

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 789**

21 Número de solicitud: 202430041

51 Int. Cl.:

G01N 27/72 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

18.01.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.07.2024

Fecha de concesión:

11.12.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.12.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(80.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia - i2T Camí de Vera,
s/n - Edificio 8G - Acceso A - Planta 3
46022 Valencia (Valencia) ES y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (ESTUDI GENERAL)
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**ALCAÑIZ FILLOL, Miguel;
GIMÉNEZ ROMERO, David;
MASOT PERIS, Rafael;
SILVESTRE NOGUERA MURRAY, Patricia y
PASTOR NAVARRO, Nuria**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **SISTEMA Y MÉTODO DE DETECCIÓN DE ANALITOS**

57 Resumen:

Sistema y método de detección de analitos, donde el sistema comprende: uno o más circuitos LC, cada uno con un condensador y una bobina plana; al menos un receptor dispuesto sobre las bobinas de los circuitos LC y configurado para interactuar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento; y al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito por la modificación del camino dieléctrico entre espiras que produce una variación de la capacitancia parásita inter- espiras de la bobina. El sistema puede usarse de forma auto-soportada, en una tira reactiva o en una tira de flujo lateral.

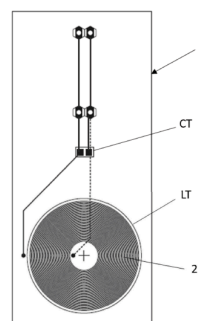


FIG. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 975 789 B2

DESCRIPCIÓN

SISTEMA Y MÉTODO DE DETECCIÓN DE ANALITOS

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del área de sistemas de detección de analitos, más en particular, de patógenos.

- 10 La invención se refiere a un sistema de detección de analitos que hace uso de un circuito LC para su sensado. El sistema de la invención puede ser aplicado en gases y líquidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Los biosensores sin etiquetas (label-free) se suelen clasificar según el tipo de transductor en plataformas con reactivos y plataformas sin reactivos.

- Las plataformas tradicionales sin reactivos y sin etiquetas son las ópticas (como el SPR), los espectros de interferencia óptica, la gravimetría (por ejemplo, microbalanza de cristal de cuarzo QCM) y la electroquímica. El elevado coste de los biosensores sin reactivos ni etiquetas basados en SPR y QCM impide su utilización generalizada.
- 20

- Los circuitos RLC son generalmente utilizados para realizar filtros de frecuencias, o de transformadores de impedancia. Este sensor consta de un inductor, una resistencia y un condensador, pudiendo involucrar múltiples inductores y condensadores, hablando entonces de redes LC. Como la frecuencia de resonancia del circuito RLC es sensible al entorno circundante debido a la dependencia del valor de la inductancia con la permeabilidad magnética del medio, estos también se usan como sensores de proximidad sin contacto. Cuanto más cerca esté el objetivo del circuito, más efectos
- 25
- 30 tienen sobre la magnitud y la frecuencia de la oscilación. El alcance de detección de un sensor RLC depende del tipo de material que altere el campo magnético del inductor. Los metales ferrosos, como el hierro y el acero, permiten un mayor alcance de detección, mientras que los metales no ferrosos, como el aluminio y el cobre, pueden reducir el alcance de detección hasta en un 60%.

35

Entre las aplicaciones más comunes de los sensores RLC se encuentran los detectores de metales, los semáforos, los túneles de lavado y una serie de procesos industriales automatizados. Dado que el sensor no requiere contacto físico, resulta especialmente útil en aplicaciones de difícil acceso.

5

También se han desarrollado en el estado de la técnica sensores RLC en disolución que detectan alteraciones de campos magnéticos (permeabilidad magnética) debidas a la presencia de partículas magnéticas.

10 Sin embargo, no se ha localizado en el estado de la técnica ninguna solución que permita detectar con sensores LC sistemas orgánicos no unidos a partículas magnéticas a un bajo coste y con alta robustez.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

La invención se refiere a un sistema de detección de analitos que permite la detección mediante un circuito LC.

El sistema de detección basa la detección en cambios que se producen en la permitividad eléctrica en las inmediaciones de un inductor del circuito LC, debidas a la formación de un complejo de reconocimiento entre el analito y un receptor sobre la superficie del inductor. La formación de estos complejos modifica las capacitancias parásitas del inductor y, en consecuencia, la frecuencia de resonancia del circuito LC. Sin embargo, la formación del complejo de reconocimiento no produce cambios en el campo magnético del inductor, pues dicho complejo de reconocimiento no tiene propiedades magnéticas relevantes.

20

25

El sistema de la invención hace uso de las capacidades parásitas de los inductores para detectar de modo preciso analitos. Dichos analitos son reconocidos específicamente por los receptores unidos sobre la superficie del inductor de los circuitos LC.

30

El mecanismo de detección del transductor propuesto se fundamenta en el empleo de las capacidades parásitas inter-espiras del inductor de los circuitos LC (inductancia-condensador), es decir la modificación de la constante dieléctrica del medio, para la detección y monitorización de los analitos tales como bacterias y virus y otras especies químicas.

35

Así, la invención se refiere a un sistema de detección de analitos que comprende uno o más circuitos LC. Los circuitos LC, a su vez, comprenden una bobina plana y un condensador.

5

Preferentemente, el circuito equivalente de un inductor plano incluye no solo el valor de inductancia pura (LS) sino también algunos otros componentes parásitos como resistencia en serie (RS) y capacitancia inter-espiras (CS).

10 El sistema de la invención además comprende al menos un receptor dispuesto sobre la bobina plana del circuito LC y configurado para interactuar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento.

También, el sistema de la invención comprende al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC. El dispositivo de detección está configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC. Dichas variaciones en la frecuencia de resonancia se producen al formarse el complejo de reconocimiento, por la modificación del camino dieléctrico entre espiras que produce una variación de la capacitancia parásita inter-espiras de la bobina, de modo que sirven
20 para determinar la presencia del analito.

En una primera realización, el sistema de detección de la invención puede usarse como detector ambiental, de modo que el conjunto de circuitos LC con los receptores están situados sobre un soporte y en contacto con el ambiente.

25

Alternativamente, el sistema de la invención además puede comprender una tira reactiva de material poroso, que hará las funciones de soporte.

En este caso, el sistema de detección de analitos de la invención comprende:

- 30 - uno o más circuitos LC que comprenden: una bobina plana y un condensador;
- al menos un receptor configurado para interactuar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
- una tira reactiva de material poroso, que comprende: una primera cara, sobre
35 la que se disponen los circuitos LC, y una segunda cara, a la que se adhiere el al menos un receptor; y

- al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito.

5

La tira reactiva, preferiblemente, puede estar fabricada con nitrocelulosa o tereftalato de polietileno.

Alternativamente, el sistema de la invención además puede comprender al menos una tira de flujo lateral.

En este caso, el sistema de detección de analitos de la invención comprende:

- uno o más circuitos LC que comprenden: una bobina plana y un condensador;
- al menos un receptor configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
- al menos una tira de flujo lateral, que comprende:
 - o una primera cara, que comprende una región receptora y una región de captura, definida por una o más líneas de captura en las que se adhiere el al menos un receptor, y
 - o una segunda cara, sobre la que se disponen los circuitos LC en una posición correspondiente a la posición de las líneas de captura; y
- al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito.

15

20

25

La tira de flujo lateral comprende una región receptora y una región de captura.

En este caso, los circuitos LC se disponen en una línea de test y/o control de la tira de flujo lateral y el al menos un receptor se adhiere a la línea de test y/o control de la tira de flujo lateral.

Adicionalmente, la tira de flujo lateral además puede comprender una región de depósito situada en un extremo opuesto de la tira a la región receptora.

35

En este caso, el al menos un receptor puede ser un agente de detección inmovilizado adherido a la línea de test y/o control de la tira de flujo lateral.

Más preferiblemente, el sistema de la invención comprende además un conjugado de nanopartículas de oro o carbono situado sobre el receptor para amplificar las variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC al formarse el complejo de reconocimiento.

De forma preferente, en el sistema de la invención, el receptor puede formar una monocapa autoensamblada con los circuitos LC.

El sistema de la invención también puede comprender un módulo de comunicación inalámbrico que conecta el al menos un dispositivo de detección con los circuitos LC.

La presente invención también se refiere a un método de detección de analitos que comprende las etapas de:

- proveer uno o más circuitos LC, cada uno comprendiendo: una bobina plana y un condensador;
- disponer al menos un receptor en contacto con el circuito LC configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento; y
- determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC al formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC.

25

En un segundo conjunto de realizaciones, el método puede comprender las etapas de:

- proveer uno o más circuitos LC que comprenden: una bobina plana y un condensador;
- proveer al menos un receptor configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
- proveer una o más tiras reactivas de material poroso;
- adherir los circuitos LC a una primera cara de las tiras reactivas;
- disponer el al menos un receptor en una segunda cara de la tira reactiva en una posición correspondiente con la posición del circuito LC;
- sumergir las tiras reactivas en un fluido muestra para formar el complejo de reconocimiento; y

35

- determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC al formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC.

- 5 Además, el método de la invención también puede comprender una etapa de amplificar una señal del dispositivo de detección generada por la variación en la frecuencia de resonancia del circuito LC mediante formato sándwich, sumergiendo la tira en una disolución con un receptor marcado.
- 10 Preferiblemente, el método también puede implementar una etapa de lavar el fluido muestra, antes de sumergir las tiras reactivas en dicho fluido muestra.

Alternativamente, en un tercer conjunto de realizaciones, el método de la invención puede comprender las etapas de:

- 15 - proveer uno o más circuitos LC que comprenden: una bobina plana y un condensador;
- proveer al menos un receptor configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento, en contacto con el circuito LC;
- 20 - proveer una o más tiras de flujo lateral, que comprende una primera cara que comprende, a su vez, una región receptora y una región de captura, definida por una o más líneas de captura;
- adherir el al menos un receptor a las líneas de captura de la tira de flujo lateral,
- 25 - adherir los circuitos LC a una segunda cara en una posición correspondiente a la posición de las líneas de captura;
- depositar un fluido muestra en la región receptora de las tiras de flujo lateral para su migración hacia las líneas de captura y para formar el complejo de reconocimiento; y
- 30 - determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC al formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC.

- En el contexto de la invención, el término “patógeno” hace referencia a diferentes agentes infecciosos bacterianos, víricos, parasitarios y fúngicos. La resistencia de varios agentes infecciosos a fármacos también puede determinarse usando la presente
- 35

invención. Una amplia variedad de enfermedades infecciosas, causadas por dichos agentes, también pueden detectarse o determinarse mediante el procedimiento de la presente invención. Agentes infecciosos bacterianos representativos que pueden ser detectados y/o determinados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a,

5 Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Pseudomonas, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis, etc. Agentes infecciosos fúngicos representativos que pueden ser detectados y/o determinados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Cryptococcus neoformans, Blastomyces dermatitidis, Histoplasma capsulatum, Alternaria, Fusarium spp., etc. Agentes infecciosos virales

10 representativos que pueden ser detectados y/o determinados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus linfotrófico de células T humanas, los virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus de la gripe, virus de la COVID-19, etc. Agentes parasitarios representativos que pueden ser

15 detectados y/o determinados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a Plasmodium falciparum, Plasmodium malaria, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Onchocerca volvulus, Leishmania, etc.

La presente invención también puede ser útil para la detección y/o determinación de la

20 resistencia a fármacos por parte de agentes infecciosos mediante la determinación de éstos. Por ejemplo, Enterococcus faecium resistente a la vancomicina, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, Streptococcus pneumoniae resistente a la penicilina, etc.

25 En el ámbito de la monitorización clínica, la presente invención también puede utilizarse para la detección y/o determinación de enfermedades genéticas mediante la detección de biomarcadores genéticos. Esto puede llevarse a cabo mediante el cribado prenatal o postnatal de enfermedades cromosómicas y genéticas o de enfermedades genéticas. Ejemplos de enfermedades genéticas detectables incluyen, pero no se limitan a fibrosis

30 quística, síndrome de Down, cardiopatías, fenilcetonuria, enfermedad de Huntington, enfermedades autoinmunes, etc. También puede utilizarse para la detección y/o determinación de cánceres como, por ejemplo, genes supresores de tumores o genes implicados en la amplificación, replicación, recombinación o reparación del ADN. Ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a Gen BRCA1, gen p53, etc. Varios

35 aspectos de la presente invención pueden utilizarse para identificar amplificaciones, grandes deleciones, así como mutaciones puntuales y pequeñas deleciones/inserciones

de los genes anteriores en los siguientes cánceres humanos comunes: leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, etc.

La presente invención puede usarse en una variedad de áreas forenses, incluyendo, por ejemplo, para la identificación humana para personal militar e investigación criminal, pruebas de paternidad y análisis de relaciones familiares, tipificación de compatibilidad HLA y detección de contaminación en sangre, espermatozoides u órganos de trasplante. La presente invención puede ser útil para la detección y/o determinación de agentes/enfermedades bioterroristas. Por ejemplo, ántrax, botulismo, peste, etc.

10

En la industria de alimentos y piensos, la presente invención tiene una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se puede utilizar para la identificación y caracterización de organismos de producción como la levadura para la producción de cerveza, vino, queso, yogur, pan, etc. Otra área de uso es en relación con el control de calidad y la certificación de productos y procesos (por ejemplo, ganadería, pasteurización y procesamiento de carne) para detectar contaminantes. Otros usos incluyen la caracterización de plantas, bulbos y semillas con fines de reproducción, la identificación de la presencia de patógenos específicos de plantas y la detección e identificación de infecciones veterinarias.

20

Otro ámbito donde puede utilizarse la presente invención es el de detectar la presencia de patógenos vegetales y de plaguicidas (o sus productos de degradación), no solo en invernaderos, sino también en cámaras de cultivo, contenedores de transporte, o similares.

25

En el ámbito de la monitorización medioambiental, la presente invención puede utilizarse, por ejemplo, para la detección, identificación y monitorización de microorganismos patógenos en ecosistemas y microcosmos naturales y artificiales, como en sistemas municipales de depuración de aguas residuales y depósitos de agua o en zonas contaminadas sometidas a biorremediación y/o playas. También es posible detectar plásmidos que contengan genes que puedan metabolizar xenobióticos, monitorizar microorganismos modificados genéticamente en el medio ambiente y en plantas industriales, etc.

35

El término receptor, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto que consiste o comprende una sustancia inorgánica, un polímero de

nucleótidos (ácido nucleico) o un oligopéptido o polipéptido. El término "ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, se refiere a un polímero de nucleótidos (por ejemplo, aptámero, etc.). En algunas aproximaciones, los ácidos nucleicos son o contienen ácidos desoxirribonucleicos (ADN); en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son o contienen ácidos ribonucleicos (ARN). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen nucleótidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, deoxiadenosina, deoxitimidina, deoxi guanosina y deoxicitidina) o no naturales que incluyen, pero no se limitan a, análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, C5-propinilcitidina, C5-propiniluridina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (p. ej. g., bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluoribosa, ribosa) o grupos fosfato modificados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos incluyen enlaces fosfodiéster; o más enlaces estructurales no fosfodiéster tales como, por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamidito. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un oligonucleótido en el sentido de que es relativamente corto (por ejemplo, menos de aproximadamente 5000 o menos nucleótidos de longitud). El término "oligopéptido", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cadena de entre 2 y 20 aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. El término "polipéptido", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una cadena de al más de 20 aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, un polipéptido comprende aminoácidos de origen natural; alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un polipéptido comprende uno o más aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se dan en la naturaleza pero que pueden incorporarse a una cadena polipeptídica; véase, por ejemplo, el ensamblaje del oligoaminoácido artificial Fmoc-Stp(Boc3)-OH en oligómeros de secuencia definida para la formulación de ADN plasmídico dirigido al tumor) y/o pueden emplearse alternativamente análogos de aminoácidos conocidos, por ejemplo polímeros de impronta molecular). Por ejemplo, un polipéptido puede ser una proteína (un anticuerpo, una enzima, un péptido, etc). En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos en un polipéptido pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de grupos funcionales como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, agente entrecruzante o espaciador, un grupo funcional conjugable u otra modificación, etc.

El término "unido" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a dos o más entidades en proximidad física entre sí, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de una o más entidades adicionales que sirven como un agente entrecruzante o

“linker”), para formar una estructura estable como para que las entidades permanezcan unidas en las condiciones que se establezcan, por ejemplo, condiciones fisiológicas y/o aéreas. Estas entidades al menos una de ellas se refiere al circuito LC y al menos otra se refiere al receptor. En algunos casos, las entidades están unidas covalentemente entre sí. En otros casos, las entidades asociadas están unidas de forma no covalente. En algunos diseños, las entidades asociadas están unidas entre sí por interacciones no covalentes específicas (es decir, por interacciones entre ligandos que interactúan entre sí mediante reacciones de afinidad que discriminan entre su complementario y otras sustancias presentes en el contexto de uso, como, por ejemplo, interacciones estreptavidina/avidina, interacciones anticuerpo/antígeno, etc.). Alternativa o adicionalmente, otras interacciones no covalentes más débiles pueden proporcionar la estabilidad suficiente para que las entidades permanezcan unidas entre sí (como, por ejemplo, coordinación metálica, adsorción física, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento π - π , interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones Van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, etc.).

El sistema de la invención puede emplearse para detectar la presencia de cualquier analito que sea indicativo de un trastorno o afección, como enfermedades infecciosas, embarazo, infecciones microbianas, cáncer, trastornos autoinmunes, trastornos cardíacos, trastornos alérgicos, abuso de drogas y similares. Los analitos que pueden detectarse mediante los sistemas y métodos descritos incluyen, entre otros, proteínas y/o péptidos, incluidos ligandos y receptores; moléculas no proteicas, como carbohidratos, fosfolípidos y ácidos nucleicos; moléculas pequeñas; y otras moléculas de interés biológico. Los ejemplos de muestras que pueden analizarse utilizando los sistemas y métodos divulgados incluyen, entre otros, sangre, suero, plasma, secreciones nasales, esputo, orina, saliva, exudados transdérmicos, líquido cefalorraquídeo y secreciones vaginales o uretrales. También pueden analizarse muestras fecales tras un procesamiento adecuado.

30

Así, el sistema y el método de la invención permiten la detección de analitos de forma cualitativa y cuantitativa, mediante la determinación de variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC.

35

En el sistema de la invención no es necesario conocer de antemano las frecuencias naturales de resonancia de los analitos a analizar. Además, el principio de detección se

basa en la formación de un complejo de reconocimiento y la variación en la frecuencia de resonancia del circuito LC debido a dicha formación.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10

Figura 1.- muestra un ejemplo de una realización preferente del circuito LC para la detección directa del bacteriófago M13 en ambiente, de modo que el inductor ha sido recubierto con anticuerpos específicos anti-M13

15

Figura 2.- muestra un diagrama que representa la señal del circuito LC (frecuencia de resonancia, f) cuyo inductor está recubierto con anticuerpos anti-M13 después de nebulizar en una cámara 150 μ L de PBS 1x, E. Coli y bacteriófago M13 a diferentes concentraciones. En este caso, el límite de detección del sistema se ha estimado como una señal en blanco más 3 veces la desviación estándar de la misma.

20

Figura 3.- muestra un diagrama que representa la señal del circuito LC (frecuencia de resonancia, f) cuyo inductor está ubicado debajo de la línea de test de una tira de flujo lateral, donde la línea de test comprende diferentes concentraciones de nanopartículas de carbono.

25

Figura 4.- muestra la señal del circuito LC (frecuencia de resonancia, f) cuyo inductor está ubicado debajo de la línea de test de una tira de flujo lateral, donde la línea de test comprende diferentes concentraciones de nanopartículas de oro.

30

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención describe un sistema y un método de detección de analitos. En particular, el método de la invención se explica en referencia a tres realizaciones preferentes para la detección de analitos mediante un circuito LC (1) .

35

El circuito LC (1) propuesto consiste en un condensador de valor fijo (CT) y una bobina plana (LT) implementados en una placa de circuito impreso (PCB) como se muestra en la Figura 1. El circuito equivalente de un inductor plano incluye no solo el valor de inductancia pura (LS) sino también algunos otros componentes parásitos como la
5 resistencia en serie (RS) y la capacitancia inter-espiras (CS).

El sistema de detección de la presente invención se basa en la variación de la capacitancia parásita inter-espiras del inductor. Esta capacitancia depende del ancho de las trazas de giro y de la distancia y del camino dieléctrico entre ellas.

10

La frecuencia de resonancia de los circuitos LC (1) depende principalmente del valor del condensador (CT) y del valor de inductancia pura del inductor plano (LS). Pero también se ve afectado por los componentes parásitos de los inductores planos, incluida la capacitancia inter-espiras (CS). Aunque la capacitancia inter-espiras (CS) tiene una
15 capacitancia pequeña, bajo algunas circunstancias, un ligero cambio en su valor puede producir un cambio importante en la frecuencia de resonancia del circuito LC (1).

El mecanismo de detección del sistema de detección propuesto consiste en modificar el camino dieléctrico entre las espiras y medir el cambio en la frecuencia de resonancia
20 del circuito LC (1).

En una primera realización preferente de la invención, se inspeccionan analitos presentes en el ambiente. Esta solución puede ser implementada en los sistemas de control ambiental de los edificios inteligentes.

25

De acuerdo ello, en la Figura 1 se propone un dispositivo de detección directa de analitos en ambiente. El equipo consiste en un circuito LC (1) cuyo inductor está recubierto con uno, o varios, receptores (2) que interaccionan selectivamente con los analitos aéreos deseados. El receptor (2) se encuentra unido al circuito LC (1) formando una monocapa
30 autoensamblada.

En esta realización, la combinación de estos receptores (2) con el aire que rodea la superficie del inductor conduce a un cierto camino dieléctrico que produce una cierta cantidad de capacitancia parásita (CS). Cuando el inductor plano se expone a una
35 atmósfera donde el antígeno está presente, los receptores (2) reconocerán el antígeno y la ruta dieléctrica se modificará produciendo un cambio en la capacitancia parasitaria.

En consecuencia, la frecuencia de resonancia del circuito LC (1) se desplaza, lo que permite la detección del antígeno. Dicho cambio proporciona una señal específica al analito interactuante.

- 5 El principio de detección del sensor se basa así en los cambios en las propiedades dieléctricas, distribución de carga, dimensión, forma y conductividad que resultan de la formación del complejo de reconocimiento formado en la superficie del inductor.

10 La especificidad del sistema la marca el receptor (2) escogido que interactúa con el analito deseado.

El sistema ha sido ensayado con éxito utilizando el bacteriófago M13, ver Figura 2. El dispositivo diseñado es muy versátil y permite efectuar la detección de otros patógenos aéreos; por ejemplo, virus aerotransportados como sarampión, gripe, gripe aviar y otras
15 patologías producidas por bacterias como tuberculosis. En todos los casos, la detección se realizaría mediante el uso de receptores (2) específicos para cada analito deseado.

Las características del sensor diseñado son: bajo coste, respuesta rápida, no invasividad y flexibilidad en el diseño de los sensores. Además, la conexión inalámbrica
20 de este sensor permite el control de ambientes remotos o de difícil acceso (ejemplo minas, contenedores, ...)

La presente invención proporciona un sistema para la detección de analitos en ambiente en tiempo real, preferentemente en ambientes cerrados como hospitales, aulas, locales
25 comerciales e incluso medios de transporte, permitiendo tomar las medidas adecuadas a la situación monitorizada.

Este tipo de mediciones son un elemento imprescindible en entornos en donde la ventilación y concretamente la calidad del ambiente interior son aspectos primordiales
30 relacionados con la salud y el confort.

La presente invención resuelve así los problemas existentes en la detección en continuo de bioaerosoles.

En una segunda realización de la invención, el sistema de la invención incorpora además tiras de ensayo (test strip o dip strip), muy habituales en el campo clínico, agronómico y ambiental por su facilidad de uso.

- 5 Las tiras de ensayo constan de una (o varias) zonas de ensayo donde se colocan los reactivos que, cuando entran en contacto con analito de interés, generan un producto coloreado.

- 10 La tira de ensayo se sumerge durante unos segundos en una muestra líquida y el analito presente (o no) en la muestra genera (o no) un cambio de color que puede detectarse de forma visual o con un equipo específico que cuantifica la señal óptica.

- 15 Actualmente hay una gran variedad de empresas que comercializan tiras de ensayo para múltiples analitos permitiendo una semicuantificación de la cantidad de analito en la muestra utilizando una carta de colores o una cuantificación mediante el uso de instrumentos ópticos.

- 20 La propuesta de la invención es cuantificar la señal obtenida en las tiras de ensayo mediante redes LC, que son un conjunto de circuitos LC (1). El sistema, en este caso, consiste en una red LC cuyos inductores están adheridos a un material poroso, tiras de prueba, sobre el que se unen uno, o varios, receptores (2) que interaccionan selectivamente con el analito diana. El principio de detección del sensor inductivo se basa así en los cambios en las propiedades dieléctricas y conductividad que resultan de la formación del complejo de reconocimiento formado en las tiras de prueba. La especificidad de este sistema viene dada por la especificidad de los receptores (2)
25 empleados en la tira.

- 30 Se proporciona un sistema para detectar la presencia de un analito, o componente, de interés en una muestra, preferentemente una muestra biológica. El dispositivo de ensayo comprende una tira de prueba formada por un material poroso (tal como nitrocelulosa o tereftalato de polietileno) que incluye un agente de detección inmovilizado específico para el analito. La membrana porosa se adhiere a una red LC que es el transductor encargado de proporcionar la señal cuantitativa cuando se forma el complejo de reconocimiento. El conjunto de membrana porosa y redes LC se
35 denomina en el resto del texto tira de ensayo inductivo.

Se proporciona un método para detectar la presencia de un analito de interés en una muestra líquida de ensayo. La metodología de la prueba consiste en sumergir por completo la tira reactiva inductiva durante un tiempo variable de alrededor de 5 minutos, en una muestra líquida; a continuación, se extrae del recipiente apoyando el borde de la tira sobre la boca del mismo para eliminar el exceso de líquido. Se deja reposar la tira durante un tiempo variable de alrededor de 2 minutos, y finalmente se mide la frecuencia de las redes LC. Para asegurar la reproducibilidad del sistema se recomienda secar el borde de la tira sobre papel absorbente. Adicionalmente, se puede incluir una etapa de amplificación de la señal mediante formato sándwich sumergiendo la tira en una disolución con un receptor (2) marcado, lo que permitiría detectar moléculas pequeñas.

Este método permite la determinación rápida, sencilla y cuantitativa de componentes patológicos, como glucosa, proteína y similares, en fluidos corporales, como orina, suero y similares. Además, este método permite también la detección, sin reactivos, de analitos en disoluciones acuosas como aguas de bebida, riego, o aguas residuales ambiente en tiempo casi real. Este tipo de mediciones son un elemento muy importante en el control de procesos.

Las tiras reactivas según la presente invención son particularmente útiles para la investigación de fluidos corporales, especialmente de orina; sin embargo, como no requiere reactivos, también pueden tener una aplicabilidad bastante general. Es obvio que, en líquidos turbios, como la sangre o la orina con un alto contenido de sedimentos, la metodología de detección debe incorporar un proceso de lavado antes de realizar la medida de frecuencia.

A diferencia de muchos ensayos de tira de ensayo disponibles en la actualidad, el sistema aquí descrito no requiere de reactivos. La presencia y/o cuantificación del analito puede ser bien de forma directa o bien tras una(s) etapa(s) de adición de reactivos. La ausencia de la gran cantidad de reactivos presente en las tiras convencionales simplifica la fabricación del dispositivo, lo que reduce aún más los costes.

En una tercera realización del sistema de la invención, el sistema de la invención hace uso de tiras de flujo lateral. La primera tira de flujo lateral se desarrolló para detectar la hormona del embarazo, y desde entonces se ha desarrollado este tipo de tiras para

múltiples analitos; tanto moléculas (cocaína, THD...) como patógenos (virus, bacterias, ...).

5 Sin embargo, el interés de las tiras no solo está en obtener una respuesta binaria Sí /No, sino en conseguir cuantificar la cantidad del analito de interés transformando la línea/mancha generada en una señal eléctrica que se pueda procesar.

10 Hasta el momento, la forma más habitual para cuantificar la cantidad de un analito en las tiras (en las que no hay involucrada una reacción redox) se realiza utilizando generalmente diferentes métodos ópticos en los que la señal se obtiene mediante refractancia o tras el tratamiento de la imagen y medida de la intensidad en coordenadas RGB o CiELab. Últimamente se han desarrollado lectores de tiras que utilizan partículas magnéticas (o supramagnéticas) que cuantifican el campo magnético generado por la acumulación de las mismas en las diferentes líneas de ensayo de las tiras de flujo lateral.

15 La propuesta de la presente invención es cuantificar la señal obtenida en las tiras de flujo lateral mediante redes LC. El equipo consiste en una red LC cuyos inductores están ubicados justo debajo de las líneas de test y control de las tiras de flujo lateral. El principio de detección del sensor inductivo se basa así en los cambios en las propiedades dieléctricas y conductividad que resultan de la formación del complejo de reconocimiento formado en las líneas de control y test. Este cambio se debe a las nanopartículas (p. ejemplo, oro o carbono) y/o analitos fijados sobre estas líneas cuando éstas se hacen visibles. La especificidad de este sistema viene dada por la especificidad de los receptores (2) empleados en la tira.

25 Se proporciona un sistema para detectar la presencia de un analito, o componente, de interés en una muestra, preferentemente una muestra biológica, en el que el sistema comprende un dispositivo de ensayo de flujo lateral y un transductor de redes LC, tira de flujo lateral inductivo.

30 El dispositivo de ensayo comprende: (a) una región receptora de muestra; y (b) una membrana de captura que incluye una región de prueba que comprende un agente de detección inmovilizado específico para el analito, y una región de control que incluye un reactivo inmovilizado que se une al agente de detección. El dispositivo de ensayo de flujo lateral también puede incluir una región de depósito situada aguas debajo de la membrana de captura para absorber el exceso de fluido, como el exceso de la muestra

biológica, la formulación líquida de un indicador conjugado o un exceso de un tampón de persecución que puede utilizarse con el dispositivo de ensayo. La membrana de captura se sitúa sobre la bobina (1) de la red LC que es el transductor encargado de proporcionar la señal cuantitativa cuando se forma el complejo de reconocimiento.

5

Se proporciona un método para detectar la presencia de un analito de interés en una muestra de ensayo líquida. Tal método comprende: a) utilizar una tira de flujo lateral inductivo; b) aplicación de la muestra sobre la región receptora de la tira disolviendo así los tampones y/o reactivos presente en la misma; c) migración de la fase líquida por la tira y paso por una zona líquida de un conjugado de carbono a la región receptora de la muestra para formar un complejo analito-conjugado, también se puede realizar label-free; (f) permitir que el complejo analito-conjugado (o el analito) migre a través a lo largo de la tira donde el analito entra en contacto con el agente de detección de la zona de ensayo (test line), inmovilizando así el complejo analito-conjugado (o analito). De este modo, al formarse el complejo de reconocimiento se puede obtener una señal detectable a través de las redes LC, en la que la formación de la señal indica la presencia del analito en la muestra. La posibilidad de tener una zona de control queda discreción del desarrollador y sus intereses.

Aunque la realización específica descrita anteriormente emplea un sistema de partículas de carbono como sistema de detección, se aprecia que el sistema de detección utilizado en el sistema de ensayo aquí descrito puede ser cualquier sistema particulado y/o no particulado que sea capaz de generar señales que puedan detectarse visualmente y/o con la ayuda de redes LC. Además, puede emplearse un sistema de fluídica que permita automatizar y controlar fácilmente todo el proceso.

A diferencia de muchos ensayos de flujo lateral disponibles en la actualidad, las tiras de flujo lateral inductivo no requieren de analitos marcados con nanopartículas. En su lugar, el sistema puede responder directamente a la presencia de analito en las líneas de test. La ausencia de nanopartículas simplifica la fabricación del dispositivo, lo que reduce aún más los costes, especialmente al compararlo con sistemas comerciales con detección óptica.

El sistema ha sido ensayado con éxito utilizando tiras reactivas en las que las líneas de test fueron realizadas con nanopartículas de carbono (Figura 3). No obstante, el dispositivo diseñado es muy versátil y permite efectuar la detección de patógenos, y

analitos. En todos los casos, la detección se realiza mediante el uso de receptores (2) específicos para cada analito de interés.

También se muestra en la figura 4 un ensayo realizado con éxito utilizando tiras
5 reactivas en las que las líneas de test fueron realizadas con nanopartículas de oro.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de detección de analitos que comprende:
 - uno o más circuitos LC (1) que comprenden: una bobina (LS) plana y un condensador (CT);
 - al menos un receptor (2) dispuesto sobre las bobinas (LS) de los circuitos LC (1) y configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento; y
 - al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC (1) y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito.
2. Sistema de acuerdo con la reivindicación 1, donde el receptor forma una monocapa autoensamblada sobre las bobinas (LS) de los circuitos LC (1).
3. Sistema de acuerdo con la reivindicación 1, donde el al menos un dispositivo de detección está conectado a los circuitos LC (1) mediante un módulo de comunicación inalámbrico.
4. Sistema de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende múltiples circuitos LC (1) que conforman redes LC.
5. Sistema de detección de analitos que comprende:
 - uno o más circuitos LC (1) que comprenden: un condensador (CT) y una bobina (LT) plana;
 - al menos un receptor (2) configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
 - una tira reactiva de material poroso, que comprende: una primera cara, sobre la que se disponen los circuitos LC (1), y una segunda cara, a la que se adhiere al menos un receptor (2); y
 - al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC (1) y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito.

6. Sistema de acuerdo con la reivindicación 5, donde la tira reactiva está fabricada con nitrocelulosa o tereftalato de polietileno.
7. Sistema de detección de analitos que comprende:
 - 5 - uno o más circuitos LC (1) que comprenden: un condensador (CT) y una bobina (LT) plana;
 - al menos un receptor (2) configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
 - al menos una tira de flujo lateral, que comprende:
 - 10 o una primera cara, que comprende una región receptora y una región de captura, definida por una o más líneas de captura en las que se adhiere el al menos un receptor (2), y
 - o una segunda cara, sobre la que se disponen los circuitos LC (1) en una posición correspondiente a la posición de las líneas de captura;
 - 15 y
 - al menos un dispositivo de detección conectado a los circuitos LC (1) y configurado para determinar variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento, indicando así la presencia del analito.
 - 20
8. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, donde la tira de flujo lateral además comprende una región de depósito situada en un extremo opuesto de la tira a la región receptora.
9. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, donde el al menos un receptor (2) es un agente de detección inmovilizado adherido a la línea de test y/o control de la tira de flujo lateral.
10. Sistema de acuerdo con la reivindicación 7, que además comprende un conjugado de nanopartículas de oro o carbono situado sobre el receptor (2) para amplificar las variaciones en la frecuencia de resonancia de los circuitos LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento.
11. Método de detección de analitos que comprende las etapas de:
 - 35 - proveer uno o más circuitos LC (1) que comprenden: un condensador (CT) y una bobina (LT) plana;

- disponer al menos un receptor (2) configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento, en contacto con el circuito LC (1);
 - determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC (1).
- 5
12. Método de detección de analitos que comprende las etapas de:
- proveer uno o más circuitos LC (1) que comprenden: un condensador (CT) y una bobina (LT) plana;
 - proveer al menos un receptor (2) configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento;
 - proveer una o más tiras reactivas de material poroso;
 - adherir los circuitos LC (1) a una primera cara de las tiras reactivas;
 - disponer el al menos un receptor (2) en una segunda cara de la tira reactiva en una posición correspondiente con la posición del circuito LC (1);
 - sumergir las tiras reactivas en un fluido muestra para formar el complejo de reconocimiento; y
 - determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC (1) al formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC (1).
- 10
- 15
- 20
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, que además comprende una etapa de amplificar una señal del dispositivo de detección generada por la variación en la frecuencia de resonancia del circuito LC (1) mediante formato sándwich, sumergiendo la tira en una disolución con un receptor (2) marcado.
- 25
14. Método de acuerdo con la reivindicación 12, que además comprende una etapa de lavar el fluido muestra, previa a la etapa de sumergir las tiras reactivas en dicho fluido muestra.
- 30
15. Método de detección de analitos que comprende las etapas de:
- proveer uno o más circuitos LC (1) que comprenden: un condensador (CT) y una bobina (LT) plana;

- proveer al menos un receptor (2) configurado para interaccionar con un analito específico, formando un complejo de reconocimiento, en contacto con el circuito LC (1);
- 5 - proveer una o más tiras de flujo lateral, que comprende una primera cara que comprende, a su vez, una región receptora y una región de captura, definida por una o más líneas de captura;
- adherir el al menos un receptor (2) a las líneas de captura de la tira de flujo lateral,
- adherir los circuitos LC (1) a una segunda cara en una posición
10 correspondiente a la posición de las líneas de captura;
- depositar un fluido muestra en la región receptora de las tiras de flujo lateral para su migración hacia las líneas de captura y para formar el complejo de reconocimiento; y
- determinar variaciones en la frecuencia de resonancia del circuito LC (1) al
15 formarse el complejo de reconocimiento mediante un dispositivo de detección conectado al circuito LC (1).

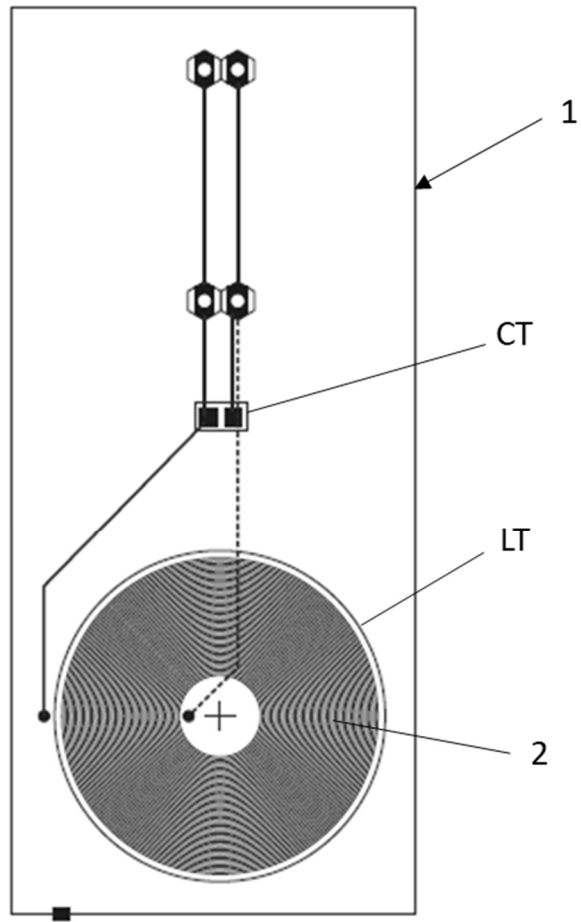


FIG. 1

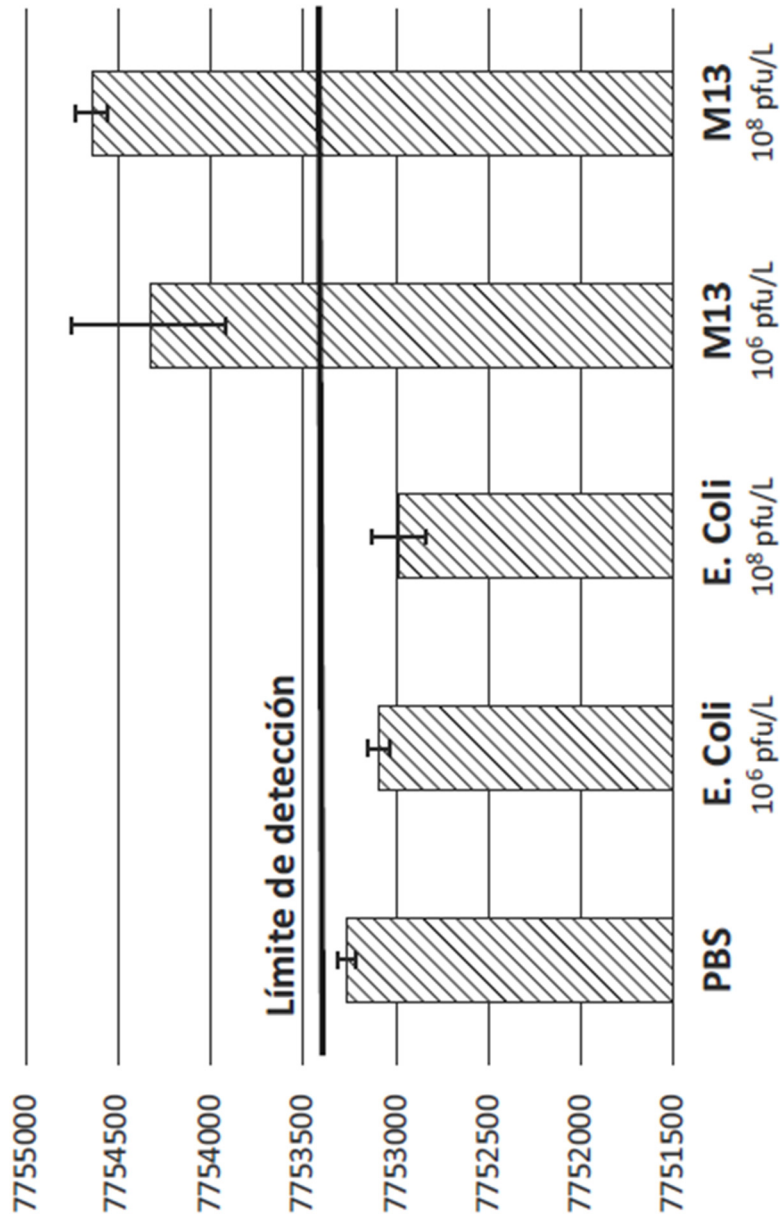


FIG. 2

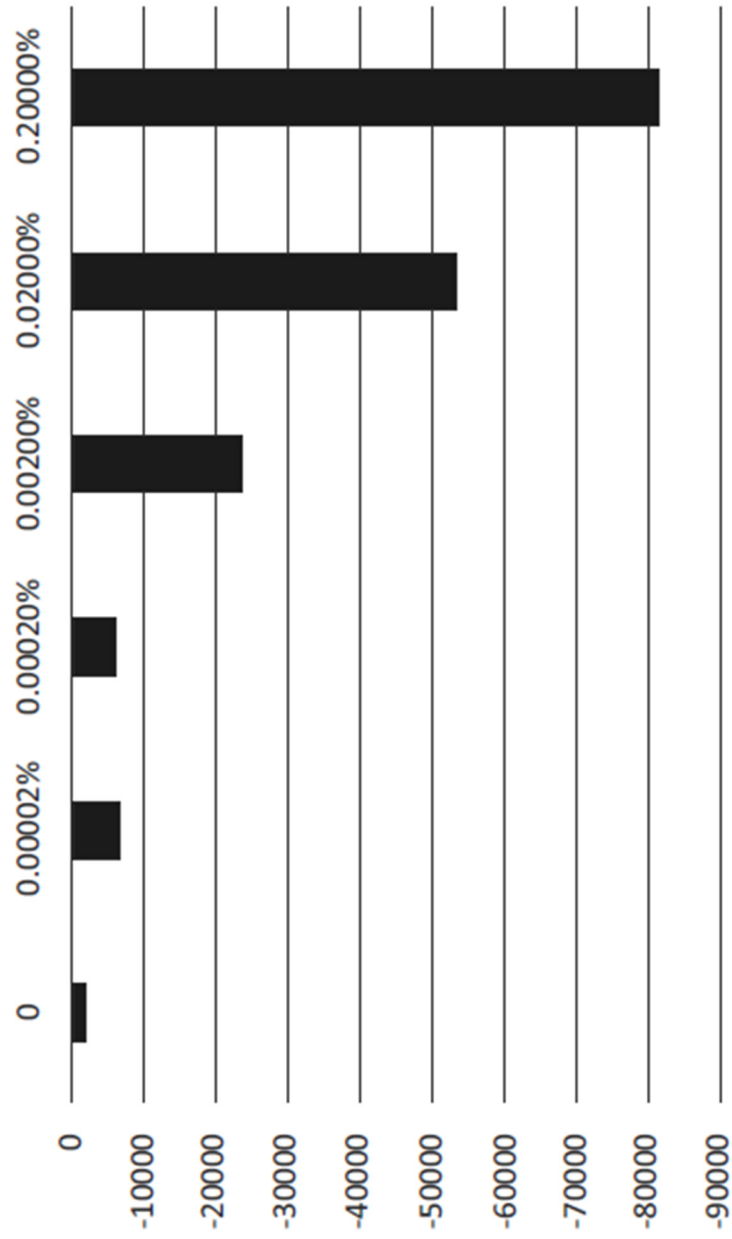
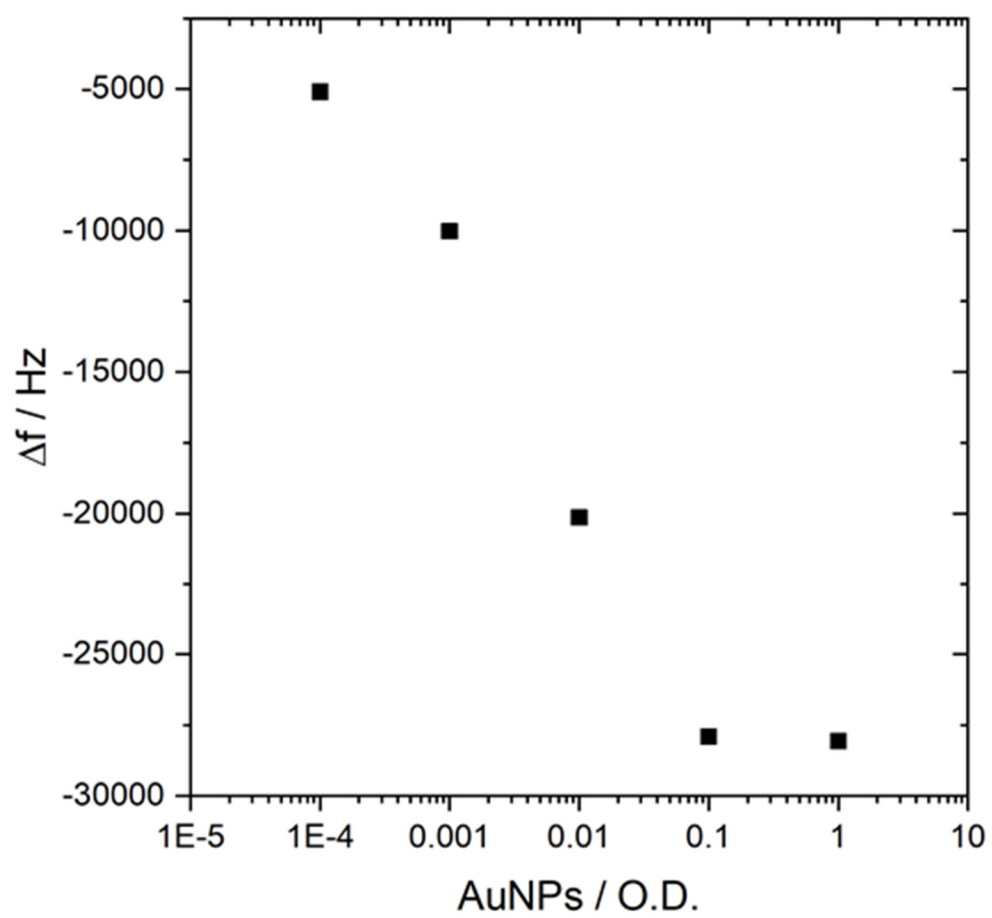


FIG. 3

**FIG. 4**