

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 706**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2015 E 15842341 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3194962**

54 Título: **Detección de masa por acoplamiento redox**

30 Prioridad:

15.09.2014 US 201462050585 P

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**QORVO US, INC. (100.0%)
7628 Thorndike Road
Greensboro, NC 27409, US**

72 Inventor/es:

**SALVATI, MICHAEL y
HARMON, IAN ROBERT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 733 706 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

Detección de masa por acoplamiento redox

5 Campo

La presente divulgación se refiere generalmente a, entre otras cosas, la detección de analitos usando resonadores de ondas acústicas de volumen de película delgada (ROAVPD).

10 Antecedentes

Los dispositivos piezoeléctricos tales como los resonadores de ondas acústicas de volumen de película delgada (ROAVPD) y tecnologías como microbalanzas de cristal de cuarzo (MCC) han sido empleados como detectores de masas desde hace tiempo. Una aplicación de resonadores piezoeléctricos se encuentra en la detección de cantidades muy pequeñas de materiales. Los resonadores piezoeléctricos usados como sensores en tales aplicaciones se denominan en ocasiones "microbalanzas". Un resonador piezoeléctrico es construido normalmente como una capa plana, delgada de material piezoeléctrico cristalino o policristalino intercalada entre dos capas de electrodos. Cuando se usa como un sensor, el resonador es expuesto al material que está siendo detectado para permitir que el material se una en una superficie del resonador.

Una forma convencional de detectar la cantidad de material unido en la superficie de un resonador de detección es operar el resonador como un oscilador en su frecuencia resonante. A medida que el material que está siendo detectado se une sobre la superficie del resonador, se reduce la frecuencia de oscilación del resonador. El cambio en la frecuencia de oscilación del resonador, causado presumiblemente por la unión del material en la superficie del resonador, se mide y usa para calcular la cantidad de material unido en el resonador o la tasa a la que el material se acumula sobre la superficie del resonador. Un cambio en la fase también puede ser usado para determinar la cantidad o la tasa del material unido o unión a la superficie del resonador.

Ha sido descrito en inmunoensayos el uso de sensores resonadores piezoeléctricos. En tales inmunoensayos, el cambio de masa atribuible a la reacción inmunológica entre un antígeno y un anticuerpo, uno de los cuales está unido a la superficie del resonador antes del ensayo, es determinado.

Sin embargo, en algunas circunstancias puede ser deseable detectar la presencia de un analito en una muestra sin unión del analito a la superficie de un resonador; p. ej., a través de un anticuerpo unido a la superficie del resonador.

Sumario

La presente invención proporciona:

Un método de detección de un analito en una muestra, que comprende:
introducir una mezcla que comprende un analito redox, uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, un precursor de precipitación soluble, y, opcionalmente o, en caso necesario, uno o más cofactores redox, en proximidad con una superficie de un resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD),

en el que el analito redox en presencia del uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, opcional de cofactores requeridos, y precursores de precipitación soluble causan redox del precursor de precipitación soluble para generar una molécula de precipitación que se precipita en la superficie del ROAVPD; y medir la masa añadida en la superficie del ROAVPD.

Un sistema de detección de un analito en una muestra, que comprende:

un resonador (20) de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD) que comprende una superficie (26) en la cual se inmoviliza un primer agente de transferencia de electrones,

estando el primer agente de transferencia de electrones configurado para unirse selectivamente a un analito o a un precursor de precipitación soluble,
teniendo el ROAVPD (20) una frecuencia de resonancia de 900 MHz o superior;

alojando uno o más recipientes (10) el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;

una vía de fluido a partir de los uno o más recipientes (10) a la superficie (26) del ROAVPD (20) al cual se une el primer agente de transferencia de electrones;

una vía de fluido para la introducción del analito con el precursor de precipitación;

un conjunto de circuitos de accionamiento (22) configurado para accionar el ROAVPD en un movimiento oscilante;

un conjunto de circuitos de medición (29) dispuesto para ser acoplado al ROAVPD (20) y configurado para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento

oscilante del resonador de detección; y
un controlador (30) acoplado operativamente con el conjunto de circuitos de accionamiento (22) y medición (29).

5 Un método de detección de la actividad o presencia de una enzima en una muestra, que comprende:

introducir una mezcla que comprende una enzima redox diana, uno o más sustratos redox para la enzima redox diana, uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, un precursor de precipitación soluble, y, opcionalmente o, en caso necesario, uno o más cofactores redox, en proximidad con una superficie de un resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD),
10 en el que la enzima redox en presencia del uno o más sustratos redox y uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, opcional de cofactores requeridos, y precursores de precipitación soluble causan redox del precursor de precipitación soluble para generar una molécula de precipitación que se precipita en la superficie del ROAVPD; y
15 medir la masa añadida a la superficie del ROAVPD.

Un sistema de detección de la actividad o presencia de una enzima redox en una muestra, que comprende:

20 un resonador (20) de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD) que comprende una superficie (26) en la cual se inmoviliza un primer agente de transferencia de electrones,

estando el primer agente de transferencia de electrones configurado para unirse selectivamente a una enzima o a un precursor de precipitación soluble,
25 teniendo el ROAVPD (20) una frecuencia de resonancia de 900 MHz o superior;

alojando uno o más recipientes (10) un sustrato para la enzima redox, el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;
una vía de fluido a partir de los uno o más recipientes (10) a la superficie (26) del ROAVPD (20) al cual se une el primer agente de transferencia de electrones;

30 una vía de fluido para la introducción de la enzima con el sustrato, el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;

un conjunto de circuitos de accionamiento (22) configurado para accionar el ROAVPD en un movimiento oscilante;
un conjunto de circuitos de medición (29) dispuesto para ser acoplado al ROAVPD y configurado para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección; y
35 un controlador (30) acoplado operativamente con el conjunto de circuitos de accionamiento (22) y medición (29).

La divulgación describe, entre otras cosas, la detección de un analito usando un ROAVPD que funciona a una alta frecuencia sin unión directa del analito en una superficie del ROAVPD. La detección del analito es indirecta con una molécula de precipitación que sirve como un sustituto para el analito. El analito es capaz de ser oxidado o reducido y donar o extraer electrones en o de un precursor de precipitación soluble o en o de un agente de transferencia de electrones intermedio que puede donar o extraer electrones en o del precursor de precipitación soluble u otro agente de transferencia de electrones intermedio. La oxidación o reducción del precursor da lugar a la molécula de precipitación.
45

En consecuencia, la molécula de precipitación es un producto de reacción redox, en la que el producto de reacción se oxida o se reduce a partir de un precursor soluble en un producto de reacción insoluble o de precipitación. La precipitación del producto de reacción redox en la superficie del ROAVPD altera la masa en la superficie cambiando de este modo una característica de resonancia del ROAVPD. La cinética del cambio o de la magnitud del cambio puede correlacionarse con la cantidad de analito en la muestra.
50

La divulgación también describe, entre otras cosas, la detección de la actividad de una enzima redox usando un ROAVPD. El ROAVPD puede funcionar a una alta frecuencia. La detección de la actividad de la enzima redox puede lograrse de una manera similar a la detección de un analito descrito anteriormente. Una muestra de ensayo que incluye supuestamente una enzima redox se puede combinar con un sustrato que puede ser oxidado o reducido por la enzima. La oxidación o reducción del sustrato se puede acoplar a la oxidación o reducción de un precursor soluble a través de una cascada redox que origina una molécula que se precipita en una superficie del ROAVPD. El cambio en la masa sobre la superficie del ROAVPD puede correlacionarse con la actividad de la enzima en la muestra de ensayo.
55

Una o más realizaciones de los aparatos, sistemas o métodos descritos en la presente memoria proporciona una o más ventajas sobre los sensores, dispositivos, sistemas o métodos anteriores de detección de una muestra de analito. Las realizaciones de los métodos, sensores, dispositivos y sistemas desvelados en la presente memoria permiten la detección de moléculas que pueden no ser particularmente susceptibles a la medición por el inmunoensayo o evento de unión. Las realizaciones de los métodos, sensores, dispositivos, y sistemas desvelados en la presente memoria crean un sensor universal que puede ser usado con una variedad de enzimas redox específicas. Estas y otras ventajas serán fácilmente comprendidas por los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada.
60
65

Breve descripción de los dibujos

Las **FIGS. 1A-1C** son diagramas esquemáticos que ilustran los principios operativos de algunas realizaciones de dispositivos de detección tipo resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD).

La **FIG. 2** es un diagrama esquemático que muestra los componentes de una realización de un sistema ROAVPD de detección de un analito.

Las **FIGS. 3A-B** son dibujos esquemáticos que ilustran una realización de un redox acoplado al analito que causa precipitación sobre una superficie de un resonador de película delgada (RPD).

Las **FIGS. 4-6** son dibujos esquemáticos que ilustran algunas realizaciones de un redox acoplado al analito que causa precipitación sobre una superficie de un RPD.

Las **FIGS. 7A-C** son dibujos esquemáticos que ilustran una realización de un redox acoplado al analito que causa precipitación sobre una superficie de un RPD.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra el cambio en la frecuencia en una fase particular de un resonador empleado generalmente en un ensayo que se representa en la FIG. 6.

Los dibujos esquemáticos no están necesariamente a escala. Los números similares usados en las figuras se refieren a componentes, etapas similares y similares. Sin embargo, se entenderá que el uso de un número para referirse a un componente en una figura dada no tiene por objeto limitar el componente en otra figura etiquetada con el mismo número. Además, el uso de números diferentes para referirse a los componentes no tiene por objeto indicar que los diferentes componentes numerados de forma diferente no pueden ser los mismos o similares.

Descripción detallada

La presente divulgación describe, entre otras cosas, la detección de un analito usando un ROAVPD que funciona a una alta frecuencia sin unión directa del analito en una superficie del ROAVPD. La detección del analito es indirecta con una molécula de precipitación que sirve como un sustituto para el analito. El analito es capaz de ser oxidado o reducido y donar o extraer electrones en o de un precursor de precipitación soluble o en o de un agente de transferencia de electrones intermedio que puede donar o extraer electrones en o del precursor de precipitación soluble u otro agente de transferencia de electrones intermedio. La oxidación o reducción del precursor, dependiendo del precursor, da lugar a la molécula de precipitación.

uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios o reactivos redox pueden fijarse a la superficie del ROAVPD. El agente de transferencia de electrones intermedio puede oxidar o reducir uno o más de los precursores de precipitación soluble, el analito diana, un cofactor, o cualquier molécula redox empleada en el ensayo de detección. En algunas realizaciones, ningún agente de transferencia de electrones intermedio u otro reactivo de ensayo está acoplado a la superficie del ROAVPD, ya que aún puede ocurrir la precipitación de la molécula de precipitación en la superficie del ROAVPD. Sin embargo, resulta preferible que al menos un agente de transferencia de electrones intermedios u otro reactivo redox se inmovilice en la superficie del ROAVPD, de modo que al menos una parte de la cascada de las reacciones redox tiene lugar en la proximidad con la superficie del ROAVPD para aumentar la probabilidad de que la molécula de precipitación se forme en proximidad con la superficie del ROAVPD. Además, inmovilizar un reactivo redox en la superficie de un resonador de ensayo pero no un resonador de referencia permite que el reactivo sea omitido de la solución o suspensión introducida a través de los resonadores de ensayo y de referencia y, por lo tanto, puede reducir o eliminar la cantidad de precipitación en el sensor de referencia debido a la ausencia del reactivo redox.

El analito y el precursor de precipitación soluble pueden mezclarse antes de moverse a través del resonador o a medida que se están moviendo por el sensor. Preferentemente, el redox del analito no es capaz de ser acoplado al redox del precursor de precipitación soluble antes de que la mezcla de ensayo se ponga en contacto con el ROAVPD. En consecuencia, al menos un reactivo redox requerido para el acoplamiento redox del analito al redox del precursor de precipitación soluble no está presente en la mezcla de ensayo hasta que la mezcla se haya puesto en contacto con el ROAVPD. Esto puede lograrse por medio de la inmovilización de un reactivo redox, tal como un agente de transferencia de electrones intermedios, a la superficie del ROAVPD, por medio de la mezcla de la muestra de analito con los otros reactivos en el momento de la introducción a través del ROAVPD, o similares.

En las realizaciones preferidas, el estado redox de cada uno de los reactivos usados se selecciona basándose en el estado redox esperado del analito para evitar la iniciación de una cascada redox y la generación de la molécula de precipitación antes del contacto de la mezcla de ensayo con el ROAVPD y evitar los resultados falsos positivos o las sobrestimaciones de la cantidad de analito presente.

Sensores, dispositivos y sistemas

Los sensores desvelados en la presente memoria incluyen al menos un sensor tipo resonador de película delgada, tal como un sensor tipo resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD). Un sensor ROAVPD incluye una capa piezoeléctrica, o sustrato piezoeléctrico, y un transductor de entrada y de salida. Los sensores ROAVPD son pequeños sensores que hacen que la tecnología sea adecuada para su uso en dispositivos portátiles.

5 En consecuencia, se contempla un dispositivo portátil para la detección de analitos diana que comprende un sensor descrito en la presente memoria.

Volviendo ahora a los dibujos con referencia a las **FIGS. 1A** y **1B**, se muestran los principios operativos generales de las realizaciones de un resonador piezoeléctrico de onda acústica de volumen **20** usado como un sensor para detectar un analito. El resonador **20** incluye normalmente una capa plana de material piezoeléctrico unido a lados opuestos por dos capas respectivas de metal que forman los electrodos del resonador. Las dos superficies del resonador están libres para someterse a un movimiento vibratorio cuando el resonador es accionado por una señal dentro de la banda de resonancia del resonador. Cuando el resonador es usado como un sensor, al menos una de sus superficies está adaptada para incluir al menos un agente de transferencia de electrones intermedio para su uso en el acoplamiento de una reacción redox de un analito con una reacción redox para convertir un precursor de precipitación soluble en una molécula de precipitación. La precipitación de la molécula de precipitación en la superficie del resonador altera las características resonantes del resonador, y los cambios en las características resonantes son detectados e interpretados para proporcionar información cuantitativa en relación con el material (analito) que está siendo detectado.

A modo de ejemplo, dicha información cuantitativa puede obtenerse por detección de un cambio en el desplazamiento de fase del coeficiente de inserción o reflexión del resonador causado por la precipitación de la molécula de precipitación en la superficie del resonador. Dichos sensores difieren de aquellos que operan el resonador como un oscilador y controlan los cambios en la frecuencia de oscilación. Más bien dichos sensores insertan el resonador en la ruta de una señal de frecuencia preseleccionada y controlan la variación del desplazamiento de fase del coeficiente de inserción o reflexión causado por la unión del material que está siendo detectado en la superficie del resonador. Por supuesto, los sensores que controlan los cambios en la frecuencia de oscilación también pueden emplearse.

Más detalladamente, La **FIG. 1A** muestra el resonador **20** antes de que la molécula de precipitación se haya precipitado en su superficie **26**. El resonador representado **20** está eléctricamente acoplado a una fuente de señal **22**, que proporciona una señal eléctrica de entrada **21** que tiene una frecuencia f en la banda de resonancia del resonador. La señal eléctrica de entrada está acoplada al resonador **20** y se transmite a través del resonador para proporcionar una señal eléctrica de salida **23**. En la realización representada, la señal de salida eléctrica **23** está en la misma frecuencia que la señal de entrada **21**, pero difiere en fase de la señal de entrada por un desplazamiento de fase $\Delta\Phi_1$, que depende de las propiedades piezoeléctricas y dimensiones físicas del resonador. La señal de salida **23** está acoplada a un detector de fase **24** que proporciona una señal de fase relacionada con el desplazamiento de fase de inserción.

La **FIG. 1B** muestra el resonador de detección **20** con la molécula de precipitación siendo precipitada en su superficie **26**. La misma señal de entrada está acoplada al resonador **20**. Debido a que las características resonantes del resonador son alteradas por la unión del material como una perturbación, el desplazamiento de fase de inserción de la señal de salida **25** es cambiado a $\Delta\Phi_2$. El cambio en el desplazamiento de fase de inserción causado por la unión de material es detectado por el detector de fase **24**. El cambio de desplazamiento de fase medido está relacionado con la cantidad del material unido en la superficie del resonador.

La **FIG. 1C** muestra una alternativa a la medición de la fase de inserción del resonador. Un acoplador direccional **27** se añade entre la fuente de señal **22** y el resonador **20** con el electrodo opuesto conectado a tierra. Un detector de fase **28** está configurado para medir el desplazamiento de fase del coeficiente de reflexión como resultado de la unión del material a la superficie del resonador. Por supuesto, se puede emplear el desplazamiento de fase de reflexión o cualquier otro cambio adecuado en la característica de resonancia del sensor.

Otros sensores de desplazamiento de fase ROAVPD que pueden emplearse con los aspectos de amplificación de señal descritos en la presente memoria incluyen los descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.409.875 titulada "RESONATOR OPERATING FREQUENCY OPTIMIZATION FOR PHASE-SHIFT DETECTION SENSORS". Por ejemplo, los aparatos de sensor pueden incluir (i) un resonador de detección que comprende uno o más agentes de transferencia de electrones unidos; (ii) un conjunto de circuitos de accionamiento configurado para accionar el resonador de detección en un movimiento oscilante; (iii) un conjunto de circuitos de medición dispuesto para ser acoplado al resonador de detección y configurado para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección; y (iv) un controlador acoplado operativamente con el conjunto de circuitos de accionamiento y medición. El controlador puede interconectarse con el almacenamiento de datos que contienen las instrucciones que, cuando son ejecutadas, provocan que el controlador ajuste la frecuencia a la que el conjunto de circuitos de accionamiento acciona el resonador de detección para mantener un punto del resonador del resonador de detección. En consecuencia, la detección puede llevarse a cabo mediante el accionamiento del ROAVPD en un movimiento oscilante; la medición de una o más señales de salida del resonador que representan las características de resonancia del movimiento oscilante del ROAVPD; y el ajuste de la frecuencia de accionamiento del resonador de detección para mantener un punto de resonancia del ROAVPD. En realizaciones, la frecuencia a la que el conjunto de circuitos de accionamiento acciona el resonador de detección es una frecuencia de retardo de grupo máximo.

Tales enfoques de detección de fase se pueden usar ventajosamente con resonadores piezoeléctricos de diferentes frecuencias resonantes.

5 En diversas realizaciones, los ROAVPD para su uso con los métodos, dispositivos, y sistema descritos en la presente memoria tienen frecuencias de resonancia de aproximadamente 500 MHz o superiores, tales como aproximadamente 700 MHz o superiores, aproximadamente 900 MHz o superiores, aproximadamente 1 GHz o superiores, aproximadamente 1,2 GHz o superiores, aproximadamente 1,5 GHz o superiores, aproximadamente 1,8 GHz o superiores, aproximadamente 2 GHz o superiores, 2,2 GHz o superiores, 2,5 GHz o superiores, aproximadamente 3 GHz o superiores, o aproximadamente 5 GHz o superiores pueden proporcionar una mayor sensibilidad cuando se
10 usan con una masa mediada por un elemento de amplificación cargada, que se describe con mayor detalle más adelante. En realizaciones, los ROAVPD tienen frecuencias de resonancia de aproximadamente 500 MHz a aproximadamente 5 GHz, tales como de aproximadamente 900 MHz a aproximadamente 3 GHz, o de aproximadamente 1,2 GHz a aproximadamente 2,5 GHz. Algunas de tales frecuencias son esencialmente superiores a las frecuencias de los resonadores piezoeléctricos descritos anteriormente.

15 Los resonadores de detección descritos en la presente memoria son resonadores de película delgada. Los resonadores de película delgada comprenden una capa delgada de material piezoeléctrico depositado en un sustrato, en lugar de usar, por ejemplo, cuarzo de corte AT. Las películas piezoeléctricas tendrán normalmente un espesor inferior a aproximadamente 5 micrómetros, tal como inferior a aproximadamente 2 micrómetros, y pueden tener
20 espesores inferiores a aproximadamente 100 nanómetros. Los resonadores de película delgada son generalmente preferidos debido a sus altas frecuencias de resonancia y las sensibilidades teóricamente más altas. Dependiendo de las aplicaciones, puede formarse un resonador de película delgada usado como el elemento de detección para soportar los modos resonantes de onda acústica de volumen longitudinal o de cizallamiento. Preferentemente, el elemento de detección está formado para soportar los modos resonantes de onda acústica de volumen de cizallamiento, ya que
25 son más adecuados para su uso en una muestra líquida.

Detalles adicionales con respecto a los dispositivos de sensor y sistemas que pueden emplear resonadores de película delgada (RPD) se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.932.953 presentada el 3 de agosto de 1999 por Drees *et al.*,

30 Los sensores RPD pueden fabricarse de cualquier manera adecuada y con cualquier material adecuado. A modo de ejemplo, un resonador puede incluir un sustrato tal como una oblea de silicio o zafiro, una capa de espejo de Bragg u otros medios de aislamiento acústico adecuados, un electrodo inferior, un material piezoeléctrico, y un electrodo superior.

35 Cualquier material piezoeléctrico adecuado puede ser usado en RPD. Ejemplos de sustratos piezoeléctricos adecuados incluyen tantalato de litio (LiTaO₃), niobato de litio (LiNbO₃), óxido de zinc (ZnO), nitruro de aluminio (AlN), titanato de circonato y plomo (PZT) y similares.

40 Los electrodos pueden estar formados de cualquier adecuado, tal como aluminio, tungsteno, oro, titanio, molibdeno, o similares. Los electrodos pueden ser depositados por deposición de vapor o se pueden formar por cualquier otro procedimiento adecuado.

45 Cualquier dispositivo o sistema adecuado puede emplear un resonador de película delgada y amplificación como se describe en la presente memoria. A modo de ejemplo con referencia a la **FIG. 2**, un sistema para detectar un analito puede incluir un recipiente **10** (o más de un recipiente), el resonador de película delgada **20**, un conjunto de circuitos de accionamiento **22**, un conjunto de circuitos de medición **29**, y electrónica de control **30**. Una vía de fluido acopla el uno o más recipientes **10** al resonador **20**. La electrónica de control **30** está acoplada operativamente al conjunto de circuitos de accionamiento y al conjunto de circuitos de medición. En realizaciones, la electrónica de control **30** está configurada para modificar la frecuencia a la que el conjunto de circuitos de accionamiento **22** oscila el resonador **20** basándose en la entrada del conjunto de circuitos de medición **29**.
50

Aún con referencia a la **FIG. 2**, el recipiente **10** (o más de un recipiente) puede albergar un agente de transferencia de electrones intermedio, un precursor de precipitación soluble, y opcionalmente una molécula de analito. Cada uno de estos reactivos se describe con mayor detalle más adelante. La electrónica de control **30** puede controlar el flujo de tales reactivos del recipiente **10** al resonador **20**; p. ej., a través de una bomba, vacío, o similares.
55

Cualquier electrónica de control **30** puede ser empleada. Por ejemplo, la electrónica de control puede incluir un procesador, un controlador, una memoria, o similares. La memoria puede incluir instrucciones legibles por ordenador que, cuando son ejecutadas por el procesador o controlador provocan que el dispositivo y la electrónica de control realicen diversas funciones atribuidas al dispositivo y a la electrónica de control descritas en la presente memoria. La memoria puede incluir cualquier medio volátil, no-volátil, magnético, óptico, o eléctrico, tal como una memoria de acceso aleatorio (RAM), memoria de solo lectura (ROM), RAM no volátil (NVRAM), ROM programable y borrable eléctricamente (EEPROM), memoria flash, o cualquier otro medio digital. La electrónica de control **30** puede incluir uno o más de un microprocesador, un controlador, un procesador de señales digitales (DSP), un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), una matriz de puertas programables de campo (FPGA), o un
60
65

conjunto de circuitos de lógica discreta o integrada equivalente. En algunos ejemplos, la electrónica de control **30** puede incluir múltiples componentes, tales como cualquier combinación de uno o más microprocesadores, uno o más controladores, uno o más DSP, uno o más ASIC, o uno o más FPGA, así como otros conjuntos de circuitos de lógica discreta o integrada. Las funciones atribuidas a la electrónica de control en la presente memoria pueden realizarse como software, firmware, hardware o cualquier combinación de estos.

Cascada redox acoplada al analito

En los métodos, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria, el reconocimiento molecular de una muestra que comprende un analito capaz de experimentar una reacción redox puede permitir la detección de un analito en una muestra. El redox del analito se acopla al redox de un precursor de precipitación soluble a través de uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios y cofactores, en caso necesario o si se desea. La cascada redox da lugar a la conversión del precursor de precipitación soluble en una molécula de precipitación, que puede precipitarse en la superficie de un ROAVPD. Los sensores ROAVPD, en intervalos de frecuencia superior descritos en la presente memoria, respondieron muy eficazmente al aumento de masa en la superficie del sensor debido a la precipitación de la molécula de precipitación.

Con referencia ahora a las **FIGS. 3A-B**, se muestran los dibujos esquemáticos que ilustran redox acoplado al analito de un precursor de precipitación soluble para convertir el precursor a una molécula de precipitación y la precipitación de la molécula de precipitación en la superficie del ROAVPD. Como se representa en la **FIG. 3A**, un agente de transferencia de electrones intermedio **100** se inmoviliza sobre una superficie **26** de un resonador **20**. Preferentemente, el agente de transferencia de electrones intermedio **100** está configurado para interactuar selectivamente con uno o ambos de analito **110** o el precursor de precipitación soluble **120** (véase la **FIG. 3B**). En algunas realizaciones, el agente de transferencia de electrones intermedio **100** está configurado para interactuar selectivamente con el precursor de precipitación soluble **120** para oxidar o reducir el precursor en proximidad con la superficie **26** del sensor **20**. En consecuencia, la molécula de precipitación **125** resultante es producida en proximidad con la superficie **26** del sensor **20**. En la realización representada en la **Fig. 3B**, el agente de transferencia de electrones intermedio **100** oxida o reduce el analito **110** para generar un producto de analito redox **115** y reduce u oxida el precursor de precipitación soluble **120** para generar la molécula de precipitación **125**, que puede precipitarse en la superficie **26** del sensor **20**. El analito **110** y el precursor de precipitación soluble **120** pueden ser añadidos en solución, suspensión o similares y moverse por el resonador **20**.

Cualquier número adecuado de agentes de transferencia de electrones intermedios puede emplearse para acoplar de manera eficaz un redox del analito con redox de la molécula de precipitación soluble. Ahora con referencia a las **FIGS. 4-5**, se representan las realizaciones que emplean múltiples agentes de transferencia de electrones intermedios, y cofactores redox asociados.

En la realización representada en la **FIG. 4**, se emplean primer **100** y segundo **140** agentes de transferencia de electrones intermedios. En la realización representada, el segundo elemento de transferencia de electrones intermedio **140** oxida o reduce el analito **110** al producto de analito redox **115**. El segundo elemento de transferencia de electrones intermedio **140** también reduce u oxida un cofactor redox **150** a un producto redox cofactor **155**. El primer agente de transferencia de electrones intermedio **100** oxida o reduce el producto redox cofactor **155** al cofactor redox **150** y reduce u oxida el precursor de precipitación soluble **120** para generar la molécula de precipitación **125**, que puede precipitarse en la superficie **26** del resonador **20**. En la realización representada, el primer elemento de transferencia de electrones intermedio **100** está unido a la superficie **26** del sensor **20**. Sin embargo, se entenderá que uno o ambos de los primer **100** o segundo **140** agentes de transferencia de electrones intermedios puedan unirse a la superficie del resonador. El cofactor **150**, el sustrato de precipitación soluble **120**, el analito **110** y opcionalmente uno de los primer **100** o segundo **140** agentes de transferencia de electrones (si no se unen a la superficie del resonador o si se desea un agente adicional) pueden introducirse en solución a través del resonador.

En la realización representada en la **FIG. 5**, un primer **100**, un segundo **140** y un tercer **160** agentes de transferencia de electrones intermedios son empleados. En la realización representada, el segundo elemento de transferencia de electrones intermedio **140** oxida o reduce el analito **110** al producto de analito redox **115**. El segundo elemento de transferencia de electrones intermedio **140** también reduce u oxida un primer cofactor redox **150** a un primer producto redox cofactor **155**. El tercer elemento de transferencia de electrones intermedio **160** oxida o reduce el primer producto redox cofactor **155** al primer cofactor redox **150**. El tercer elemento de transferencia de electrones intermedio **160** también reduce u oxida un segundo cofactor redox **170** a un segundo producto redox cofactor **175**. Los primer y segundo cofactores redox pueden ser idénticos. El primer agente de transferencia de electrones intermedio **100** oxida o reduce el segundo producto redox cofactor **175** al segundo cofactor redox **170** y reduce u oxida el precursor de precipitación soluble **120** para generar la molécula de precipitación **125**, que puede precipitarse en la superficie **26** del resonador **20**. En la realización representada, el primer elemento de transferencia de electrones intermedio **100** está unido a la superficie **26** del sensor **20**. Sin embargo, se entenderá que dos o más de los primer **100**, segundo **140** y tercer **160** elementos de transferencia de electrones intermedios pueden unirse a la superficie del resonador. Los primer **150** y segundo **170** cofactores (si son diferentes), el sustrato de precipitación soluble **120**, el analito **110** y opcionalmente uno de los primer **100**, segundo **140** o tercer **160** agentes de transferencia de electrones (si no se unen a la superficie del resonador o si se desea un agente adicional) pueden introducirse en solución, suspensión o similares

por el resonador.

Como se ha indicado anteriormente, cualquier número adecuado de agentes de transferencia de electrones intermedios y cofactores, en caso necesario, puede usarse para acoplar un redox del analito con un redox del precursor de precipitación soluble. Uno cualquiera o más de los agentes de transferencia de electrones intermedios puede ser inmovilizado sobre la superficie de los resonadores. En algunas realizaciones, ningún agente de transferencia de electrones intermedio se une a la superficie del resonador. En algunas realizaciones, uno o más reactivos redox, tales como un cofactor, se inmovilizan en la superficie del resonador. En algunas realizaciones, uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios y uno o más reactivos redox se inmovilizan sobre la superficie del resonador.

Para analitos biológicos, el primer agente de transferencia de electrones intermedios es preferentemente una enzima selectiva de analitos que tiene una alta afinidad por el analito y capaz de catalizar la oxidación o reducción del analito. Ejemplos de tales enzimas incluyen deshidrogenasas o reductasas, enzimas del metabolismo del hemo, enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, oxigenasas o hidroxilasas y similares. Ejemplos de deshidrogenasas o reductasas incluyen hidroxisteroide deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasas, aldo-ceto reductasas, biliverdina reductasas, 2,4-dienoil CoA reductasas, dihidrofolato reductasas, fosfogliceraldehído deshidrogenasas, gamma-interferón-inducible lisosomal tiol reductasa, glutamato deshidrogenasas, glutatión reductasas, ioscitrato deshidrogenasas, lactato deshidrogenasas, piruvato deshidrogenasas, citocromo P450 reductasas, dihidropteridina quinoide reductasa, tioredoxina reductasas, dominio WW que contiene oxiorreductasa y similares. Ejemplos de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo incluyen aldehído oxidasa, catalasa, ciclooxigenasas, ERp57/PDIA, glutarredoxinas, glutatión peroxidasa, mieloperoxidasas, óxido nítrico sintetasas, peroxirredoxinas, superóxido dismutasas, tioredoxinas, tioredoxina reductasas y similares. Ejemplos de oxigenasas o hidroxilasas incluyen aldehído oxidasa, ciclooxigenasas, dopamina beta-hidroxilasa, propil hidroxilasas, guanosín trifosfato (GTP) ciclohidrolasas, hidroxácido oxidasa, indoleamina dioxigenasas, quirureína 3-monooxigenasas, lipoxigenasas, lisil oxidasa, monoamina oxidasa, peptidilglicina alfa-amidación monooxigenasas, proteína disulfuro isomerasas, triptófano hidroxilasas, glucosa oxidasa y similares.

Algunas enzimas redox funcionan de manera más eficaz con o requieren cofactores redox. En consecuencia, puede ser deseable incluir uno o más cofactores adecuados en una mezcla o solución de líquido que contiene la enzima y cualquier otro agente de transferencia de electrones intermedio, el uno o más precursores de precipitación solubles, y el analito (si está presente). Los cofactores redox pueden ser cofactores redox orgánicos o inorgánicos. Ejemplos de cofactores inorgánicos incluyen iones cúpricos, iones férricos o ferrosos, iones magnesio, iones manganeso, iones molibdeno, iones níquel, iones zinc, grupos hierro-azufre y similares. Ejemplos de cofactores orgánicos incluyen nicotina adenina dinucleótido (NAD⁺), flavín adenín dinucleótido (FAD), lipoamida, ácido ascórbico, flavín mononucleótido (FMN), coenzima F420, coenzima B, coenzima Q, glutatión, hemo, pirroloquinolina quinona, tetrahidrobiopterina, y similares.

En algunas realizaciones, un agente de transferencia intermedia de electrones es una enzima que es capaz de convertir un precursor de precipitación soluble que es soluble en el entorno del ensayo respecto a una molécula de precipitante insoluble que se precipita en la superficie del resonador. Ejemplos de sistemas de enzima/precursor de precipitación que son capaces de producir una molécula de precipitación insoluble que es capaz de acumularse sobre una superficie de un ROAVPD incluyen enzimas peroxidasa, por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP) o mieloperoxidasa, y uno de los siguientes: bencideno, dihidroclorhidrato de bencideno, diaminobencideno, o-tolideno, o-dianisidina y tetrametil-bencideno, carbazoles, particularmente 3-amino-9-etilcarbazol, y varios compuestos fenólicos todos los cuales se han notificado para formar precipitados tras la reacción con peroxidasa. En algunas realizaciones, una peroxidasa está acoplada a una oxidación específica del analito por una oxidasa en la que el producto final es un peróxido (p. ej., oxidación de glucosa oxidasa de glucosa), que se acopla con un precursor de precipitación soluble que se precipita cuando se oxida. Los cofactores reducidos generados por la oxidación específica del analito por deshidrogenasas pueden estar acoplados a la reducción, y posterior precipitación de, por ejemplo, sales de tetrazolios como formazanos insolubles como cloruro de tetrazolio nitro-azul (NBT), cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio (INT) o bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio a través de la enzima diaforasa que funciona como un agente de transferencia de electrones intermedio.

En algunas realizaciones, un agente de transferencia de electrones intermedio puede ser un producto químico tal como un metosulfato de fenazina que facilita la reducción y posterior precipitación de, por ejemplo, formazanos tales como cloruro de tetrazolio nitro-azul (NBT), cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio (INT) o bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio por cofactores reducidos, tales como NADH o NADPH, generados durante la oxidación específica del analito por una deshidrogenasa.

Haciendo referencia ahora a la **FIG. 6**, una realización de un sistema de detección de analito se representa esquemáticamente. En la realización representada, una diaforasa (un agente de transferencia de electrones intermedio) se inmoviliza sobre una superficie de un sensor. La enzima diaforasa cataliza la reducción de tetrazolio (p. ej., NBT) a formazán insoluble por un cofactor reducido tal como NADH o NADPH. Durante la oxidación específica de un analito (ácido biliar en la realización representada) por una enzima (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa o 3-HSD en la realización representada) NADH o NADPH se genera como un cofactor portador de electrones usado por

la enzima. La cantidad de formazán que se precipita en la superficie o la tasa de precipitación de formazán puede correlacionarse con la cantidad de ácido biliar en la mezcla de ensayo.

Se entenderá que la **FIG. 6** presenta únicamente una realización de un ensayo específico que se puede emplear para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra a través de redox acoplado a analito que provoca una precipitación en una superficie de un sensor, tal como un ROAVPD. Por ejemplo, se puede emplear cualquier aceptor de electrones intermedio adecuado, tal como una enzima, (p. ej., los descritos anteriormente) se puede emplear para convertir un precursor de precipitación soluble (NBT en la realización representada) en una molécula de precipitación insoluble (formazán en la realización representada). La enzima no tiene que estar acoplada a la superficie del receptor.

A modo de ejemplo adicional, uno cualquiera o más de los aceptores de electrones intermedios adicionales, tales como una enzima selectiva de analito (3-HSD en la realización representada) puede ser empleado. El agente de transferencia de electrones intermedio puede unirse a la superficie del sensor o puede estar libre en la mezcla de ensayo. Cualquier cofactor o analito puede ser empleado.

Ejemplos de analitos adecuados que pueden emplearse (es decir, la presencia o cantidad de los cuales puede ensayarse usando un sistema que se describe en la presente memoria) incluyen cualquier analito capaz de experimentar una reacción redox. Preferentemente, el analito es empleado con un agente de transferencia de electrones intermedio selectivo de analito que puede catalizar o de otra manera facilitar la oxidación o reducción, según corresponda, del analito. En las realizaciones preferidas, el agente de transferencia de electrones intermedio selectivo de analito es una enzima. Ejemplos de analitos redox que tienen enzimas redox selectivas de analito incluyen ácidos biliares (la enzima puede ser 3-HSD o similares), glucosa (la enzima puede ser glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa), y similares. Se entenderá que una "analito" puede ser una clase de compuestos, tales como ácidos biliares; un compuesto específico, tal como glucosa; o ambos de una clase de compuestos y un compuesto específico. En algunas realizaciones, el analito de interés puede ser cualquier enzima que sea capaz de realizar una reacción de oxidación o reducción.

En algunas realizaciones, un polímero se precipita de la solución sobre una superficie del resonador. El polímero puede ser formado a partir de monómeros, que sirven como el precursor de precipitación soluble. Los iniciadores de la polimerización redox se pueden usar para iniciar tal polimerización y acoplar un redox del analito a la precipitación del polímero. Ejemplos de iniciadores redox incluyen bisulfuro de peroxi-disulfato-sodio y amonio, nitrato de amonio y cerio, peróxidos tales como peróxido de hidrógeno, peróxidos de alquil e hidrógeno, peroxidisulfatos, peroxidifosfatos, y similares. En algunas realizaciones, el iniciador de la polimerización se inmoviliza en la superficie del resonador; p. ej., a través del acoplamiento por medio de otra molécula. En dichas realizaciones, el polímero formador se injerta en la superficie. Para los fines de la presente divulgación, un polímero injertado a la superficie del resonador es considerado una molécula de precipitación insoluble, incluso si el polímero sería soluble en el medio disolvente o líquido si el polímero no se injertase en la superficie del resonador.

Con referencia ahora a las **FIGS. 7A-7C**, se muestran los dibujos esquemáticos que ilustran una realización en la que un iniciador de la polimerización redox **100** se injerta en la superficie **26** de un resonador **20**. El iniciador de la polimerización redox **100** sirve como un agente de transferencia de electrones intermedio en esta realización. Antes de la adición de reactivos (**FIG. 7A**), el iniciador de la polimerización no está activado y no está configurado para iniciador de polimerización. Sin embargo, después de que se añadan los reactivos, el iniciador de la polimerización **100** se activa, si el analito **110** está presente, y sirve para iniciar la polimerización de monómeros **120**. Los reactivos añadidos incluyen un analito **100** o una muestra sospechosa de contener un analito, un agente de transferencia de electrones intermedio **140**, un cofactor redox **150** y un monómero **120**. Preferentemente, el agente de transferencia de electrones intermedio **140** interactúa selectivamente con el analito **110** y facilita la oxidación o reducción del analito **110** al producto redox de analito **115**. El segundo agente de transferencia de electrones intermedio **140** también facilita la reducción u oxidación del cofactor **150** un producto redox cofactor **155**. El producto redox cofactor **155** interactúa con el iniciador de la polimerización (agente de transferencia de electrones intermedio) **100** para activar el iniciador de la polimerización y los monómeros **120** pueden polimerizarse a partir del iniciador injertado **100** para formar un polímero (molécula de precipitación) **125**.

Se entenderá que las **FIGS. 7A-C** representan una realización de cómo se puede emplear el uso de un iniciador de la polimerización como un agente de transferencia de electrones intermedio para acoplar redox de un analito con la precipitación de un polímero en una superficie de un sensor. Por ejemplo, el iniciador de la polimerización no tiene que inmovilizarse en la superficie del sensor. A modo de ejemplo adicional, tanto el agente de transferencia de electrones intermedio selectivo para el analito como el iniciador de la polimerización pueden unirse a la superficie del resonador. A modo de otro ejemplo, pueden emplearse uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios o cofactores.

Cualquier método adecuado para la inmovilización de un agente de transferencia de electrones intermedio en una superficie de un ROAVPD puede ser usado. A modo de ejemplo, un revestimiento uniforme de silano epoxi puede depositarse en la superficie del sensor usando un procedimiento de deposición de vapor. Los agentes de transferencia de electrones intermedios de ensayo y referencia, tales como un iniciador de la polimerización (que puede estar conjugado a una molécula que tiene funcionalidad apropiada para acoplarse a la superficie del resonador), una enzima o similares, pueden entonces ser depositados sobre los resonadores de ensayo y referencia usando, por ejemplo,

tecnología de nanodispensación basada en piezo. Las aminas primarias en los agentes de transferencia de electrones intermedios reaccionan con los grupos epóxido que unen covalentemente el agente de transferencia de electrones a la superficie del sensor. A modo de ejemplo adicional, un grupo tiol, si está presente, del agente de transferencia de electrones puede unirse a un grupo azufre o sulfidrilo en la superficie, o revestirse en la superficie, del ROAVPD. La superficie del ROAVPD puede ser modificada, según sea apropiado o necesario, para permitir la unión del agente de transferencia de electrones intermedio.

En diversas realizaciones, la presencia o actividad de una enzima redox se puede detectar usando principios similares a los descritos anteriormente con respecto a la detección de un analito. El analito podría ser considerado como una enzima y la cantidad, actividad o la cantidad y actividad de la enzima pueden detectarse generalmente como se ha descrito anteriormente. Se entenderá que una mayor actividad con menos cantidad de enzima puede dar lugar a una señal mayor que la menor actividad con más enzima. En consecuencia, en las realizaciones, la combinación de la actividad y la cantidad de una enzima redox pueden detectarse en una muestra. Una muestra de ensayo que incluye supuestamente una enzima redox se puede combinar con una cantidad de un sustrato que puede ser oxidado o reducido por la enzima. La oxidación o reducción del sustrato se puede acoplar a la oxidación o reducción de un precursor soluble a través de una cascada redox que origina una molécula de precipitación que se precipita en una superficie del ROAVPD. El cambio en la masa sobre la superficie del ROAVPD puede correlacionarse con la actividad de la enzima en la muestra de ensayo.

Uno o más elementos de transferencia de electrones intermedios u otros agentes redox, tales como cofactores, pueden acoplarse a la superficie de un ROAVPD; p. ej., como se ha descrito anteriormente. En este caso, la enzima a detectar se añadirá a la muestra y no servirá como elemento de transferencia intermedia de electrones unido a ROAVPD.

Por medio de la ilustración y con referencia a la **FIG. 4**, la enzima redox a detectar puede ser el elemento considerado **140**. Una cantidad conocida de sustrato **110** para la enzima puede mezclarse con la enzima **140** antes o cuando la muestra que contiene la enzima **140** se mueve a través de la superficie **26** del sensor **20**. Si la enzima **140** está presente y tiene actividad, la enzima **140** puede oxidar o reducir el sustrato **110** a un producto de sustrato redox **115**. En la realización representada, la enzima **140** también reduce u oxida un cofactor redox **150** a un producto redox cofactor **155**. Un agente de transferencia de electrones intermedio **100** oxida o reduce el producto redox cofactor **155** al cofactor redox **150** y reduce u oxida el precursor de precipitación soluble **120** para generar la molécula de precipitación **125**, que puede precipitarse en la superficie **26** del resonador **20**. El cofactor **150**, el sustrato de precipitación soluble **120**, el sustrato **110** y la enzima **140** pueden introducirse en solución a través del resonador en el cual se une el elemento de transferencia de electrones intermedio **100**.

Si bien se ha descrito con respecto a la **FIG. 4**, se entenderá que la detección de la presencia o actividad de una enzima se puede lograr mediante modificación adecuada de cualquiera de las realizaciones adecuadas descritas anteriormente con respecto a la detección de un analito. Por ejemplo, la enzima puede ser sustituida con un elemento de transferencia de electrones intermedio **140** o **160** en la **FIG. 6** y el sustrato puede ser sustituido con un elemento **150** o **170**.

Usos

Los sensores, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria pueden ser empleados para detectar un analito en una muestra. Los sensores pueden encontrar uso en numerosas aplicaciones químicas, ambientales, seguridad alimentaria, o médicas. A modo de ejemplo, una muestra a ensayar puede ser, o puede derivarse de sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, y similares. Otras composiciones de ensayo que no son composiciones de fluido pueden disolverse o suspenderse en una solución o disolvente apropiado para análisis.

Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen significados comúnmente usados en la técnica, a menos que se especifique otra cosa. Las definiciones proporcionadas en la presente memoria son para facilitar la comprensión de ciertos términos usados con frecuencia en la presente memoria y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente divulgación.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una", y "el", "la" abarcan las realizaciones que tienen referentes en plural, a no ser que el contenido indique claramente lo contrario.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, el término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario. El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de cualquiera dos o más de los elementos enumerados.

Como se usa en la presente memoria, "tener", "que tiene", "incluir", "que incluye", "comprender", "que comprende" o similares se usan en su sentido abierto, y generalmente significan "que incluyen, pero no se limitan a". Se entenderá que "que consiste esencialmente en", "que consiste en", y similares se subsumen en "que comprende" y similares. Como se usa en la presente memoria, "que consiste esencialmente en", en cuanto se refiere a una composición,

producto, método o similares, significa que los componentes de la composición, producto, método o similares se limitan a los componentes enumerados y cualesquiera componentes que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s) de la composición, producto, método o similares.

5 Las palabras "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden proporcionar ciertos beneficios, bajo ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden preferirse otras realizaciones, bajo las mismas circunstancias u otras. Además, la recitación de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no tiene por objeto excluir otras realizaciones del alcance de la divulgación, incluyendo las reivindicaciones.

10 Asimismo, en la presente memoria, las recitaciones de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números subsimidos en ese intervalo (p. ej., 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc. o 10 o menos incluye 10, 9,4, 7,6, 5, 4,3, 2,9, 1,62, 0,3, etc.). Cuando un intervalo de valores es "hasta" un valor particular, ese valor está incluido dentro del intervalo.

15 Cualquier dirección que se hace referencia en la presente memoria, tal como "superior", "inferior", "izquierda", "derecha", "arriba", "abajo", y otras direcciones y orientaciones se describen en el presente documento para mayor claridad en referencia a las figuras y no deben ser limitativas de un dispositivo o sistema o uso actual del dispositivo o sistema. Dispositivos o sistemas que se describen en la presente memoria pueden usarse en una serie de direcciones y orientaciones.

20 Como se usa en la presente memoria, un "analito redox" es un analito capaz de ser oxidado o reducido. Preferentemente, el analito redox es capaz de interactuar con una enzima redox que puede catalizar la oxidación o reducción del analito.

25 Como se usa en la presente memoria, un agente de transferencia intermedia de electrones o enzima que es "selectiva" para una molécula es un agente de transferencia o enzima que interactúa selectivamente con la molécula, tal como un analito o un precursor de precipitación. "Interactúa selectivamente" significa interactúa con la molécula de interés con un grado esencialmente superior de especificidad que con otras moléculas. Por ejemplo, un agente de transferencia o enzima selectivo puede interactuar con una molécula de interés con una especificidad 5 veces o superior (p. ej., 10 veces o superior, 50 veces o superior, o 100 veces o superior) que con otros reactivos presentes en una mezcla de ensayo. En algunos casos, un agente de transferencia de electrones o una enzima puede ser selectivo para más de una molécula (p. ej., un analito y un cofactor o un precursor de precipitación y un cofactor).

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para describir más detalladamente la manera de usar los sensores, métodos, dispositivos y sistemas descritos anteriormente. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera sirven para limitar el alcance de esta divulgación o las reivindicaciones que siguen, sino que más bien se presentan para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Redox acoplado a analito de molécula de precipitación - Prueba de concepto

45 El siguiente ejemplo emplea generalmente un sistema de ensayo como se representa en la FIG. 6. Los resultados se presentan en la FIG. 8. La FIG. 8 muestra la respuesta de dosis de ácido taurocólico enriquecido en suero humano normal en un intervalo clínicamente útil. La mezcla de reacción incluyó NAD⁺ 1,75 mM, 0,4 mg/ml de NBT, 0,1 U/ml de 3-HSD en Tris pH 7,5. Los sensores fueron silano epoxi recubiertos con sensores Rev 3 recubiertos con 0,2 mg/ml de diaforasa (canal de ensayo) y 0,2 mg/ml de ASB (canal de referencia). El ensayo combinó 60 ul de mezcla de reacción, 10 ul de muestra, 38 ul de Tris pH 7,5, que se hizo pasar sobre el sensor durante 2 minutos. Los datos analizados y mostrados en la FIG. 8 son el ajuste lineal de los primeros 15 segundos de datos de respuesta.

50 Así, se desvelan las realizaciones de DETECCIÓN DE MASA POR ACOPLAMIENTO REDOX. Un experto en la materia apreciará que los métodos, dispositivos y sistemas descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica con realizaciones distintas de las desveladas. Las realizaciones desveladas están presentes para fines de ilustración y no de limitación. También se entenderá que los componentes de los métodos, dispositivos y sistemas representados y descritos con respecto a las figuras y realizaciones en la presente memoria pueden ser intercambiables.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un analito en una muestra, que comprende:

5 introducir una mezcla que comprende un analito redox, uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, un precursor de precipitación soluble, y, opcionalmente o, en caso necesario, uno o más cofactores redox, en proximidad con una superficie de un resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD),
 10 en el que el analito redox en presencia del uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, opcional de cofactores requeridos, y precursores de precipitación soluble causan redox del precursor de precipitación soluble para generar una molécula de precipitación que se precipita en la superficie del ROAVPD; y medir la masa añadida a la superficie del ROAVPD.

15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos uno de los agentes de transferencia de electrones intermedios es una enzima selectiva para el analito.

20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la mezcla comprende al menos dos agentes de transferencia de electrones intermedios, en el que al menos uno de los agentes de transferencia de electrones intermedios es una enzima selectiva para el analito y en el que al menos uno de los agentes de transferencia de electrones es selectivo para el precursor de precipitación soluble.

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la medición de la masa añadida o unida a la superficie del ROAVPD comprende:

25 acoplar una señal eléctrica de entrada al ROAVPD, teniendo la señal eléctrica de entrada una frecuencia en una banda de resonancia del resonador piezoeléctrico, en el que la frecuencia es de aproximadamente 900 MHz o superior;
 transmitir la señal eléctrica de entrada a través o por el ROAVPD para generar una señal eléctrica de salida que tiene una frecuencia;
 30 recibir la señal eléctrica de salida del ROAVPD; y determinar un cambio en el desplazamiento de fase de la señal eléctrica de salida causada por la deposición del precipitado en la superficie del ROAVPD.

35 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que al menos uno de los elementos de transferencia de electrones intermedios es una enzima.

6. Un sistema de detección de un analito en una muestra, que comprende:

40 un resonador (20) de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD) que comprende una superficie (26) en la cual se inmoviliza un primer agente de transferencia de electrones,

estando el primer agente de transferencia de electrones configurado para unirse selectivamente a un analito redox o a un precursor de precipitación soluble,
 45 teniendo el ROAVPD (20) una frecuencia de resonancia de 900 MHz o superior;

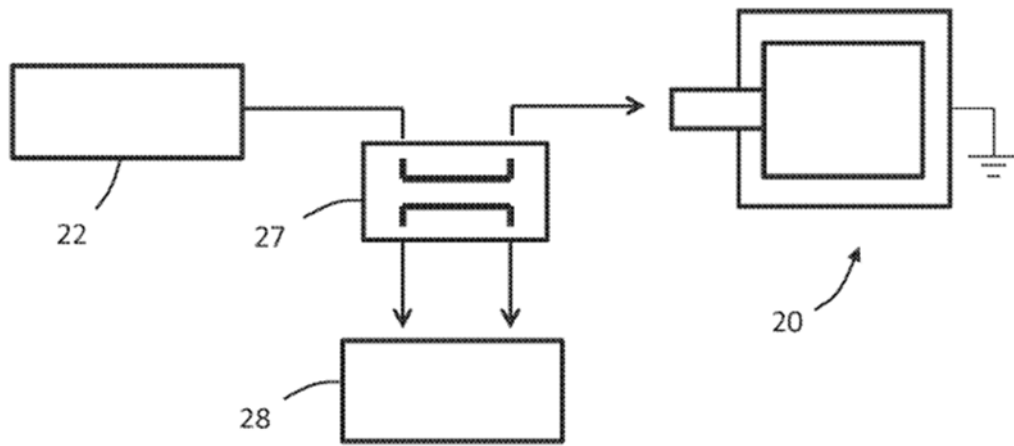
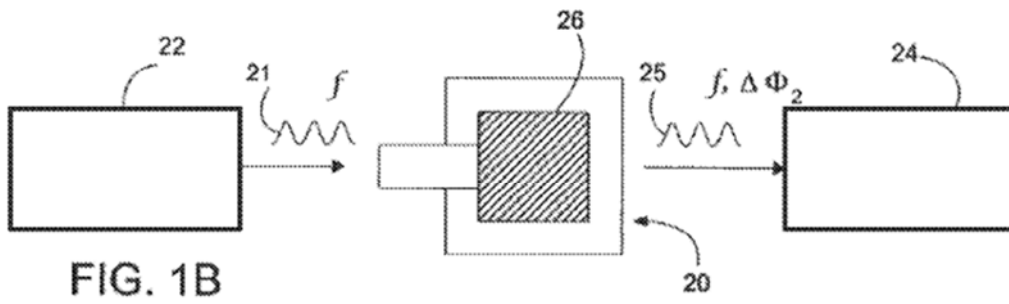
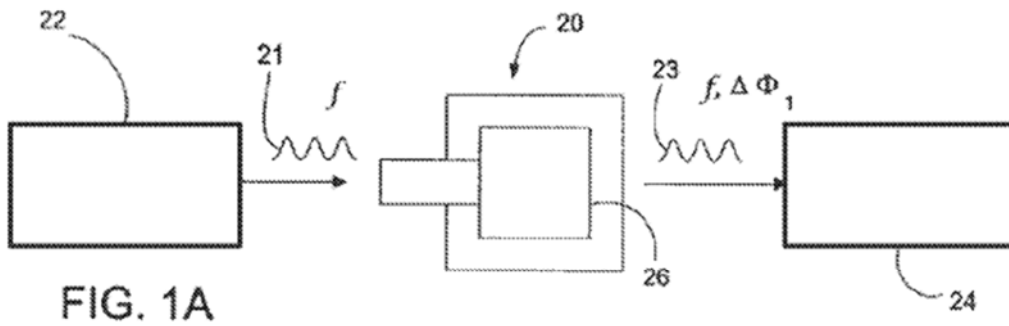
alojando uno o más recipientes (10) el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;
 una vía de fluido a partir de los uno o más recipientes (10) a la superficie (26) del ROAVPD (20) al cual se une el primer agente de transferencia de electrones;
 50 una vía de fluido para la introducción del analito con el precursor de precipitación;
 un conjunto de circuitos de accionamiento (22) configurado para accionar el ROAVPD en un movimiento oscilante;
 un conjunto de circuitos de medición (29) dispuesto para ser acoplado al ROAVPD (20) y configurado para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección; y
 55 un controlador (30) acoplado operativamente con el conjunto de circuitos de accionamiento (22) y medición (29).

7. Un método de detección de la actividad o presencia de una enzima en una muestra, que comprende:

60 introducir una mezcla que comprende una enzima redox diana, uno o más sustratos redox para la enzima redox diana, uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, un precursor de precipitación soluble, y, opcionalmente o, en caso necesario, uno o más cofactores redox, en proximidad con una superficie de un resonador de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD),
 en el que la enzima redox en presencia del uno o más sustratos redox y uno o más agentes de transferencia de electrones intermedios, opcional de cofactores requeridos, y precursores de precipitación soluble causan redox del precursor de precipitación soluble para generar una molécula de precipitación que se precipita en la superficie del ROAVPD; y

medir la masa añadida a la superficie del ROAVPD.

- 5 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, en el que al menos uno o más de los agentes de transferencia de electrones intermedios puede ser inmovilizado sobre la superficie del ROAVPD.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8, en el que al menos uno de los agentes de transferencia de electrones es selectivo para el precursor de precipitación soluble.
- 10 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la medición de la masa añadida o unida a la superficie del ROAVPD comprende:
- 15 acoplar una señal eléctrica de entrada al ROAVPD, teniendo la señal eléctrica de entrada una frecuencia en una banda de resonancia del resonador piezoeléctrico, en el que la frecuencia es de aproximadamente 900 MHz o superior;
- transmitir la señal eléctrica de entrada a través o por el ROAVPD para generar una señal eléctrica de salida que tiene una frecuencia;
- recibir la señal eléctrica de salida del ROAVPD; y
- 20 determinar un cambio en el desplazamiento de fase de la señal eléctrica de salida causado por la deposición del precipitado en la superficie del ROAVPD.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 10, en el que el cambio en el desplazamiento de fase es un cambio en el desplazamiento de fase de coeficiente de inserción o reflexión.
- 25 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 11, en el que la medición de la masa añadida o unida a la superficie del ROAVPD comprende:
- el accionamiento del ROAVPD en un movimiento oscilante a una frecuencia de aproximadamente 900 MHz o superior;
- 30 la medición de una o más señales de salida del resonador que representan las características de resonancia del movimiento oscilante del ROAVPD; y
- el ajuste de la frecuencia de accionamiento del resonador de detección para mantener un punto de resonancia del ROAVPD.
- 35 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el punto de resonancia del ROAVPD es un punto de retardo de grupo máximo.
- 40 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 10 a 13, en el que la frecuencia es: aproximadamente 1,8 GHz o superior; o aproximadamente 2 GHz o superior; o de 900 MHz a 10 GHz; o de 2 GHz a 2,5 GHz.
15. Un sistema de detección de la actividad o presencia de una enzima redox en una muestra, que comprende:
- 45 un resonador (20) de onda acústica de volumen de película delgada (ROAVPD) que comprende una superficie (26) en la cual se inmoviliza un primer agente de transferencia de electrones,
- estando el primer agente de transferencia de electrones configurado para unirse selectivamente a una enzima o a un precursor de precipitación soluble,
- teniendo el ROAVPD (20) una frecuencia de resonancia de 900 MHz o superior;
- 50 alojando uno o más recipientes (10) un sustrato para la enzima redox, el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;
- una vía de fluido a partir de los uno o más recipientes (10) a la superficie (26) del ROAVPD (20) al cual se une el primer agente de transferencia de electrones;
- 55 una vía de fluido para la introducción de la enzima con el sustrato, el precursor de precipitación y, opcionalmente o, si se requiere, uno o más cofactores redox;
- un conjunto de circuitos de accionamiento (22) configurado para accionar el ROAVPD en un movimiento oscilante;
- un conjunto de circuitos de medición (29) dispuesto para ser acoplado al ROAVPD y configurado para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección; y
- 60 un controlador (30) acoplado operativamente con el conjunto de circuitos de accionamiento (22) y medición (29).



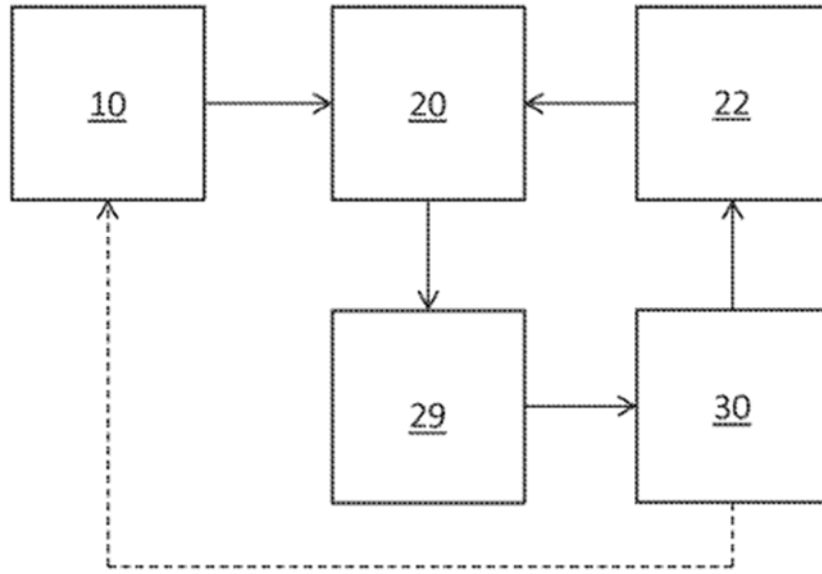


FIG. 2

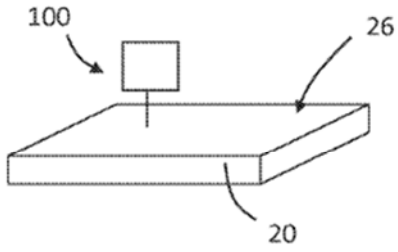


FIG. 3A

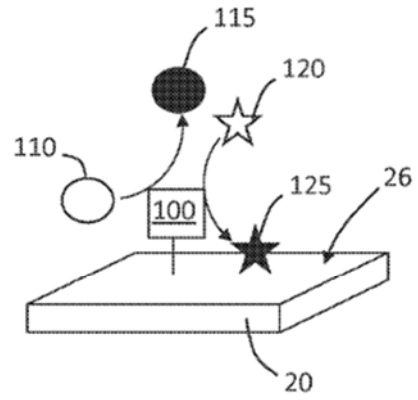


FIG. 3B

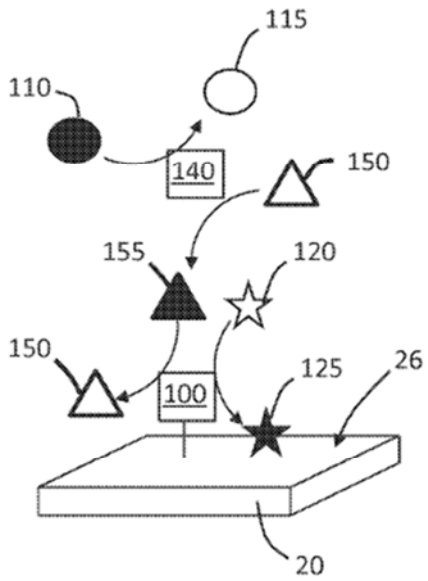


FIG. 4

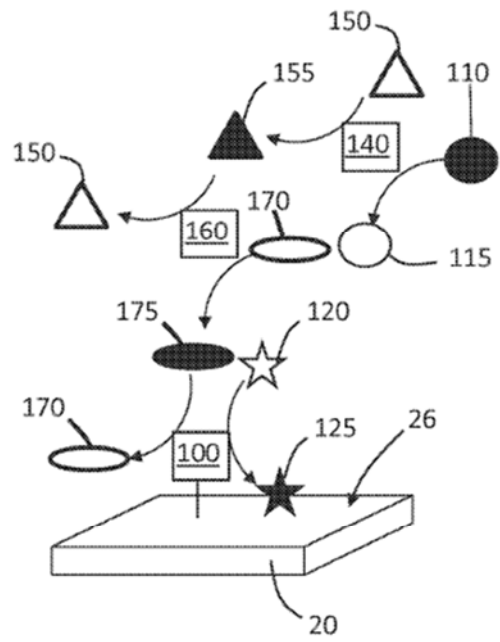


FIG. 5

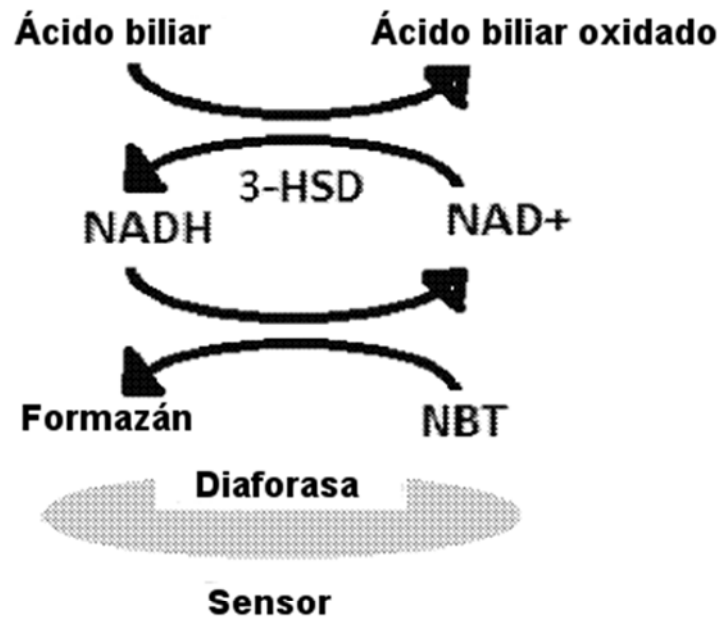


FIG. 6

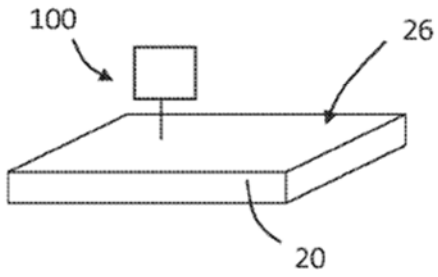


FIG. 7A

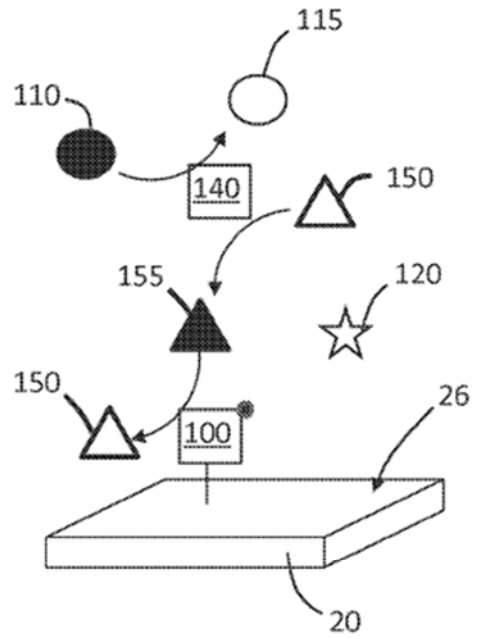


FIG. 7B

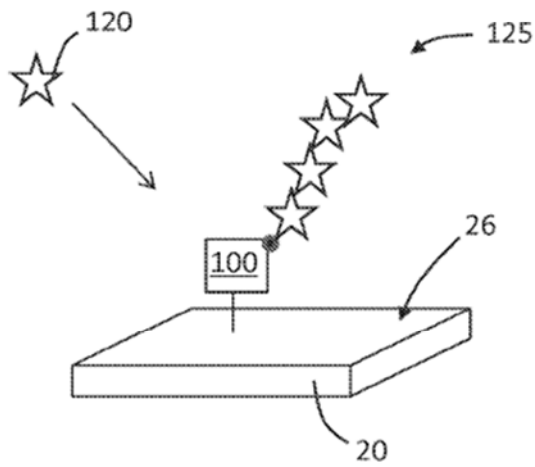


FIG. 7C

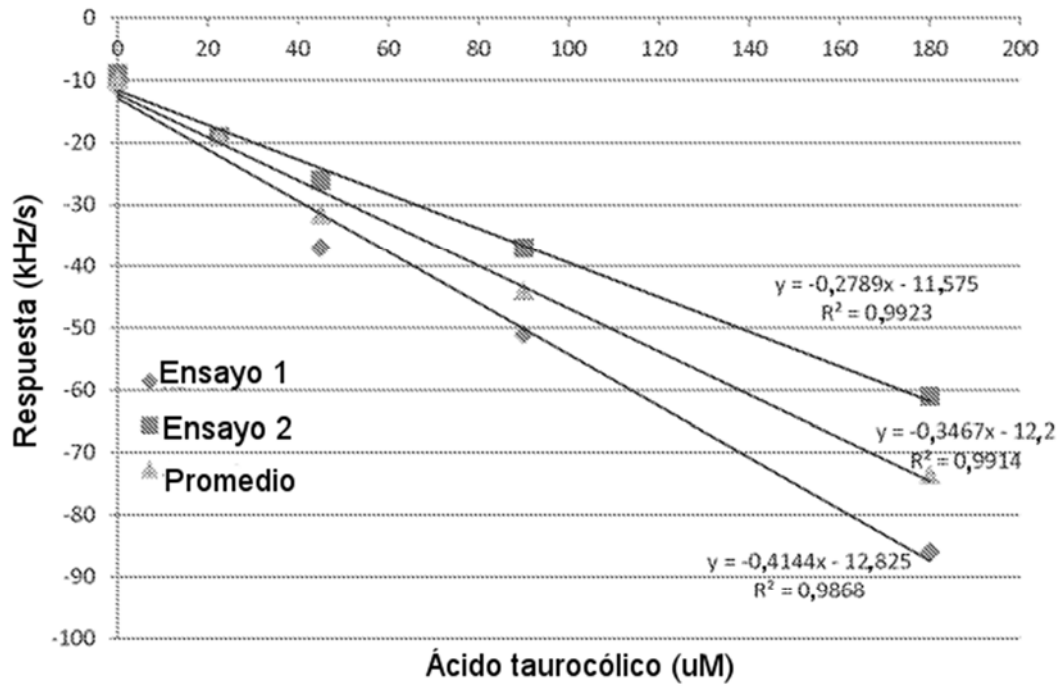


FIG. 8