procedente del transductor 3 dependerá de la distancia de la sustancia 2 desde el transductor 3, y el tiempo de retardo entre el pulso de luz y la señal puede dar información útil acerca de esa distancia. El dispositivo para su uso en la presente invención se calibra para la sustancia particular que se mide y por lo tanto no es necesario determinar la forma precisa de la energía generada. A menos que se especifique de cualquier otra manera el término "calor" se usa en la presente para denotar la energía generada mediante desintegración no radiactiva. La fuente de luz 6 se posiciona a fin de iluminar la sustancia 2. Preferentemente, la fuente de luz 6 se posiciona 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 cual la fuente de luz es un sistema de guías de onda. La guía de onda puede ser el propio transductor o la guía de onda puede ser una capa adicional unida al transductor.

En el método de la presente invención, la muestra que se analiza se expone a un transductor 3. Como se describió anteriormente, el transductor 3 es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica.

5 La energía generada por la sustancia 2 se detecta por el transductor 3 y se convierte en una señal eléctrica. La señal eléctrica se detecta por un detector 7. La fuente de luz 6 y el detector 7 están ambos bajo el control del controlador 8. La fuente de luz 6 preferentemente genera una serie de pulsos de luz (el término "luz" usado en la presente denota cualquier forma de radiación electromagnética a menos que se mencione una longitud de onda específica) que se denomina "luz interrumpida". 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, con el objetivo de obtener una señal reproducible, se usa una pluralidad de destellos de luz que en la práctica requiere de luz interrumpida. La frecuencia a la cual se aplican los pulsos de radiación electromagnética puede variarse. 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 que se va a determinar. En el límite superior, el tiempo de retardo entre cada pulso no debe ser tan grande que el periodo que toma registrar los datos se extienda sin razón. Preferentemente, la frecuencia de los pulsos es al menos 2 Hz, con mayor preferencia de 2-50 Hz, con mayor preferencia 5-15 Hz y con la máxima preferencia 10 Hz. Esto se corresponde con un tiempo de retardo entre los pulsos de a lo sumo 500 ms, 20-500 ms, 66-200 ms y 100 ms, respectivamente. Sin embargo, el tiempo de retardo puede ser tan corto como 1 ms. Además, la denominada relación de "marcas y espacios", es decir, la relación de la señal apagada a la señal encendida es preferentemente uno aunque pueden usarse otras relaciones sin efectos perjudiciales. Las fuentes de radiación electromagnética que producen la luz interrumpida con diferentes frecuencias de interrupción o diferentes relaciones de marcas y espacios se conocen en la técnica. El detector 7 determina el tiempo de retardo (o el "retardo de la correlación") entre cada pulso de luz desde la fuente de luz 6 y la señal eléctrica correspondiente detectada por el detector 7 del transductor 3. Este tiempo de retardo es una función de la distancia, d .

25 Puede usarse cualquier método para determinar el tiempo de retardo entre cada pulso de luz y la señal eléctrica correspondiente que proporcione resultados reproducibles. Preferentemente, el tiempo de retardo se mide desde el inicio de cada pulso de luz hasta el instante en que se detecta un máximo en la señal eléctrica correspondiente a la absorción de calor como por el detector 7.

30 Así la sustancia 2 puede separarse de la superficie del transductor y aún puede detectarse una señal. Además, la señal no solo es detectable mediante un medio intermedio capaz de transmitir energía hacia el transductor 3, sino que diferentes distancias, d , pueden distinguirse (esto se ha denominado "perfilado de profundidad") y que la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la sustancia 2 a la distancia particular, d , desde la superficie del transductor 3.

40 En consecuencia, en una modalidad preferida de la presente invención, la muestra se irradia con una serie de pulsos de radiación electromagnética y el método comprende además la etapa de detectar el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica, en donde el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica se corresponde con la posición del marcador en cualquiera de una o más posiciones a diferentes distancias desde la superficie del transductor. El método de la presente invención puede llevarse a cabo así sin extraer la muestra del transductor.

45 Como se muestra en la Fig. 2(a), en la presente invención, el transductor 3 se incorpora en una cámara de muestras 9. El transductor 3 tiene al menos un reactivo cautivo 10 sobre o proximal al mismo que tiene un sitio activo que es capaz de unirse al analito 11. Por ejemplo, al menos el único reactivo cautivo 10 puede ser un anticuerpo, el analito 11 puede ser un antígeno, y el reactivo marcado puede ser un antígeno marcado que es capaz además de unirse al menos al único reactivo cautivo o un anticuerpo marcado que es capaz además de unirse al analito. En este ejemplo, cuando el reactivo marcado es un antígeno marcado que es capaz además de unirse al menos al único reactivo cautivo 10, la señal eléctrica detectada por el detector es inversamente proporcional a la presencia del analito en la muestra. En otro ejemplo, al menos el único reactivo cautivo es un primer ácido nucleico y el analito es un segundo ácido nucleico y el primero y el segundo ácidos nucleicos son complementarios. En un ejemplo adicional, al menos el único reactivo cautivo contiene avidina o derivados de ella y el analito contiene biotina o derivados de ella, o viceversa. Los ejemplos de inmunoensayos adecuados se describen en WO 2004/090512. Preferentemente al menos el único reactivo cautivo se adsorbe o se une covalentemente al transductor, aunque se conocen otros métodos para unir los reactivos a las superficies, que también pueden usarse.

60 Un reactivo marcado 12 se introduce después en la muestra. El reactivo marcado 12 contiene un sitio activo para el analito 11 o para el reactivo cautivo 10 y un marcador que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía. En la Fig. 2(b), el reactivo marcado 12 se une al analito 11.

65 La muestra se deja después durante suficiente tiempo para permitir que el reactivo marcado 12 se una al analito 11 o al agente cautivo 10, aquí al analito 11. En este primer periodo del ensayo, el transductor se orienta de manera que la gravedad actúa sobre el reactivo marcado 12 para provocar que el reactivo marcado 12 se asiente, al menos en parte, sobre el transductor 3.

El marcador por lo tanto necesita tener una densidad suficiente para asentarse en una escala de tiempo razonable. Esto dependerá de la naturaleza de la partícula, la naturaleza de la muestra y el tiempo requerido para realizar el ensayo. El marcador se selecciona de una partícula metálica (preferentemente de oro), una partícula polimérica coloreada (por ejemplo, una partícula de látex coloreada), una partícula magnética, una partícula de carbono y una nanopartícula que comprende un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica (ver US 6,344,272). El marcador es capaz de interactuar con la radiación electromagnética para generar calor, y absorbe a la frecuencia apropiada y se asienta bajo la gravedad. En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es radiación de radiofrecuencias. Todos los otros marcadores mencionados anteriormente emplean luz, que puede incluir radiación IR o UV. En el caso de una partícula de oro, para aumentar la señal adicionalmente, el marcador puede mejorarse por la deposición catalítica de plata metálica mediante el uso de una solución de iones de plata y un agente reductor. El oro cataliza/activa la reducción de los iones de plata a metal de plata y es el metal de plata quien absorbe la luz. Preferentemente el marcador es una partícula de oro. Las partículas de oro están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante el uso de métodos conocidos (ver, por ejemplo, G. Frens, Nature, 241, 20-22 (1973)).

Preferentemente, la presente invención usa una partícula que tiene un tamaño de partícula de 20 a 1,000 nm, con mayor preferencia de 100 a 500 nm. Por el tamaño de partícula se denota el diámetro de la partícula en su punto más ancho. Preferentemente, la partícula tiene una densidad de 1.5 a 23 g/ml, con mayor preferencia 15-20 g/ml y con la máxima preferencia 19 g/ml. En una modalidad particularmente preferida, la partícula es una partícula de oro que tiene los antes mencionados densidad y tamaño de partícula, aunque podrían usarse otros materiales densos, tales como osmio o iridio. Posteriormente, en un segundo periodo, se provoca que el reactivo marcado se desprenda. Desprender el reactivo marcado cambia la señal recibida en el transductor y proporciona una indicación de la cantidad del reactivo marcado que se une al reactivo cautivo. Se provoca que el reactivo marcado se desprenda al invertir o invertir parcialmente el transductor con respecto a la muestra. Por invertir parcialmente se denota que el transductor se inclina de manera que se provoca que el reactivo marcado se separe de la superficie del transductor. Desprender el sistema provoca que el marcador sin unir se separe del transductor. La Fig. 2(c) muestra la cámara de muestras 9 después de la inversión. Puede verse que el analito unido 11 y el reactivo marcado 12a que se une al analito 11, quedan cerca (proximales) al transductor 3 mientras que el reactivo marcado no unido 12b está lejos (distal).

En el método de la presente invención, la muestra se irradia con radiación electromagnética durante el primero y el segundo periodos para permitir una comparación entre los dos. Como se describió anteriormente con referencia a WO 2004/090512, la energía generada por el marcador se transforma en una señal eléctrica que se detecta después por el detector y se procesa en la unidad central de procesamiento.

La muestra por lo general es una muestra fluida, tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma u orina.

El transductor por lo general es parte de una cámara de muestras. En una modalidad preferida, el reactivo marcado se une de manera liberable a una de las superficies interiores de la cámara antes de su uso. Por unir de manera liberable se denota que el reactivo marcado se une a la superficie, por ejemplo, al secarlo sobre la superficie, pero se libera cuando se introduce la muestra. Con mayor preferencia, el transductor define la parte superior de la cámara y el reactivo marcado se une de manera liberable a una superficie inferior interior de la cámara. Esta última disposición es particularmente adecuada para tomar una medición de línea de referencia. La medición de línea de referencia se toma después de que la muestra y el reactivo marcado se presentan al transductor, de tal manera que el reactivo marcado está lejos del transductor. En este punto, en un ensayo tipo sándwich, es posible que el analito pueda unirse al reactivo cautivo o al reactivo marcado, sin embargo la formación del sándwich en la superficie se impide debido a que los dos son distales entre sí. En un ensayo competitivo, es posible que el analito en la solución pueda unirse al reactivo cautivo, y llenar los sitios activos antes de que el reactivo marcado pueda moverse hacia el transductor. En el ejemplo anterior, donde el transductor forma la parte superior de una cámara y el reactivo marcado se deposita en la parte inferior de la cámara, el reactivo marcado permanecerá en la parte inferior de la cámara bajo la fuerza de gravedad. Una lectura de línea de referencia se toma y la cámara se invierte que permite que el reactivo marcado se asiente sobre el transductor donde puede tomarse una medición mediante el seguimiento del método descrito en la presente. Así, la muestra se introduce y se libera de ese modo el reactivo marcado, se toma una medición de línea de referencia, la cámara se invierte o se invierte parcialmente para permitir que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor. Después del tiempo suficiente para permitir que se produzca la sedimentación, la cámara se invierte una vez más, de vuelta a su posición original. Esto permite después que el reactivo marcado no unido se sedimente lejos de la superficie, y deja que se cuantifique la fracción unida.

La presente invención se ha descrito con referencia a un reactivo marcado que es más denso que el medio líquido de la muestra de manera que el reactivo marcado se asienta hacia el transductor y forma la superficie inferior (la base) de la cámara de muestras en la primera parte del ensayo y lejos del transductor en la segunda. Esto es, el reactivo marcado es más denso que la muestra y la gravedad actúa sobre el reactivo marcado para provocar que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor. Alternativamente, el reactivo marcado puede ser menos denso que el medio líquido de la muestra de manera que el reactivo marcado se asienta hacia el transductor y forma la superficie superior de la cámara de muestras (la tapa) en la primera parte del ensayo y lejos del transductor en la segunda. Es decir, el reactivo marcado flota hacia la parte superior de la cámara de muestras bajo la fuerza de flotación. Así, el reactivo marcado es menos denso que la muestra y la flotación actúa sobre el reactivo marcado para provocar que el

reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor. Ya sea que el reactivo marcado se asienta por sedimentación o por flotación, el reactivo marcado tendrá una densidad diferente de esa de la muestra.

5 La presente invención proporciona además un kit para realizar el método descrito anteriormente, en donde el kit comprende el dispositivo como se describe en la presente y el reactivo marcado también como se describe en la presente. El dispositivo puede tomar la forma de un lector portátil de mano y un dispositivo desechable que contiene el transductor.

10 La muestra se recolecta en un sistema básicamente cerrado, mezclada con el reactivo marcado y se coloca en un lector que orientaría la cámara analítica como sea apropiado para capturar y permitir después que el exceso del reactivo marcado no unido se desprenda. Por lo general, esto implica un cartucho giratorio dentro de un lector fijo, aunque puede incluirse también hacer girar físicamente el lector. En tal dispositivo, la cámara se sella o al menos la muestra se restringe suficientemente para impedir que salga de la cámara durante su reorientación, por ejemplo, por las fuerzas de tensión superficial dentro de un canal capilar.

15 En consecuencia, la presente invención proporciona además un kit para detectar un analito en una muestra que comprende: un dispositivo que comprende

20 una fuente de radiación adaptada para generar la radiación electromagnética;

un transductor capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica, cuyo transductor comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, el transductor que comprende fluoruro de polivinilideno y óxido de indio y estaño;

25 al menos un reactivo cautivo sobre o proximal al transductor, el reactivo cautivo que tiene un sitio activo que es capaz de unirse al analito;

una cámara para mantener la muestra en contacto de fluidos con el transductor, en donde la cámara se sella con una tapa o por las fuerzas capilares; y

30 un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor, en donde el dispositivo comprende un cartucho giratorio dentro de un lector fijo, y el cartucho incluye la cámara de muestras y el transductor; y

35 un reactivo marcado, en donde el reactivo marcado contiene un sitio activo para el analito o el reactivo cautivo y un marcador que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiactiva, en donde el marcador se selecciona de una partícula metálica, una partícula polimérica coloreada, una partícula magnética, una partícula de carbono y una nanopartícula que comprende un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica.

40 Preferentemente el transductor se adapta para experimentar la inversión o la inversión parcial con respecto a la muestra. En particular la cámara de muestras se sella para impedir que se derrame la muestra con una tapa, o por las fuerzas capilares dentro de la cámara de muestras. Preferentemente la cámara de muestras es un tubo capilar. La cámara de muestras tiene preferentemente una profundidad de 50-500 μm , con mayor preferencia de 100-300 μm , y una longitud/ancho de 1-10 mm, con mayor preferencia de 5 mm, por 10-50 mm, con mayor preferencia 30 mm. El volumen de la muestra es preferentemente 1-100 μl , con mayor preferencia 10-50 μl , y con la máxima preferencia aproximadamente 30 μl .

50 Como se describió anteriormente, el transductor es un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, y al menos el único reactivo cautivo preferentemente se adsorbe sobre el transductor.

Ejemplos

55 Como se muestra en la Fig. 3, un sensor 1 se fabrica a partir de un transductor 3 que se compone de una pieza de fluoruro de polivinilideno piezoeléctrico con polos recubierta de óxido de indio y estaño y una pieza de película para tapar de policarbonato transparente 13. El transductor 3 se recubre de anticuerpos dirigidos contra la hormona estimulante de la tiroides (TSH), mediante el uso de los métodos estándar conocidos en la técnica. El transductor 3, que tiene un grosor de aproximadamente 100 micras, y el material para tapar 13 se separan a una distancia de aproximadamente 500 micras mediante el uso de un separador 14 compuesto de una pieza de poliéster recubierta de adhesivo sensible a la presión. Esto crea una cámara de muestras más grande 15 de 30x10x0.5 mm de dimensiones aproximadas. Una segunda cámara más pequeña 16 se fabrica con dimensiones de 10x10x0.5 mm para permitir una reacción de control. Se toman provisiones para permitir las conexiones eléctricas hasta las superficies superior e inferior del transductor 3 con el objetivo de detectar la carga generada.

Los ensayos se llevan a cabo mediante el llenado de la cámara más grande 15 (a través del agujero de llenado 17) con

5 una mezcla de tampón que contiene partículas coloidales de oro de 200 nm recubiertas con anticuerpos para la TSH y también con TSH a una concentración de 5 ng/ml. La cámara de control 16 se llena simultáneamente sólo con tampón y partículas de oro (a concentraciones idénticas) pero sin TSH. Los agujeros de entrada y salida se sellan, después la
 10 unidad de la cámara se conecta a un instrumento de prueba de manera que la película piezoeléctrica 3 se orienta horizontalmente sobre la cara inferior de la cámara. La película piezoeléctrica 3 se ilumina después con luz interrumpida de LED secuencialmente con cuatro LED (de 525 nm de longitud de onda), de los cuales tres iluminan diferentes áreas de la superficie de la cámara de lectura y uno ilumina la superficie de la película piezoeléctrica de la cámara de control 16. Para cada pulso de los LED, se mide una tensión a través de la película piezoeléctrica 3 mediante el uso de un
 15 amplificador sincronizado y un convertidor analógico digital (ADC). La señal del ADC se grafica en el tiempo y se muestra en la Fig. 4. Puede observarse que la señal del ADC se eleva durante los primeros 1200 segundos, lo cual representa el esfuerzo térmico aumentado inducido en la película piezoeléctrica 3 mientras las partículas de oro iluminadas se sedimentan hacia la superficie de la película. Después de los 1200 segundos las señales de la cámara de control (LED 1) y la cámara de mediciones (LED 2, 3 y 4) no pueden distinguirse.
 20

15 En este punto la cámara se invierte, de manera que la película piezoeléctrica 3 ahora forma la parte superior o "techo" de la cámara (esto se corresponde con la posición en la Fig. 2(c)). Puede observarse que la señal en la cámara de control (LED 1) cae rápidamente mientras las partículas de oro se alejan de la superficie bajo la fuerza de gravedad. Sin embargo, en la cámara de mediciones (LED 2,3 y 4), la caída en la señal es mucho menos pronunciada, debido a que la
 25 TSH presente en la muestra crea puentes entre los anticuerpos sobre las partículas de oro y los anticuerpos sobre la superficie, que provocan que las partículas de oro se unan a la superficie de la película piezoeléctrica 3.

La diferencia entre estas gráficas puede usarse para confirmar que la TSH estaba presente en la mezcla de la reacción. Adicionalmente, mediante la preparación de una curva de calibración que usa diferentes concentraciones de TSH es posible usar este sistema como una prueba cuantitativa para las concentraciones de TSH en fluidos humanos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:
- 10 exponer la muestra a un transductor que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica y que comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, el transductor que comprende fluoruro de polivinilideno y óxido de indio y estaño, el transductor que tiene, además, al menos un reactivo cautivo sobre o proximal al mismo, al menos el único reactivo cautivo que tiene un sitio activo que es capaz de unirse al analito;
- 15 introducir un reactivo marcado en la muestra, en donde el reactivo marcado contiene un sitio activo para el analito o el reactivo cautivo y un marcador que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiactiva, en donde el marcador se selecciona de una partícula metálica, una partícula polimérica coloreada, una partícula magnética, una partícula de carbono y una nanopartícula que comprende un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica;
- 20 permitir que el reactivo marcado se una al analito o el agente cautivo en un primer periodo en el cual el transductor se orienta de manera que se provoca que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor;
- 25 posteriormente, en un segundo periodo, provocar que el reactivo marcado se desprenda mediante la inversión del transductor con respecto a la muestra o invertir parcialmente el transductor con respecto a la muestra de manera que se provoca que el reactivo marcado se separe de la superficie del transductor;
- irradiar la muestra con radiación electromagnética durante el primero y el segundo periodos, transformar la energía generada en una señal eléctrica;
- 30 detectar la señal eléctrica.
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el reactivo marcado es más denso que la muestra y la gravedad actúa sobre el reactivo marcado para provocar que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor.
3. Un método como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, en donde el reactivo marcado es menos denso que la muestra y la flotación actúa sobre el reactivo marcado para provocar que el reactivo marcado se asiente, al menos en parte, sobre el transductor.
- 35 4. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra se irradia con una serie de pulsos de radiación electromagnética y el método comprende además la etapa de detectar el tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica, en donde el tiempo de retardo entre cada uno de los pulsos de radiación electromagnética y la generación de la señal eléctrica se corresponde con la posición del marcador en cualquiera de una o más posiciones a diferentes distancias desde la superficie del transductor.
- 40 5. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde al menos el único reactivo cautivo es un anticuerpo, el analito es un antígeno, y el reactivo marcado es un antígeno marcado que es capaz además de unirse al menos al único reactivo cautivo o un anticuerpo marcado que es capaz además de unirse al analito.
- 45 6. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde al menos el único reactivo cautivo se adsorbe en el transductor.
- 50 7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el marcador es una partícula que tiene una densidad de 1.5 a 23 g/ml.
8. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde se toma una medición de línea de referencia después de introducir el reactivo marcado en la muestra, pero antes de permitir que el reactivo marcado se asiente sobre el transductor.
- 55 9. Un kit para detectar un analito en una muestra que comprende: un dispositivo que comprende una fuente de radiación adaptada para generar radiación electromagnética;
- 60 un transductor capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica, cuyo transductor comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, el transductor que comprende fluoruro de polivinilideno y óxido de indio y estaño;
- 65 al menos un reactivo cautivo sobre o proximal al transductor, el reactivo cautivo que tiene un sitio activo que es capaz de unirse al analito;
- una cámara para mantener la muestra en contacto de fluidos con el transductor, en donde la cámara se sella con una tapa o por las fuerzas capilares; y

- un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor, en donde el dispositivo comprende un cartucho giratorio dentro de un lector fijo, y el cartucho incluye la cámara de muestras y el transductor; y un reactivo marcado, en donde el reactivo marcado contiene un sitio activo para el analito o el reactivo cautivo y un marcador que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por una fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiactiva, en donde el marcador se selecciona de una partícula metálica, una partícula polimérica coloreada, una partícula magnética, una partícula de carbono y una nanopartícula que comprende un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica.
- 5
- 10 **10.** Un kit como se reivindica en la reivindicación 9, en donde al menos el único reactivo cautivo se adsorbe en el transductor.
- 15 **11.** Un kit como se reivindica en las reivindicaciones 9 o 10, en donde el reactivo marcado se une de manera liberable a una de las superficies de la cámara.
- 20 **12.** Un kit como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a la 11, en donde al menos el único reactivo cautivo es un anticuerpo, el analito es un antígeno, y el reactivo marcado es un antígeno marcado que es capaz además de unirse al menos al único reactivo cautivo o un anticuerpo marcado que es capaz además de unirse al analito.
- 13.** Un kit como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a la 12, en donde el marcador es una partícula que tiene una densidad de 1.5 a 23 g/ml.

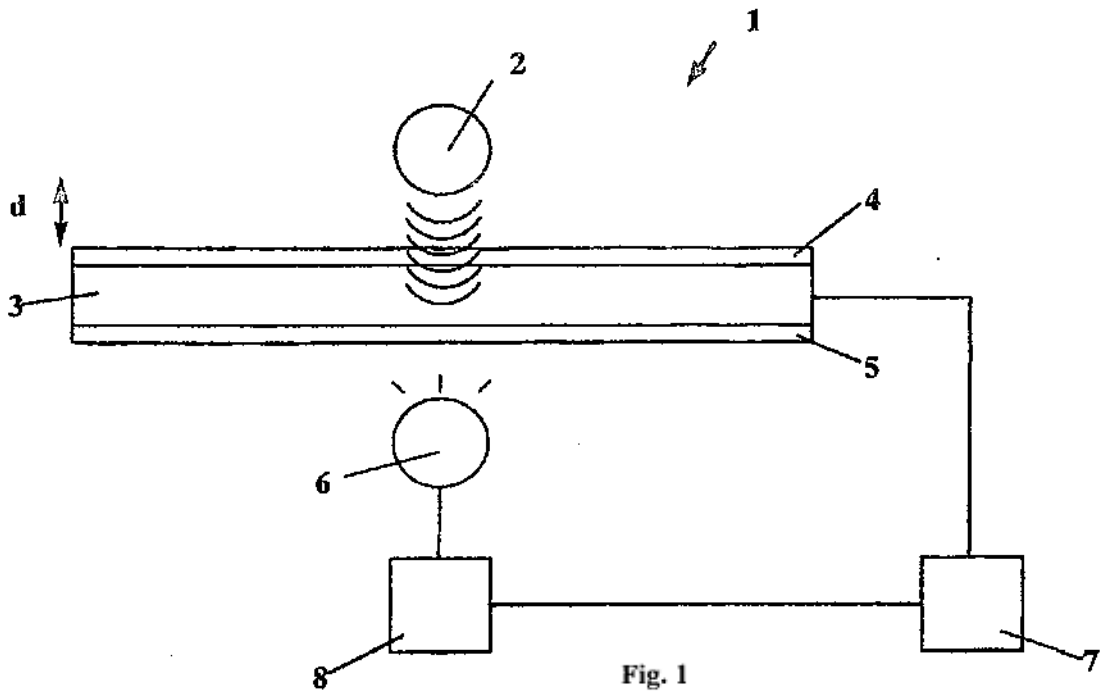


Fig. 1

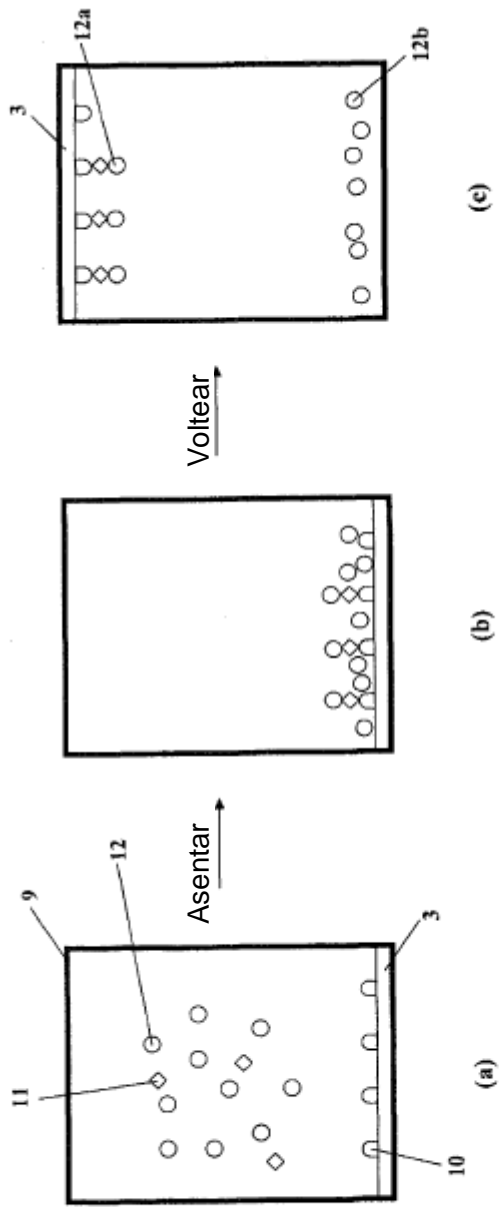


Fig. 2

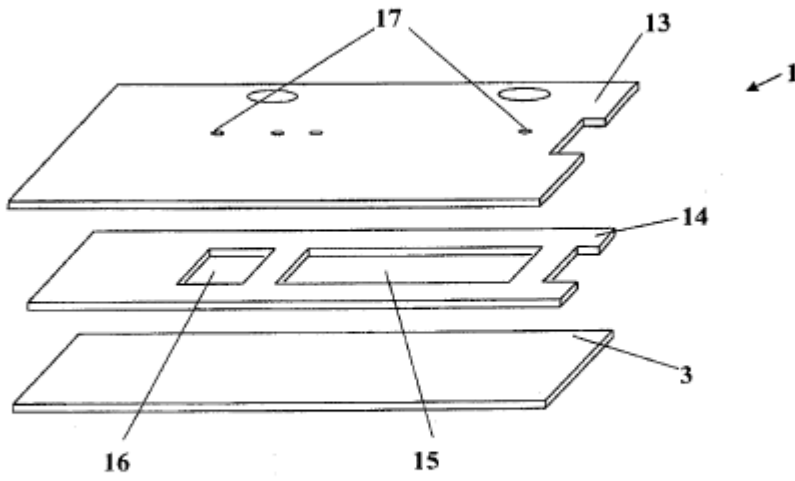


Fig. 3

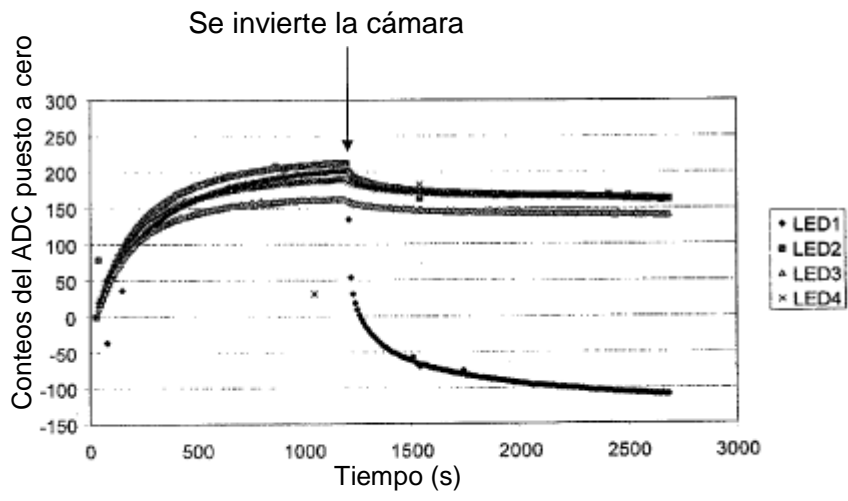


Fig. 4