

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 018**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 29/02** (2006.01)

**G01N 29/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2009 PCT/GB2009/050313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09141637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09750115 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2291655**

54 Título: **Un sensor**

30 Prioridad:

**21.05.2008 GB 0809237**

**22.05.2008 US 55287 P**

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

**25.10.2017**

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;  
ROSS, STEVEN, ANDREW y  
DWYER, TIMOTHY STUART**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 639 018 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

Un sensor

La presente invención se refiere a un sensor y en particular a un sensor que emplea un transductor recubierto para proporcionar una sensibilidad y reproducibilidad mejoradas.

5 La monitorización de analitos en solución, tal como compuestos biológicamente importantes en un ensayo biológico, por ejemplo, un inmunoensayo, tiene una aplicabilidad amplia. Un inmunoensayo es una prueba que mide la presencia o, de forma más usual, la concentración de un analito en un fluido biológico. Típicamente implica la unión específica de un antígeno a un anticuerpo. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, los anticuerpos monoclonales que tienen varios beneficios, incluyendo la reproducibilidad de fabricación y la contención de unión de un epítipo de un analito. Con el fin de proporcionar una medida cuantificable de la concentración del analito la respuesta se compara a ejemplos estándar de concentración conocida. La concentración del anticuerpo o del antígeno puede ser determinada mediante diversos métodos, aunque uno de los más comunes es etiquetar o bien el antígeno o el anticuerpo y detectar la presencia de la etiqueta.

15 Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo, el antígeno en la muestra desconocida compite con un antígeno etiquetado para unirse a anticuerpos, los cuales son normalmente inmovilizados sobre una fase sólida. La cantidad de antígeno etiquetado unido al lugar del anticuerpo es medida entonces, normalmente separando y midiendo el antígeno etiquetado unido a la fase sólida. Claramente la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra desconocida. En un principio de ensayo análogo, el anticuerpo etiquetado en solución compite con el antígeno inmovilizado en una fase sólida y que está presente en la muestra, dando una proporcionalidad inversa similar. En un inmunoensayo no competitivo, también referido como un ensayo inmunométrico, el antígeno en la muestra desconocida se une a un exceso de anticuerpos inmovilizados (los anticuerpos “de captura”) y es medida la cantidad de antígeno unido. A diferencia del método competitivo, los resultados del método no competitivo serán directamente proporcionales a la concentración del antígeno. En un ensayo inmunométrico denominado de “dos lugares” también denominado un “ensayo sandwich”, el antígeno es unido al lugar de anticuerpo de captura y entonces el anticuerpo etiquetado es introducido el cual se une al antígeno unido al anticuerpo de captura. Se mide entonces la cantidad de anticuerpo etiquetado en el lugar.

30 En un inmunoensayo de sandwich, un anticuerpo específico para un antígeno de interés es fijado a un soporte polimérico tal como una hoja de poliestireno. Una gota de la muestra que se va a comprobar, por ejemplo, un extracto de célula o una muestra de suero u orina se dispone sobre la hoja, la cual es lavada después de la formación del complejo anticuerpo-antígeno. El anticuerpo específico para un lugar diferente en el antígeno se añade después, y se lava de nuevo el soporte. Este segundo anticuerpo porta una etiqueta (el reportero etiquetado) de manera que puede detectarse con una alta sensibilidad. La cantidad de segundo anticuerpo unido a la hoja es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Este ensayo y otras variaciones de este tipo de ensayo son bien conocidos, ver, por ejemplo, “El Manual de Inmunoensayo, segunda Ed.” David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001.

40 Una amplia variedad de dispositivos analíticos y diagnósticos está disponible para realizar inmunoensayos. El dispositivo contiene un sensor que une de forma selectiva el analito de interés y el evento de unión es entonces cuantificado. Muchos dispositivos emplean un reactivo en el sensor que sufre un cambio detectable, por ejemplo, un cambio de color, en presencia del analito que está siendo detectado.

45 El documento WO 90/13017 da a conocer un elemento transductor piroeléctrico u otro termoeléctrico en forma de una banda. Los electrodos de película delgada son proporcionados y uno o más reactivos son depositados sobre la superficie del transductor. El reactivo sufre un cambio colorimétrico selectivo cuando entra en contacto con las especies que están siendo detectadas. El dispositivo es entonces normalmente insertado en un detector donde el transductor es iluminado normalmente desde abajo mediante una fuente de iluminación LED y la absorción de luz por el reactivo es detectada como un calentamiento microscópico en la superficie del transductor. La salida de señal eléctrica desde el transductor es procesada para derivar la concentración de las especies que están siendo detectadas.

50 El sistema del documento WO 90/13017 proporciona el análisis de especies que producen un cambio de color en el reactivo en reacción o en la combinación con el reactivo. Por ejemplo, los reactivos incluyen tintes indicadores de pH y de metales pesados, reactivos (por ejemplo, o-cresol en solución amoniacal de cobre) para detectar aminofenol en un ensayo de paracetamol, y un tinte de tetrazolio para detectar una enzima de oxidoreductasa en un ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima (ELISA). Sin embargo, aunque este sistema es útil en ciertas aplicaciones, se ha considerado adecuado sólo para el análisis donde las especies que están siendo analizadas generan un cambio de color en el reactivo dado que es el reactivo el que está situado en la superficie del transductor. Por lo tanto, el sistema no se puede aplicar en el análisis de especies que no provocan un cambio de color en el reactivo o cuando el cambio de color no se produce en la superficie del transductor.

El documento WO 2004/090512 da a conocer un dispositivo basado en la tecnología divulgada en el documento WO 90/13017, pero se basa en el hallazgo de que la energía generada por el decaimiento no radiactivo en un reactivo en irradiación con una radiación electromagnética puede detectarse mediante un transductor incluso cuando el reactivo no está en contacto con el transductor, y en el que el retardo de tiempo entre la irradiación con la radiación electromagnética y la señal eléctrica producida por el transductor es una función de la distancia del reactivo desde la superficie de la película. Este hallazgo proporciona un dispositivo capaz de un "perfilamiento profundo" el cual permite al dispositivo distinguir entre un analito unido a la superficie del transductor y un analito en el líquido a granel. Esta aplicación por lo tanto da a conocer un dispositivo que es capaz de ser utilizado en ensayos, normalmente ensayos biológicos, sin tener que llevar a cabo una etapa de lavado separada entre la consecución de un evento de unión y la detección de los resultados de ese evento.

El dispositivo dado a conocer en los documentos WO 90/13017 y WO 2004/090512 ha encontrado una amplia aplicabilidad y variaciones adicionales son divulgadas en los documentos WO 2006/079795, WO 2007/107716, WO 2007/129064 y WO 2007/141581.

Un tema común es que el sensor incluya un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que son capaces de transducir un cambio en la energía a una señal eléctrica. La figura 1 muestra el principio de este dispositivo 1 de detección químico. El dispositivo 1 se basa en la generación de calor en una sustancia 2 en irradiación de la sustancia 2 con una radiación electromagnética. El dispositivo 1 comprende un transductor piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene revestimientos 4, 5 de electrodo. El transductor 3 es preferiblemente una película, por ejemplo, una película de fluoruro de polivinilideno polarizado (PVDF). Los revestimientos 4, 5 de electrodo están, de forma preferible, formados a partir de óxido de indio y estaño (ITO) que tiene un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque es posible casi cualquier espesor desde un límite inferior de 1 nm por debajo del cual la conectividad eléctrica es demasiado baja y un límite superior de 100 nm por encima del cual la transmisión óptica es demasiado baja (debería ser no inferior de un 95%T). Una sustancia 2 se mantiene sobre o próxima al transductor 3 utilizando una técnica adecuada, mostrada aquí fijada al revestimiento 4 de electrodo superior. El reactivo puede estar en cualquier forma adecuada y se puede disponer una pluralidad de reactivos. De forma preferible, la sustancia 2 es adsorbida en el electrodo superior, por ejemplo, acoplado o unido de forma covalente a través de fuerzas inter moleculares tal como uniones iónicas, uniones por hidrógeno o fuerzas de van der Waals.

Una característica clave de este dispositivo es que la sustancia 2 genera calor cuando es irradiada mediante una fuente de radiación 6 electromagnética, tal como luz, preferiblemente luz visible. La fuente de iluminación puede ser, por ejemplo, un LED. La fuente 6 de iluminación ilumina la sustancia 2 con luz de una longitud de onda apropiada (por ejemplo un color complementario). Aunque no se desea regirse por la teoría, se cree que la sustancia 2 absorbe la luz para generar un estado excitado el cual después sufre un decaimiento no radiactivo por tanto generando energía, indicado por las líneas curvadas en la figura 1. Esta energía es principalmente en forma de calor (es decir, un movimiento térmico en el ambiente) aunque se pueden generar también otras formas de energía, por ejemplo, una onda de impacto. La energía es, sin embargo, detectada por el transductor y convertida en una señal eléctrica.

El dispositivo es calibrado para el reactivo particular que está siendo medido y por lo tanto no necesita determinarse la forma precisa de la energía generada por el decaimiento no radiactivo. A menos que se especifique de otro modo el término "calor" es utilizado en el presente documento para indicar la energía generada por el decaimiento no radiactivo. La fuente 6 de iluminación está situada de manera que ilumina la sustancia 2. De forma preferible, la fuente 6 de iluminación está situada sustancialmente perpendicular al transductor 3 y los electrodos 4, 5 y la sustancia 2 es iluminada a través del transductor 3 y de los electrodos 4, 5. La fuente de iluminación puede ser una fuente de iluminación interna dentro del transductor en el cual la fuente de iluminación es un sistema de onda guiada. La guía de onda puede ser el propio transductor o la guía de onda puede ser una capa adicional fijada al transductor. La longitud de onda de iluminación depende de la etiqueta utilizada; por ejemplo, para etiquetas de oro de 40 nm la longitud de onda preferida es de 525 nm y para etiquetas de carbono la longitud de onda preferida es de 650 nm.

La energía generada por la sustancia 2 es detectada por el transductor 3 y convertida en una señal eléctrica. La señal eléctrica es detectada por un detector 7. La fuente 6 de iluminación y el detector 7 están ambos bajo el control del controlador 8.

En un modo de realización, la fuente 6 de iluminación genera una serie de pulsos de luz (el término "luz" utilizado en el presente documento significa cualquier forma de radiación electromagnética a menos que se mencione una longitud de onda específica) que es denominada "luz de destellos". 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 fin de obtener una señal reproducible, se utiliza una pluralidad de destellos de luz lo cual en la práctica requiere una luz de destellos. La frecuencia a la cual se aplican los pulsos de radiación electromagnética puede ser variada. En un límite inferior, el retardo de tiempo entre los pulsos debe ser suficiente para el retardo de tiempo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica que se va a determinar. En el límite superior, el retardo de tiempo entre cada pulso no debe ser tan grande como para que el período tomado para registrar los datos lleguen a extenderse de forma no razonable. De forma preferible, la frecuencia de los pulsos es desde 2-50 Hz, de forma más

- preferible 5-15 Hz y más preferiblemente de 10 Hz. Esto corresponde a un retardo de tiempo entre pulsos de 20-500 ms, 66-200 ms y 100 ms respectivamente. Adicionalmente, la relación denominada "marca-espacio", es decir, la relación de una señal de encendido respecto a una señal de apagado es preferiblemente uno aunque se pueden utilizar otras relaciones para tomar ventaja en ciertas situaciones. Las fuentes de radiación electromagnética que producen luz de destellos con frecuencias diferentes de destello o diferentes relaciones de marca-espacio son conocidas en el estado de la técnica. El detector 7 determina el retardo de tiempo (o "retardo de correlación") entre cada pulso de luz desde la fuente 6 de iluminación y la señal eléctrica correspondiente detectada por el detector 7 desde el transductor 3. Este retardo de tiempo es una función de la distancia, d.
- Se puede utilizar cualquier método para determinar el retardo de tiempo entre cada pulso de luz y la señal eléctrica correspondiente que proporciona resultados reproducibles. De forma preferible, el retardo de tiempo es medido desde el comienzo de cada pulso de luz al punto en el cual se detecta un máximo en la señal eléctrica correspondiente a la absorción de calor como mediante el detector 7.
- Por tanto la sustancia 2 puede ser separada de la superficie del transductor y aun así puede ser detectada una señal. Por otro lado, no es sólo detectable la señal a través de un medio de intervención capaz de transmitir energía al transductor 3, sino diferentes distancias, d, pueden distinguirse (esto ha sido denominado como "perfilamiento profundo") y que la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la sustancia 2 en la distancia, d, particular desde la superficie del transductor 3.
- Länge K. y otros, Sensores y actuadores B 125 (2007) 441-446 se refiere a la modificación química de revestimientos de parileno C para biosensores SAW.
- Lee J. y otros IEEE Transacciones de ciencia de plasma, Vol. 32, No. 2 abril de 2004, 505-509 se refiere a la microestructura y adición de Au depositado en un sustrato de c-parileno con modificación de superficie para una aplicación de inmunoensayo potencial.
- El documento EP 1 536 227 se refiere a un sistema de detección cuantitativa de biopolímero utilizando un soporte piezoeléctrico monolítico por cambio de frecuencia resonante, un método para fabricación del mismo sistema y un método para detectar de forma cuantitativa biopolímero utilizando el mismo sistema.
- Wright J. D. y otros, Sensores y actuadores B 51 (199) 121-130 se refiere al desarrollo de un sistema de monitorización químico piezo-óptico.
- Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de continuar buscando una resistencia de señal y reproducibilidad mejoradas.
- Por consiguiente, la presente invención proporciona un sensor (9) para su uso en la detección de un analito que comprende:
- un transductor (10) compuesto de un sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico y una capa de electrodo transparente en una superficie del sustrato;
- un reactivo (17) inmovilizado sobre el transductor (10), el reactivo (17) que tiene un lugar de unión que es capaz de unir el analito o un derivado del analito; y
- una fuente de radiación (6) electromagnética y el detector (7) para detectar una señal eléctrica desde el transductor (10), caracterizado porque el sensor además comprende:
- una capa (12) de parileno sobre la capa de electrodo transparente; y
- una capa (13) de proteína entre la capa (12) de parileno y el reactivo (17) inmovilizado.
- La capa de parileno proporciona una superficie mejorada para la fijación posterior del reactivo.
- La presente invención se describirá ahora con referencia los dibujos, en los cuales:
- La figura 1 muestra un dispositivo de acuerdo con el documento WO 2004/090512;
- Las figuras 2 y 3 muestran representaciones esquemáticas del sensor de la presente invención;
- Las figuras 4-6 muestran espectros XPS de sus tratos con (figura 6) y sin (figuras 4 y 5) una capa de parileno;
- La figura 7 muestra, de forma gráfica, el ángulo de contacto de avance medido sobre diferentes áreas de diferentes hojas de parileno C revestido de PVDF/ITO;
- La figura 8 muestra una cámara demuestra que contiene el sensor de la presente invención;
- La figura 9 muestra el sensor de la presente invención; y

La figura 10 muestra una realización del ensayo de piezo-película estimulada ópticamente para 1 ng/mL TSH utilizando partículas de carbono en un tampón PBS (barras de error = 1 desviación estándar, número de repeticiones = 12).

5 Se ha encontrado que la intensidad y la reproducibilidad de la señal obtenida a partir del dispositivo descrito con referencia la figura 1 se puede mejorar recubriendo la superficie del transductor con una capa de parileno (ver la figura 2). La figura 2 muestra un sensor 9 que tiene un transductor 10. El transductor 10 está compuesto de un sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico y una capa de electrodo transparente sobre una superficie del sustrato del tipo descrito en el presente documento anteriormente con referencia la figura 1.

10 El sustrato es formado a partir de un polímero piroeléctrico o piezoeléctrico, tal como una película de fluoruro de polivinilideno. El fluoruro de polivinilideno es un polímero piroeléctrico/piezoeléctrico bien conocido. La superficie del sustrato está recubierta de una capa de electrodo transparente. Mediante transparente se quiere decir que la capa es transparente al menos a la longitud de onda de la radiación electromagnética utilizada en la detección del evento de unión entre el analito y el reactivo. Esta capa está compuesta, de forma preferible, de óxido de indio y estaño (ITO). En un modo de realización preferido, el transductor 10 es una película de fluoruro de polivinilideno recubierto de ITO.

15 El transductor 10 es mostrado en la figura 2 como un transductor plano y el transductor 10 tiene una primera superficie de está recubierta con una capa 12 de parileno. Las otras superficies del transductor 10 podrían también estar recubiertas, por ejemplo, dónde ambas superficies entran en contacto con la muestra (no mostrada).

20 La capa 12 de parileno está de más recubierta con una capa 13 de proteína. La proteína es mostrada como una proteína hidrofóbica biotinizada de los tipos bien conocidos en el estado de la técnica. La proteína es mostrada de forma esquemática en la figura 2 con la cadena 14 principal de la proteína fijada al transductor 10 y las moléculas 15 de biotina expuestas. El transductor 10 además comprende una capa 16 de estreptavidina que recubre la capa 13 de proteína. La capa 16 de estreptavidina tiene un reactivo 17 unido a la misma.

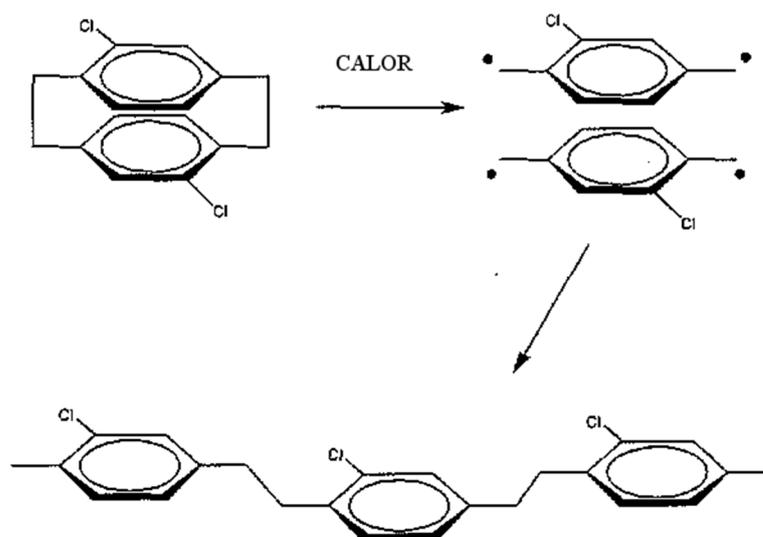
25 El reactivo 17 inmovilizado es capaz de unir el analito que está siendo detectado o un derivado del analito. El elemento de unión es entonces detectado como se describió en el presente documento anteriormente. El reactivo 17 es preferiblemente un anticuerpo elevado para unirse de forma selectiva al analito o el derivado del analito cuando se introduce la muestra.

La figura 3 muestra un sensor 9 similar al descrito con referencia la figura 2, excepto en que la capa 12 de parileno tiene una capa 16 de poliestreptavidina fijada directamente a la misma. El anticuerpo 17 biotilado es entonces unido a la tapa 16 de poliestreptavidina.

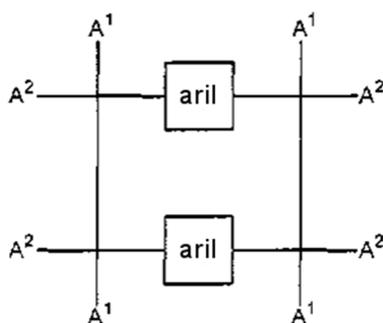
30 La superficie puede también estar cubierta de recubrimientos adicionales para estabilizar la superficie, por ejemplo, Stabilcoat de SurModics Inc, Eden Prairie, MN, Estados Unidos (no mostrado).

35 El parileno es un término genérico que describe una clase de polímeros que son derivados de [2,2]paraciclofanos. En general, el parileno no es polimerizado antes del recubrimiento, sino que más bien es depositado en la superficie que se va a recubrir mediante un proceso de deposición pirolítica. Este proceso supone la vaporización del [2,2]paraciclofano que es entonces dividido de forma pirolítica para formar un monómero diradical, seguido por la deposición del monómero sobre el sustrato que se va a recubrir para formar el polímero. La rotura es promovida por la tensión interna dentro del [2,2]paraciclofano. Las condiciones de vaporización dependerán del [2,2]paraciclofano utilizado, pero se conduce normalmente a aproximadamente 50-200°C y 100-200 Nm<sup>-2</sup>, por ejemplo, 150°C y 135 Nm<sup>-2</sup>. La pirólisis es típicamente a una temperatura de 400-700°C y 40-100 Nm<sup>-2</sup>, por ejemplo, 680°C y 65 Nm<sup>-2</sup>. La deposición se puede llevar a cabo a una temperatura ambiente de 75°C y 5-50 Nm<sup>-2</sup>, por ejemplo de 35°C y 15 Nm<sup>-2</sup>. El proceso puede resumirse mediante el siguiente esquema (utilizando parileno C):

40



Los parilenos utilizados en la presente invención son obtenidos a partir de [2,2]paraciclofanos típicamente que tienen la siguiente estructura:



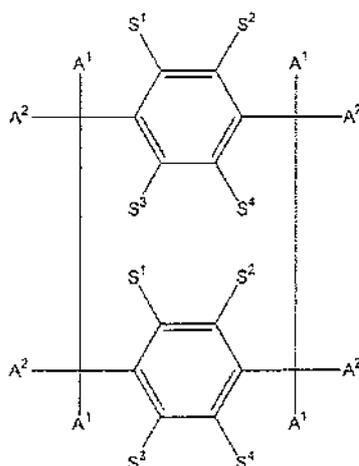
5

en donde

10 aril representa un anillo aromático carbocíclico o heterocíclico, tal como fenileno (preferiblemente 1,4-fenileno), naftalina, piridina, etc. que puede sustituirse con un halógeno; un amino; C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; o C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno; y

15 A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup>, el cual puede ser el mismo o diferente, representa: hidrógeno; halógeno; un amino C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con halógeno, preferiblemente C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; o C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno.

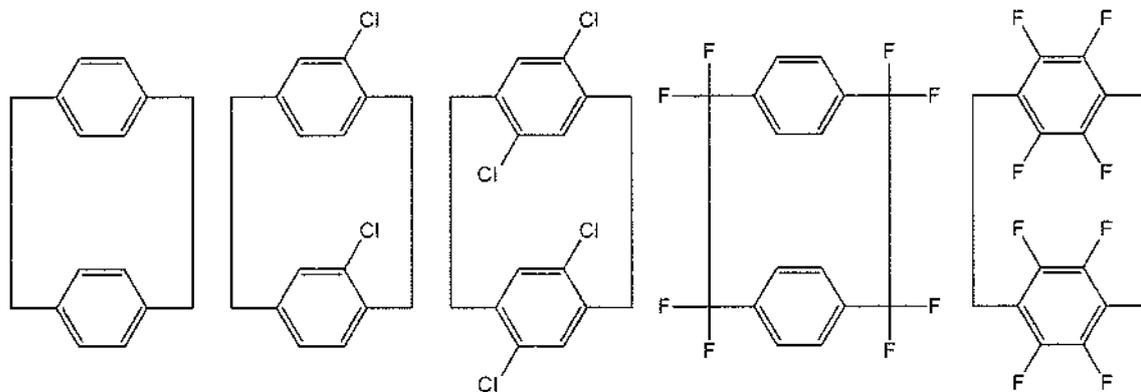
20 De forma preferible, los parilenos de acuerdo con la invención son obtenibles a partir de [2,2]paraciclofanos que tienen la siguiente estructura:



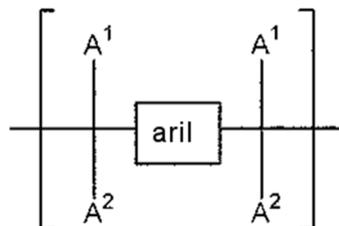
5 en donde A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup>, son como se definió anteriormente y S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup> y S<sup>4</sup>, los cuales pueden ser iguales o diferentes, representan: un hidrógeno; un halógeno; un amino C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> cicloalquil sustituido de forma opcional con un halógeno; C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alquil sustituido de forma opcional con un halógeno; o C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno, preferiblemente C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquileo sustituido de forma opcional con un halógeno.

10 De forma más preferible A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup> y S<sup>4</sup>, los cuales pueden ser iguales o diferentes, representan un hidrógeno o un halógeno. El halógeno es, de forma preferible, flúor o cloro.

Ejemplos específicos de [2,2]paraciclofanos a partir de los cuales es obtenible el parileno utilizado en la presente invención, incluyen:



15 Tal y como será evidente a partir de la discusión en el presente documento anterior, el polímero de parileno resultante como el utilizado en la presente invención es un polímero que tiene la siguiente estructura:



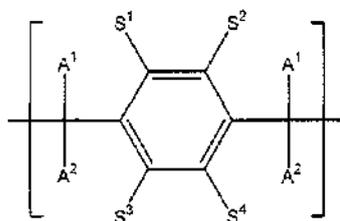
en donde aril, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup>, son como se definió anteriormente.

20 Una vez que se ha depositado, el parileno no se puede retirar fácilmente del sustrato. Esto, combinado con la baja solubilidad del parileno, hace que el parileno depositado sea difícil de caracterizar utilizando técnicas de fase de solución convencionales. Por consiguiente, el grado de polimerización del parileno se determina típicamente mediante el periodo de tiempo en la cual está expuesto el transductor a los monómeros de parileno y esto a su vez influye en el espesor de la capa de parileno. La capa de parileno de la presente invención, de forma preferible, tiene

un espesor de 10 nm a 100  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 100 nm a 10  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente de 250 nm a 1  $\mu\text{m}$ . Si la capa de parileno es demasiado gruesa, la energía térmica no alcanza de forma adecuada el transductor y si es demasiado delgada, la capa es frágil y también tiene una tendencia a formar agujeros.

De forma preferible, el parileno utilizado en la presente invención tiene una estructura como sigue:

5

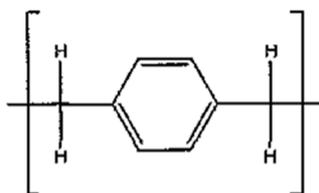


en donde  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $S^1$ ,  $S^2$ ,  $S^3$  y  $S^4$  son como se definió anteriormente.

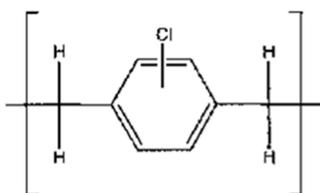
De forma particular, de forma preferible  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $S^1$ ,  $S^2$ ,  $S^3$  y  $S^4$ , los cuales pueden ser iguales o diferentes, representan un hidrógeno o un halógeno.

Ejemplos específicos de los parilenos que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen los siguientes:

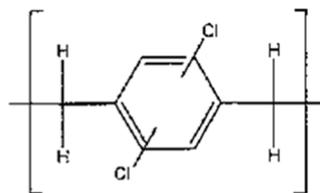
10



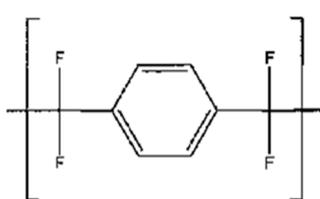
Parileno N



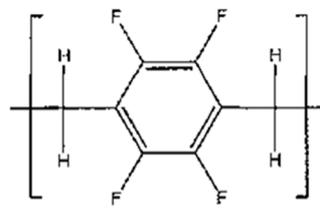
Parileno C



Parileno D



Parileno F



Parileno VT-4

El parileno C es particularmente preferido.

15

Una capa de proteína desincorporada entre la capa de parileno y el reactivo inmovilizado. La capa de proteína ayuda al enlazado del reactivo a la superficie del transductor, es decir, a la capa de parileno. La proteína es típicamente adsorbida en la capa de parileno mediante interacciones no covalente es, principalmente interacciones hidrofóbicas tal como fuerzas de van der Waals. La proteína puede ser un polipéptido natural o sintético. La proteína será lo suficientemente hidrofóbica para unirse de forma no covalente a la capa de parileno. Esto puede lograrse incorporando regiones hidrofóbicas en la proteína. Donde la proteína contiene tanto regiones hidrofóbicas como hidrofílicas, la proteína puede formar una estructura terciaria que permite a las regiones hidrofóbicas unirse a la capa de parileno, y a las regiones hidrofílicas separarse de la capa de parileno. En esta posición, las regiones hidrofóbicas se pueden utilizar para unirse al reactivo.

20

Ejemplos de proteínas adecuadas incluyen  $\alpha_2$ -macroglobulina (MW 820.000), albúmina de suero bovino/albúmina de suero humano (MW aproximadamente 70.000), albúmina de huevo,  $\alpha_2$  HS-glicoproteína (MW aproximadamente 49.000),  $\beta_{1c}/\beta_{1a}$ -globulina, inmunoglobulina (MW aproximadamente 150.000) y transferrina (MW aproximadamente 90.000).

5 Cuando se utilizan la albúmina de suero humano o  $\alpha_2$  HS-glicoproteína, preferiblemente se convierten en hidrofóbicas y deberían tratarse para producir una molécula polimérica con un peso molecular más alto. Cuando se utiliza transferrina, las superficies de enlaces cruzados hacen esta sustancia útil en la presente invención. Cuando se utiliza  $\alpha_2$ -macroglobulina, la molécula sólo necesita convertirse en hidrofóbica. Las proteínas son también adecuadas sin incluir un tratamiento previo, por ejemplo  $\beta$ -lipoproteínas (MW aproximadamente 3,2 millones) y  $\alpha_2$ -lipoproteínas (MW aproximadamente 5-20 millones).

10 La impermeabilización se produce, por ejemplo, mediante el uso de calor, tratamiento con ácidos, agentes de desnaturalización y/o iones caotrópicos y/o mediante un acoplamiento químico con un compuesto hidrofóbico. El aumento del peso molecular puede producirse, por ejemplo, mediante el uso de calor, tratamiento con ácidos, agentes de desnaturalización y/o iones caotrópicos y/o mediante enlaces cruzados mediante un reactivo de proteína bi o polifuncional. El tratamiento llevado a cabo hasta que se obtiene el polímero de proteína con un peso molecular de 500.000 o más. Se prefiere, de forma especial, utilizar un polímero de proteína con un peso molecular desde 100.000 a 20 millones, o de forma más preferible de 500.000 a 5 millones.

15 Cuando se requiere un enlazado cruzado, la impermeabilización se puede llevar a cabo antes, durante o después del enlazado cruzado. Temperaturas de 40-95°C durante un minuto a 10 horas se pueden utilizar para impermeabilizar mediante calor, por ejemplo tal y como se describe en Bioquímica, Biofísica. Acta 1980, 624,13-20. Como ácidos, se utilizan, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico o ácido clorhídrico. Las concentraciones usuales son de 1 a 100 nmol/L con un periodo de acción desde 10 minutos a 16 horas. Iones caotrópicos adecuados incluyen, por ejemplo, tiocianato, yoduro, fluoruro, bromuro, perclorato y sulfato. Agentes de desnaturalización adecuados incluyen, por ejemplo, guanidina clorhidrato y urea. Generalmente se utilizan concentraciones de 10 mmol/L a 6 mol/L. Para la derivatización de compuestos hidrofóbicos se utilizan de forma preferible ácidos grasos solubles preferentemente usados, lípidos en forma de bajo y alto peso molecular, así como polímeros sintéticos, tales como glicol de polipropileno y copolímeros solubles de poliestireno. La derivatización se lleva a cabo de acuerdo a métodos bien conocidos. El enlazado cruzado por medio de compuestos bi y polifuncionales se lleva a cabo con reactivos de unión de proteínas. Estos son compuestos que contienen al menos dos grupos funcionales, que pueden ser iguales o diferentes y que pueden reaccionar a través de estos grupos funcionales con grupos funcionales de proteínas. Se utilizan de forma preferible compuestos que consisten en una cadena de alquil en los extremos en los cuales están presentes, por ejemplo, succinimida, maleimida y grupos aldehídos. La proteína se enlaza de forma cruzada de la manera usual con los componentes bi o polifuncionales haciendo reaccionar juntos la proteína soluble y el componente bi o polifuncional. Para la impermeabilización y/o el enlace cruzado, se usan de forma preferible proteínas precursoras con un peso molecular desde 10.000 a 700.000, siendo especialmente preferidas la albúmina de suero de bovino, la lipasa y la inmuno  $\gamma$ -globulina. Ver el documento US 5,061,640 para más detalles.

20 La presente invención además proporciona un método para preparar un sensor (9), que comprende las etapas de proporcionar un transductor (10) compuesto de un sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico y una capa de electrodo transparente en una superficie del sustrato y fijar un receptor al transductor (10), caracterizado porque el método además comprende las etapas de recubrir la capa del electrodo transparente con parileno (12) mediante una deposición de vapor de monómeros de parileno sobre el sustrato y tratando la capa (12) de parileno con una proteína (13) antes de la etapa de fijación de un receptor a la capa (12) de parileno. La deposición del sensor puede ser monitorizado utilizando una microbalanza de cuarzo para controlar la cantidad de material depositado.

25 Se cree que el tratamiento de la superficie del sustrato con parileno resulta en un recubrimiento de proteína más continua en comparación con una superficie no tratada. Esto a su vez lleva a una señal más intensa y una reproducibilidad mayor entre las mediciones. Esto ha sido investigado utilizando una XPS (espectroscopia de fotoelectrones de rayos X). En una XPS, la superficie del sustrato es irradiada con rayos X provocando que los electrones se emitan desde los átomos sobre la superficie del sustrato. Los electrones emitidos tienen una energía característica que depende del tipo de átomo y de la órbita desde la cual han sido emitidos. La técnica es por lo tanto utilizada para determinar la naturaleza química de la superficie de la película.

30 La figura 4 muestra un espectro de XPS de una película de PVDF recubierta de ITO después de la limpieza mediante decapado con plasma, mostrando los picos esperados para el indio, el estaño y el oxígeno. La figura 5 muestra la película siguiendo a una posterior exposición a la atmósfera durante varios días. Un pico característico justo por debajo de 300 eV muestra la presencia de átomos de carbono, adicionalmente a los picos esperados para el indio, el estaño y el oxígeno. Se cree que las proteínas, de forma preferente, se fijan a regiones del sustrato que han llegado a estar contaminadas con especies que contienen carbono, tal como VOCs no esféricas, aunque hay un pequeño control sobre las VOCs que están siendo depositadas sobre la superficie de película. La figura 6 muestra un espectro de XPS del mismo sustrato recubierto con parileno C. Grandes picos de carbono y cloro son observados en la relación esperada para el parileno C. Estos datos son también resumidos en la siguiente tabla.

Tabla. Composición de superficie elemental de ITO limpio, ITO contaminado, y piezo-película de parileno C-recubierta de ITO.

Composición elemental	ITO decapado con plasma	ITO contaminado	Parileno C
Carbono %	0	39,2	86,1
Oxígeno %	53,5	38,2	1,5
Indio %	43,1	20,5	0,0
Estaño %	3,4	2,0	0,0
Cloro %	0,0	0,0	11,8

5 Se cree que un recubrimiento continuo de parileno facilita la unión de proteínas a la superficie del sustrato. Por consiguiente, se prefiere que el sensor de la presente invención además comprenda una capa de proteína entre la capa de parileno y el reactivo.

10 El parileno también produce una película delgada de forma adecuada con una variabilidad inferior en el espesor en comparación con, digamos, una película de poliestireno recubierto por inmersión, lo cual ha sido demostrado midiendo patrones de interferencia de luz de la película de parileno. De forma adicional, un ángulo de contacto de gota de agua de alrededor de 95° (con una pequeña variación) es casi óptimo para la absorción de proteínas hidrofóbicas y esto es demostrado mediante el ángulo de contacto de avance medido sobre diferentes áreas de las diferentes hojas de parileno C- PVDF recubierto/ITO tal y como se muestra en la figura 7. La figura 7 muestra un ángulo de contacto de agua promedio de  $93,9 \pm 1,3^\circ$  (derivación estándar 1). La medición fue llevada a cabo mediante el método de gota de sésil dinámico de acuerdo con ISO 15989:2004.

15 En un modo de realización preferido, el sensor 9 de la presente invención es incorporado en el dispositivo descrito en el presente documento anteriormente con referencia la figura 1.

20 La figura 8 muestra un ensayo de anticuerpo de captura típico que utiliza el sensor 9 de la presente invención. El sensor 9 de la presente invención además incluye una cavidad 18 para mantener un líquido 19 que contiene un analito 20 disuelto o suspendido en la misma. El transductor es integral con la cámara, es decir, la cavidad. El sensor 9 incluye un reactivo, es decir, un anticuerpo 17, fijado al mismo. El sensor además comprende una fuente de radiación electromagnética, y un detector para detectar la señal eléctrica (no mostrado) que es descrito en el presente documento anteriormente con referencia la figura 1.

25 Durante el uso, la cavidad 18 es rellenada con el líquido 19 (o cualquier fluido) que contenga el analito 20. El analito 20 entonces se une al anticuerpo 17. El anticuerpo 21 etiquetado adicional es añadido al líquido y se forma un complejo de sandwich entre el anticuerpo 17 unido, el analito 20 y el anticuerpo 21 etiquetado. De forma alternativa, el anticuerpo 21 etiquetado adicional se puede mezclar previamente con el líquido, siendo el resultado final el mismo. Un exceso de anticuerpo 21 etiquetado es añadido de manera que todo el analito 20 unido forma un complejo de sandwich. La muestra por lo tanto contiene un anticuerpo 21a etiquetado unido y un anticuerpo 21b etiquetado no unido libre en solución.

30 Durante o después de la formación del complejo de sandwich, la muestra es irradiada utilizando una serie de pulsos de radiación electromagnética, tal como luz. El retardo de tiempo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica por el transductor 3 es detectada por un detector. El retardo de tiempo apropiado es seleccionado para medir sólo el calor generado por el anticuerpo 21a etiquetado unido. Dado que el retardo de tiempo es una función de la distancia de la etiqueta desde el transductor 3, el anticuerpo 21a etiquetado unido puede distinguirse del anticuerpo 21b etiquetado no unido.

35 La etiqueta puede ser de cualquier material que sea capaz de interactuar con la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía mediante un decaimiento no radiante. De forma preferible, la etiqueta es seleccionada de, pero no limitada a, una partícula de carbono, una partícula de polímero coloreada (por ejemplo, látex coloreado), una molécula de tinte, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula de metal (por ejemplo, oro), una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tenga un material de núcleo no conductor y al menos una capa envolvente de metal, un glóbulo rojo y combinaciones de los mismos.

40 En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es una radiación de radio frecuencia. Todas las otras etiquetas mencionadas en el presente documento anteriormente emplean luz, que puede incluir una radiación de IR o UV. De forma preferible, la etiqueta es una partícula de oro o una partícula de carbono. Las partículas de carbono tienen beneficios en que absorben esencialmente de forma uniforme en todas las longitudes de onda de interés y son mucho menos densas que la mayoría de las partículas metálicas que minimizan su sedimentación durante el ensayo. Las partículas de oro están disponibles de forma comercial o pueden prepararse utilizando

métodos conocidos (ver por ejemplo, G. Frens, Nature 1973, 241, 20-22). Para una descripción más detallada de una etiqueta de nanopartícula ver los documentos US 6,344,272 y WO 2007/141581. Las partículas de carbono están disponibles de forma comercial, por ejemplo, de Degussa, Essen, Alemania y los métodos para su conjugación con proteínas y moléculas pequeñas son conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, por Van Doorn y otros (US 5.641.689).

De forma preferible, la presente invención utiliza una partícula que tiene un tamaño de partícula de 20 a 1,000 nm, más preferiblemente de 100 a 500 nm. Por tamaño de partícula se quiere decir el diámetro de la partícula en su punto más ancho.

La etiqueta está próxima al transductor cuando ha ocurrido el evento de unión. Es decir, la etiqueta está lo suficientemente próxima a la superficie del transductor para que el transductor sea capaz de detectar la energía generada por la etiqueta en la irradiación de la muestra. La distancia real entre la etiqueta y la superficie del transductor será, sin embargo, dependiente de un número de variables, tales como el tamaño y la naturaleza de la etiqueta, el tamaño y la naturaleza del primer y segundo anticuerpos y del analito, la naturaleza del medio de muestra, y la naturaleza de la radiación electromagnética y de la configuración correspondiente del detector. En lo que se refiere a la naturaleza de la radiación electromagnética, el sensor de la presente invención puede incluir una fuente de radiación que está adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector está adaptado para determinar el retardo de tiempo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica por lo tanto permitiendo una determinación precisa de la posición de la etiqueta con respecto al transductor tal y como se discutió con referencia a la figura 1.

El reactivo es preferiblemente un anticuerpo, aunque se podrían utilizar otros reactivos. Como alternativas a las reacciones anticuerpo-antígeno, el reactivo y el analito pueden ser un primer y un segundo ácido nucleico donde el primer y segundo ácidos nucleicos son complementarios, o un reactivo que contenga avidina o derivados de la misma y un analito que contenga biotina o derivados de la misma, o viceversa. El sistema no está tampoco limitado a ensayos biológicos y puede ser aplicado, por ejemplo, a la detección de metales pesados en agua. El sistema tampoco necesita estar limitado a líquidos y puede ser utilizado cualquier sistema de fluido, por ejemplo, la detención de enzimas, células y virus, etc. en el aire.

La muestra no conocida se espera que contenga el analito, pero por supuesto el ensayo de la presente invención puede ser utilizado para determinar la presencia o ausencia del analito. El analito es de forma preferible una molécula pequeña en la medida en que el ensayo es adaptado de forma ideal a la dicha molécula, aunque la presente invención nuestra limitada la misma. El término "molécula pequeña" utilizado en el presente documento es un término del estado de la técnica y es utilizado para distinguir la molécula de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Una molécula pequeña es a menudo referida en el campo de los inmunoensayos como un "hapteno" siendo una molécula pequeña la cual, cuando se fija a un portador grande tal como una proteína puede obtener una respuesta inmune e incluye moléculas tales como hormonas y drogas sintéticas. Una molécula pequeña de este tipo tendrá típicamente un peso molecular de 2.000 o menos, a menudo 1.000 o menos e incluso 500 o menos. El reactivo puede adaptarse para unir el propio analito, aunque el analito puede sufrir una reacción química o un evento de complejación inicial antes de la unión al reactivo. Por ejemplo, el analito puede ser protonado/desprotonado en el pH de las condiciones de ensayo, o después de la unión a un segundo reactivo, tal como un anticuerpo etiquetado. Por tanto, el analito que está unido al reactivo puede ser el propio analito o un derivado del analito; ambos están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo que puede o puede que no contenga el analito de interés será generalmente una muestra fluida y normalmente una muestra biológica (por tanto acuosa), tal como un fluido corporal, por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero u orina. La muestra puede contener partículas suspendidas y puede incluso ser sangre completa. Una ventaja del método de la presente invención es que el ensayo se puede realizar sobre una muestra que contiene partículas suspendidas sin influir indebidamente en los resultados del ensayo. La muestra típicamente será del orden de microlitros (por ejemplo, 1- 100  $\mu$ L, preferiblemente 1-10  $\mu$ L). Con el fin de mantener una muestra fluida, el transductor está situado, de forma preferible, en una cámara de muestra y de forma más preferible en una cavidad. En un modo de realización preferido, el transductor es integral con la cámara, es decir, forma una de las paredes que definen la cámara. La muestra puede simplemente ser retenida mediante fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro de un canal de capilaridad.

El aparato descrito en el presente documento puede tomar la forma de un lector portátil de mano y un sensor desechable que contiene el transductor. La muestra es recolectada en un sistema esencialmente cerrado, mezclada con cualquier otro reactivo y situada en un lector que realizaría la irradiación de la muestra y la detección de la señal eléctrica resultante.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de biosensores de piezo/piro-película activa

- Una película bimorfa de fluoruro de polivinilideno piezoeléctrico polarizado (PVDF), recubierta de óxido de indio y estaño utilizada como el dispositivo de detección en los siguientes ejemplos, fue recubierta de forma conformada con parileno C de un espesor nominal de 500 nm mediante métodos conocidos para los expertos en la materia (ver por ejemplo R. Wood, 2000, para proteger y preservar, materiales del mundo, Vol. 8, No. 6, págs. 30-32) en un modelo PDS 2010 LABCOTER® 2 (Sistemas de recubrimiento de especialidad, Indianápolis, Indiana, USA). Esta fue después recubierta en una solución de poliestreptavidina (200 µg/mL en PBS – 10 mmol/L de tampón de fosfato que contiene 2,7 mmol/L KCl, 137 mmol/L NaCl y 0,05% de Tween) mediante incubación a temperatura ambiente durante la noche. La poliestreptavidina fue preparada como se describe por Tischer y otros (US 5,061,640).
- Para preparar una superficie de “captura”, la superficie de poliestreptavidina fue incubada con biotinilado anti-TSH (hormona estimulante de tiroideas), dando una superficie recubierta de anticuerpos. 10 µg/mL de biotinilado anti-TSH (Anti-TSH 5409 SPTNE-5, código de producto: 100034; Medix Biochemica, Kauniainen, Finlandia) en PBS (biotinilado por el método descrito a continuación) fue incubado a temperatura ambiente durante la noche y después lavado con PBS en exceso y recubierto con Stabilcoat® (SurModics Inc, Eden Prairie, MN, EUA) antes de secado a 40°C.
- El anticuerpo fue biotinilado por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, una solución de 5 mg/mL de anticuerpo en PBS (NaCl 150 mmol/L, fosfato 20 mmol/L, pH 7,5) se preparó disolviendo anticuerpo liofilizado, o mediante dilución. Si esta solución contiene otras proteínas o Tris (trishidroximetilaminometano) u otros agentes de interferencia, purificar mediante diálisis o filtración de gel. Entonces preparar una solución de NHS-biotina a 20 mmol/L en DMSO anhidro y añadir 15 mL de la solución de NHS-biotina al anticuerpo (1 mL). Incubar durante una hora a temperatura ambiente y después dializar el anticuerpo contra PBS que contiene una azida sódica (0,01%). El anticuerpo biotinilado puede ser diluido en 1 mg/mL con 0,1% de azida sódica y un 20% de glicerol para el almacenamiento a -20°C o +4°C. El nivel de biotinilado debería estar en el rango de 1-3 biotinas por IgG. Esto puede estimarse mediante una cuantificación de biotinas o para tasas altas de biotinilado, mediante una cuantificación diferencial de aminas. El sensor resultante es mostrado en la figura 3.
- Los sensores sobre piezo-películas de ITO “limpio” por decapado con plasma y de ITO “sucio” expuesta al aire bimorfos fueron también preparados (exactamente tal y como se describió anteriormente) con el fin de compararlos con la piezo-película recubierta de parileno C. El espectro XPS de estos sustratos y ha sido discutido en el presente documento anteriormente con referencia las figuras 4-6.

#### Ejemplo 2

##### 30 Preparación de conjugados reporteros

- Conjugados reporteros etiquetados con carbono fueron preparados esencialmente tal y como se describe por Van Doom y otros (US 5,641,689). Para preparar conjugados reporteros recubiertos de anticuerpo, 1 mL de partículas de carbono de Special Black-4 RCC nominalmente de 150 nm (Degussa, Essen, Alemania) en 5 mmol/L de tampón de fosfato, pH 6,2 fueron incubados con 200 µg/mL de solución de poliestreptavidina toda la noche a temperatura ambiente con agitado, resultando en una superficie recubierta de estreptavidina (A1). El conjugado de carbono resultante fue lavado (mediante centrifugación, granulación y resuspensión). 10 µg/mL anticuerpos monoclonales secundarios reporteros biotinilados (Anti-TSH 5407 SPTN-1, código de producto: 100032; Medix Biochemica, Kauniainen, Finlandia, biotinilado como se describió anteriormente), reactivo contra THS, en PBS fue entonces incubado durante la noche con 1 mL de una suspensión de partículas de carbono recubiertas de estreptavidina con agitación. El conjugado de carbono resultante fue lavado (por centrifugación, granulado y resuspensión) 3 veces con 0,05 mol/L de tampón de borato con pH 8,5 y almacenado en este tampón en la oscuridad a 4°C.

#### Ejemplo 3

##### Ensayo- sensor de piezo/piropelícula recubierta de anticuerpo

- Tal y como se muestra en la figura 9, un dispositivo 22 fue fabricado para realizar el ensayo. El dispositivo 22 fue fabricado a partir de una pieza de piezopelícula 9 recubierta de anticuerpo (descrita en el presente documento anteriormente) y una pieza de película 23 de cubierta de policarbonato transparente. Las películas fueron separadas una distancia de aproximadamente 500 micrones utilizando un espaciador 24 compuesto de una pieza de película de poliéster recubierta de adhesivo sensitivo a la presión troquelada para formar dos cámaras 25, 26 de tamaño desigual; una cámara 25 de dimensiones aproximadas de 30 x 10 x 0,5 mm para la reacción de ensayo y una segunda cámara 26 más pequeña de dimensiones 10 x 10 x 0,5 mm para una reacción de control. Se ha previsto permitir conexiones eléctricas en la superficie superior e inferior de la piezopelícula con el fin de detectar la carga generada.

- Se llevaron a cabo ensayos para rellenar la cámara 25 más grande (a través de un orificio 27 de llenado) con una mezcla de 0,1 mol/L de tampón Tris, que contiene 0,150 mol/L de MgCl<sub>2</sub> y 0,075% de solución Tween 20, que contiene 150 nm de partículas de carbono coloidal (a una concentración final de 0,0025% de sólidos) recubierta con un anticuerpo biotinilado (tal y como se describió en el presente documento anteriormente), reactivo contra TSH, y

THS estándar en PBS para dar una concentración de THS final de 1 ng/mL. La cámara 26 de control se rellenó de forma simultánea con una mezcla de reacción idéntica a la de la cámara de ensayo con el THS estándar reemplazado con PBS. Los orificios de entrada y de salida son sellados y el conjunto de cámara es conectado a un instrumento de comprobación de manera que la piezopelícula 3 es orientada verticalmente en una cara lateral de la cámara (aunque son posibles otras orientaciones). La piezopelícula es entonces iluminada con luz LED de destellos de forma secuencial con cuatro LEDs (de una longitud de onda de 625 nm) de los cuales tres iluminan áreas diferentes de la superficie de la cámara de ensayo y una ilumina la superficie de la piezopelícula de la cámara de control. Para cada pulso de LED, se mide el voltaje a través de la piezo- película utilizando un amplificador sintonizado y un convertidor analógico digital (ADC). En la cámara de reacción, la presencia de THS conduce a la unión de las partículas de carbono a la piezopelícula bajo un control de difusión, que lleva a un crecimiento en la señal a lo largo del tiempo. En la cámara de control negativa, la ausencia de THS significa que no se observa ninguna unión de carbono en la superficie. La señal ADC que representada a lo largo del tiempo y la pendiente de la señal a lo largo del tiempo es utilizada como una medida de la concentración de THS. El experimento se repitió 12 veces para generar un valor medio y una desviación estándar. Este experimento fue repetido utilizando superficies de parileno C, los sensores de ITO "limpio" y los sensores de ITO "sucio". La señal promedio (expresada en recuentos/min x 20) junto con una barra de error de desviación estándar es presentada en la figura 10.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sensor (9) para su uso en la detección de un analito en una muestra que comprende:  
un transductor (10) compuesto de un sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico y una capa de electrodo transparente en una superficie del sustrato;
- 5 un reactivo (17) inmovilizado en el transductor (10), el reactivo (17) que tiene una posición de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito; y  
una fuente (6) de radiación electromagnética y un detector (7) para detectar una señal eléctrica desde el transductor (10), caracterizado porque el sensor además comprende:  
10 una capa (12) de parileno en la capa del electrodo transparente; y  
una capa (13) de proteína entre la capa (12) de parileno y el reactivo (17) inmovilizado.
2. Un sensor (9) como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde la capa (12) de parileno tiene un espesor de 10 nm a 100 µm.
3. Un sensor (9) como el reivindicado en la reivindicación 1 o 2, en donde el parileno (12) es seleccionado de parileno N, parileno C, parileno D, parileno F y parileno VT-4.
- 15 4. Un sensor (9) como el reivindicado en las reivindicaciones anteriores, en donde el sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico es una película de fluoruro de polivinilideno.
5. Un sensor (9) como el reivindicado en cualquiera de la red indicaciones anteriores, en donde la capa de electrodo transparente es una capa de óxido de indio y estaño.
- 20 6. Un sensor (9) como el reivindicado en las reivindicaciones 4 y 5, en donde el transductor (10) es una película de fluoruro de polivinilideno recubierto de óxido de indio y estaño.
7. Un sensor (9) como el reivindicado en la reivindicación 6, en donde la proteína (13) es adsorbida en la capa (12) de parileno mediante interacciones no covalente es.
8. Un sensor (9) como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reactivo (17) es un anticuerpo, o un ácido nucleico o un análogo del mismo.
- 25 9. Un sensor (9) como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una cámara de muestra para mantener la muestra en contacto con el transductor (10).
10. Un sensor (9) como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde la fuente (6) de radiación está adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector (7) está adaptado para determinar el retardo de tiempo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente (6) de radiación y la generación de la señal eléctrica.
- 30 11. Un método de preparación de un sensor (9) que comprende las etapas de proporcionar un transductor (10) compuesto de un sustrato de polímero piroeléctrico o piezoeléctrico y una capa de electrodo transparente sobre una superficie del sustrato y fijar un receptor al transductor (10), caracterizado porque el método además comprende las etapas de recubrir la capa de electrodo transparente con parileno (12) mediante deposición por vapor de monómeros de parileno sobre el sustrato y tratar la capa (12) de parileno con una proteína (13) antes de la etapa de la fijación de un receptor a la capa (12) de parileno.
- 35

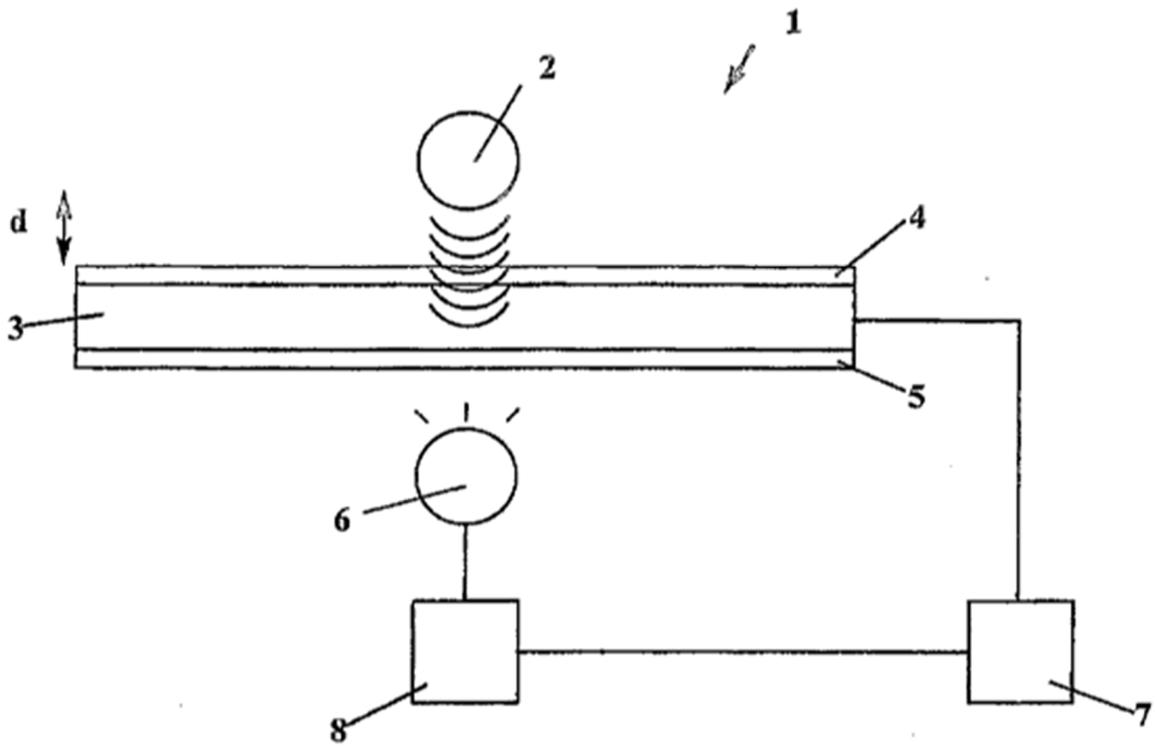


Fig. 1

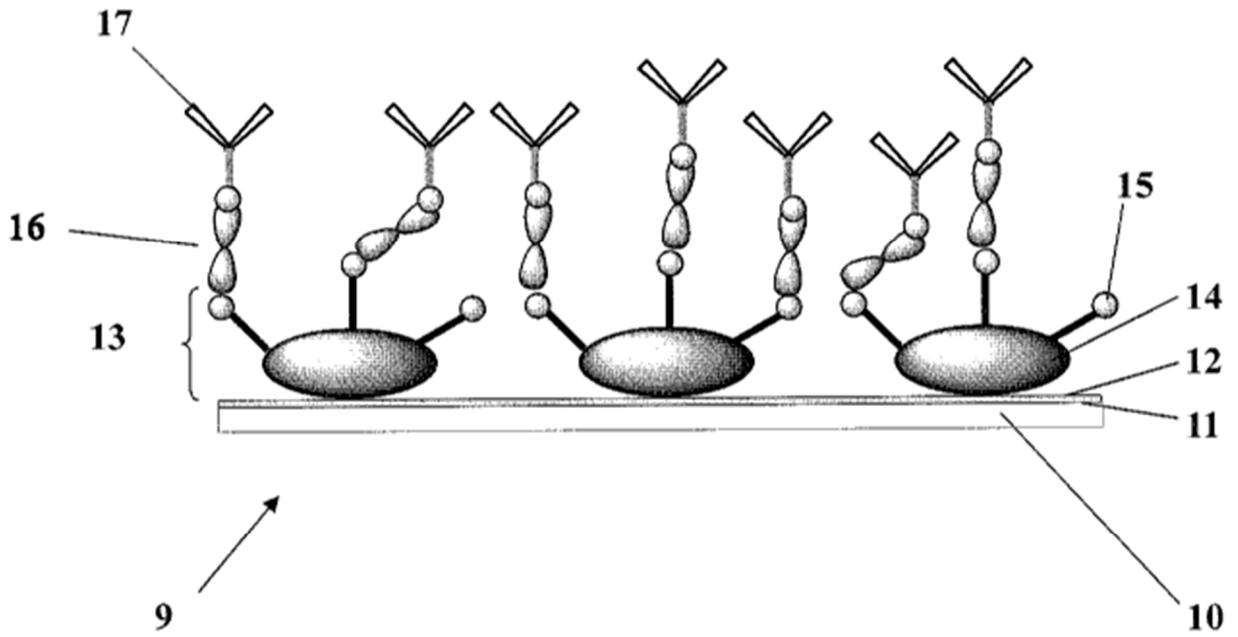


Fig. 2

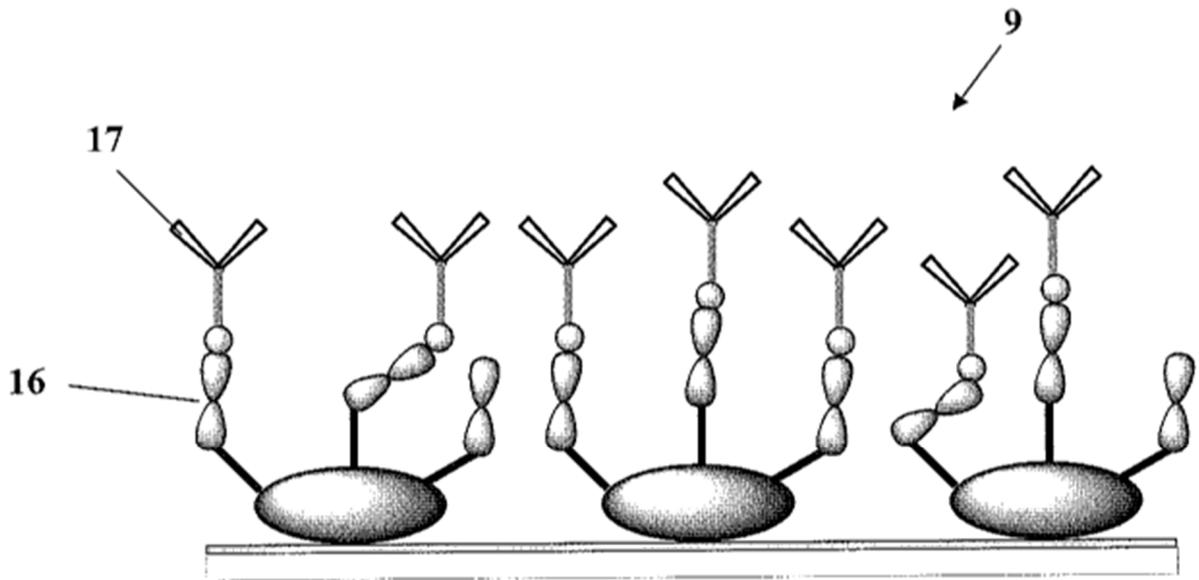


Fig. 3

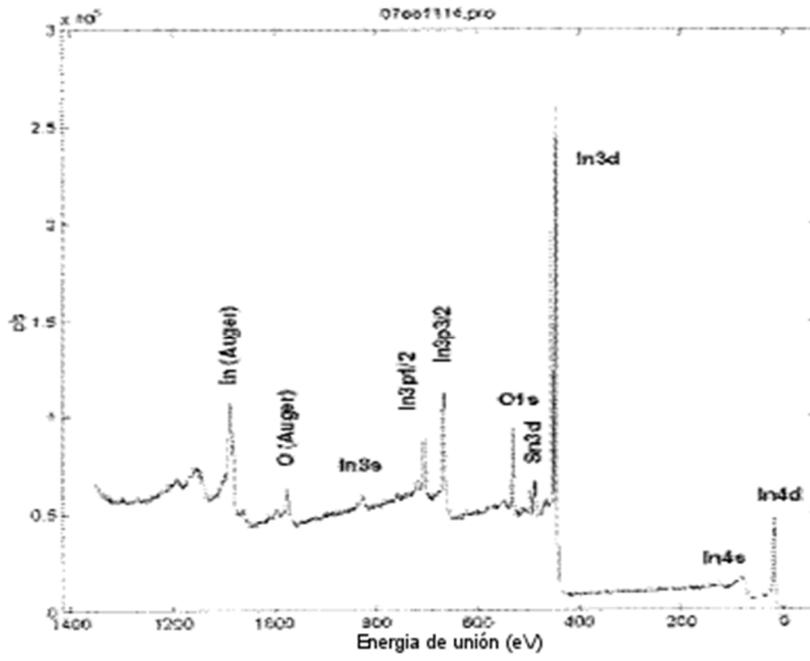


Fig. 4

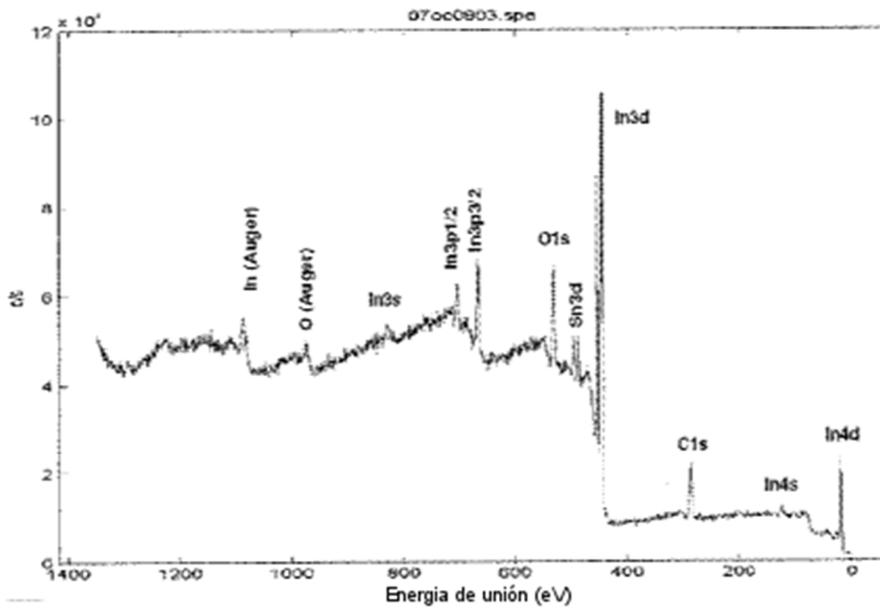


Fig. 5

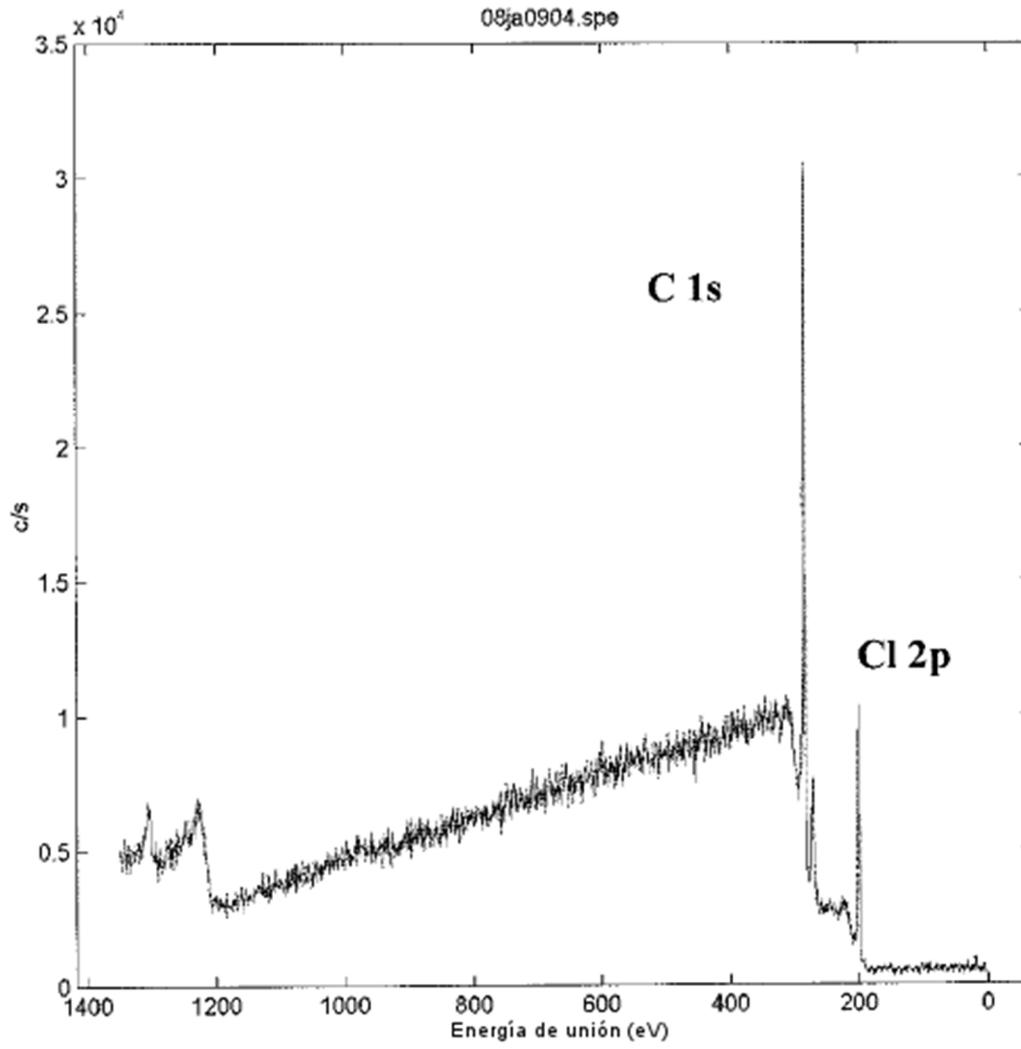


Fig. 6

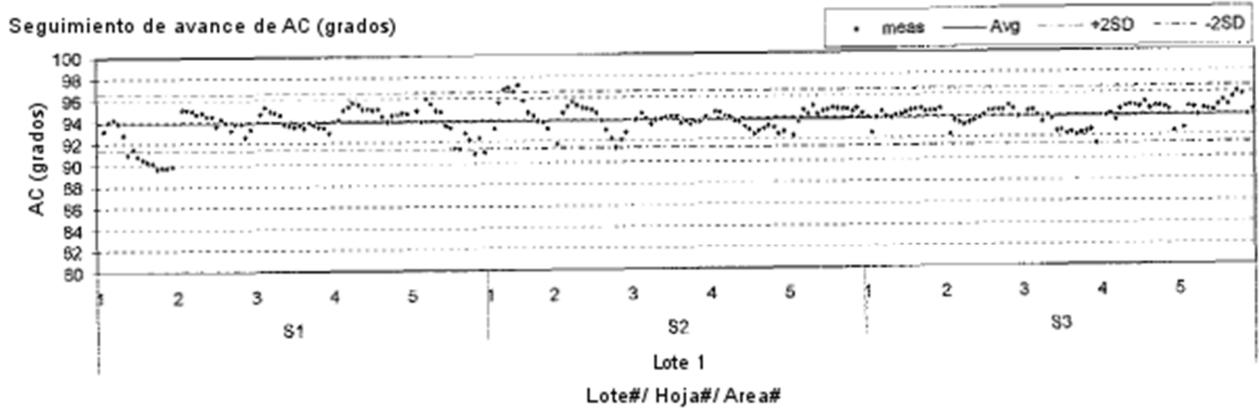


Fig. 7

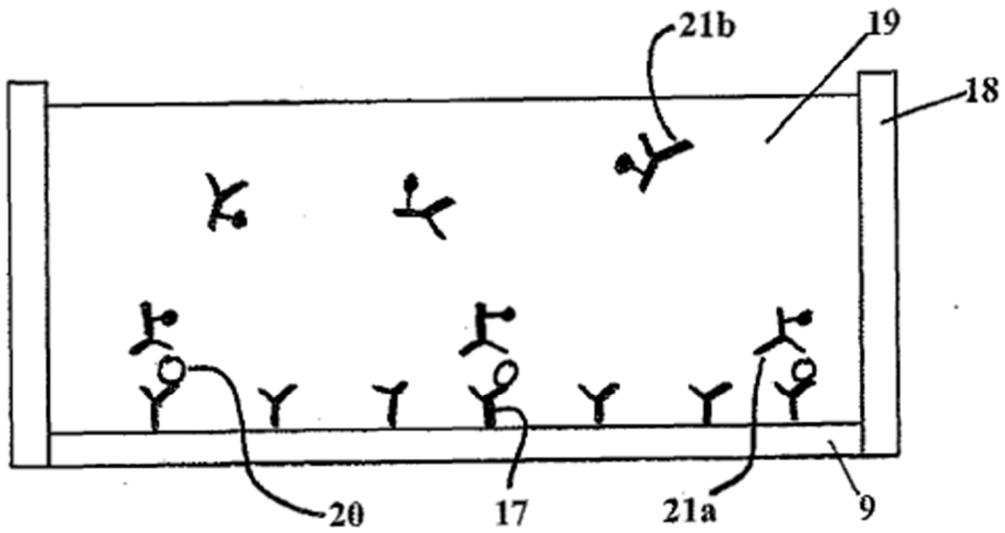


Fig. 8

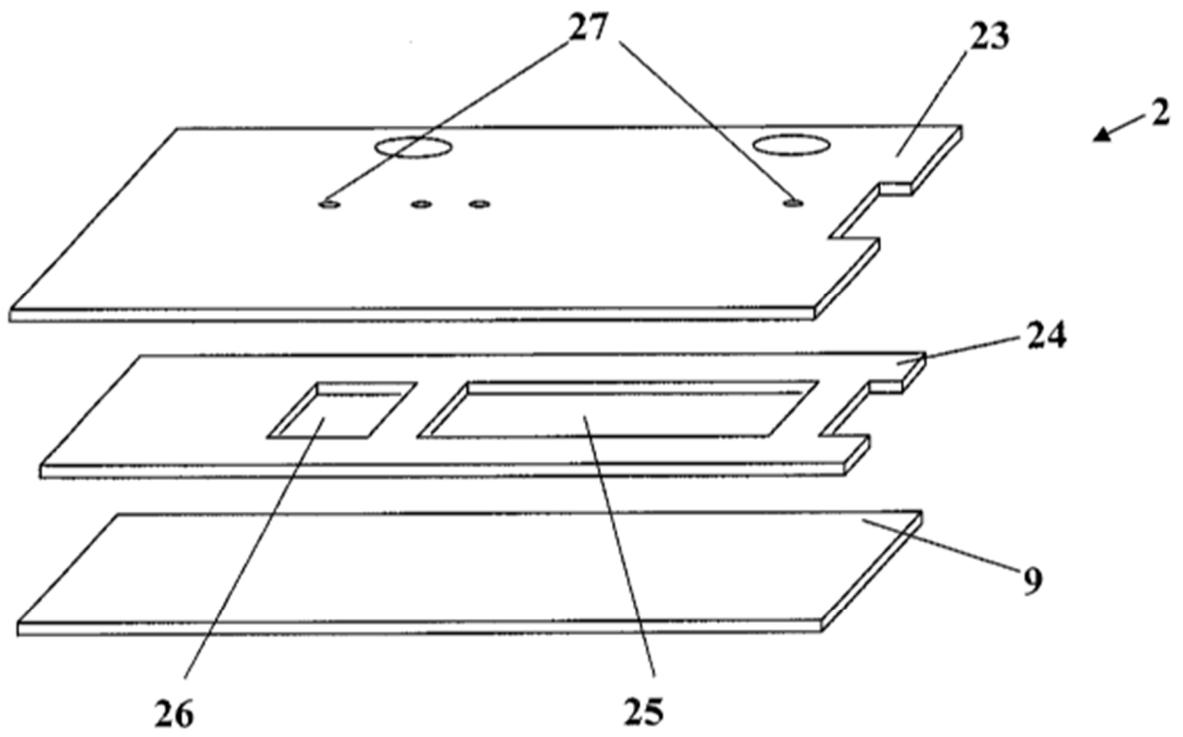
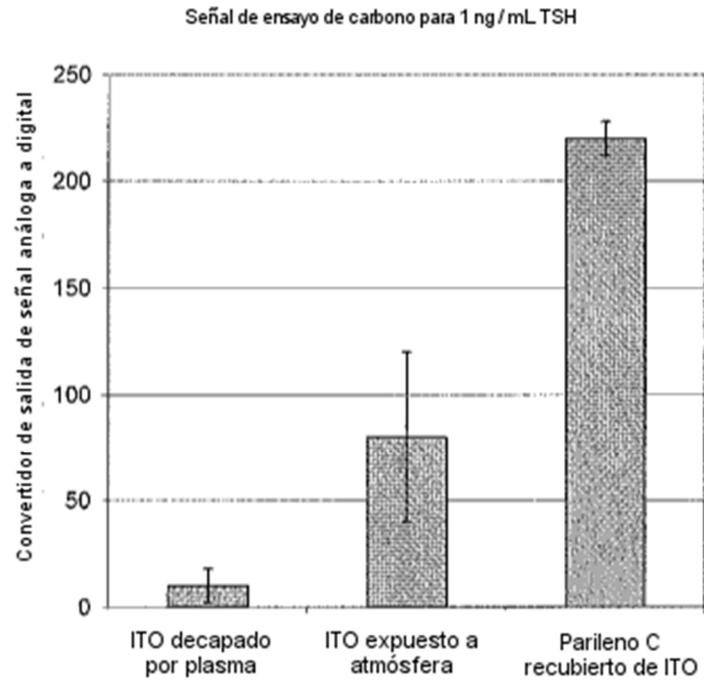


Fig. 9



**Fig. 10**