



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712757-0 A2**

(22) Data de Depósito: 13/06/2007
(43) Data da Publicação: 25/09/2012
(RPI 2177)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/543
G01N 33/58

(54) Título: MÉTODO, USO DE UMA COMBINAÇÃO DE RÓTULO PRIMÁRIO DE NANOPARTÍCULAS E RÓTULOS SECUNDÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS, E, DISPOSITIVO PARA AMPLIFICAR UM SINAL GERADO A PARTIR DE RÓTULOS PRIMÁRIOS E NANOPARTÍCULAS EM UM ENSAIO

(30) Prioridade Unionista: 14/06/2006 EP 06115479.5

(73) Titular(es): Koninklijke Philips Electronics N.V.

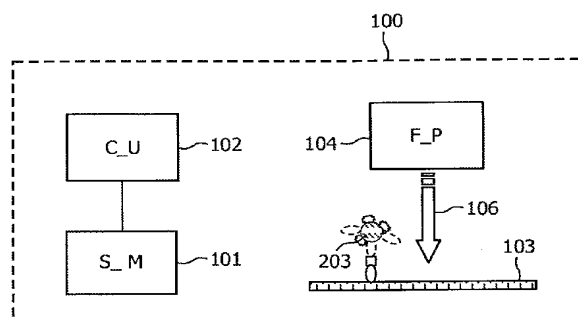
(72) Inventor(es): Bart M. de Boer, Jacobus M. Den Hollander, Wendy U. Dittmer

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007052237 de 13/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/144834de 21/12/2007

(57) Resumo: MÉTODO, USO DE UMA COMBINAÇÃO DE RÓTULO PRIMÁRIO DE NANOPARTÍCULAS E RÓTULOS SECUNDÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS E, DISPOSITIVOS PARA AMPLIFICAR UM SINAL GERADO A PARTIR DE RÓTULOS PRIMÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS EM UM ENSAIO. Esta invenção relaciona-se a um dispositivo e um método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, usando rótulos secundários de nanopartículas, tipicamente rótulos magnéticos, onde vinculando os rótulos secundários aos rótulos primários, os resultados naquele sinal produzidos a partir dos rótulos será amplificado.



“MÉTODO, USO DE UMA COMBINAÇÃO DE RÓTULO PRIMÁRIO DE NANOPARTÍCULAS E RÓTULOS SECUNDÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS, E, DISPOSITIVO PARA AMPLIFICAR UM SINAL GERADO A PARTIR DE RÓTULOS PRIMÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS EM UM ENSAIO”

5

Campo da Invenção

A presente invenção relaciona-se a um dispositivo e um método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio. A presente invenção relaciona-se adicionalmente a um uso de uma combinação de rótulos primários e secundários de nanopartículas para amplificar um sinal gerado a partir do rótulo primário de nanopartícula em um ensaio.

10

Fundamentos da Invenção

Uma parte da pesquisa de cuidados de saúde envolve desenvolver diagnóstico molecular fácil de usar, para moléculas tais como DNA, RNA, proteínas, peptídeos, hormônios, metabólitos, drogas, etc, bem como para determinar a atividade e função de biomoléculas ativas e catalíticas, tais como prions, enzimas, aptâmeros, ribozimas, e deoxiribozimas e para identificar células incluindo tecido humano, células humanas, bactérias e vírus.

15

Sensores biomagnéticos são usados para detectar alvos biológicos rotulados com partículas superparamagnéticas. Vários formatos de rótulo podem ser implementados para a detecção da substância biológica a ser detectada. Estes incluem o ensaio direto, no qual uma substância a ser detectada rotulada se liga ao sensor; o ensaio de sanduíche, no qual a substância a ser detectada se vincula ao sensor, seguido pela vinculação de uma metade contendo um rótulo; e o ensaio competitivo ou de inibição no qual uma substância a ser detectada compete com a superfície do sensor para se vincular a uma metade rotulada.

20

25

O ensaio direto é usado para substâncias a serem detectadas que são facilmente rotuladas diretamente, tais como amplicons PCR em ensaios de ácido nucléico. O ensaio de sanduíche é o mais bem conhecido para obter um limite de detecção baixo e alta especificidade. Entretanto, requer que uma

substância a ser detectada alvo tenha locais disponíveis para a vinculação das duas metades. Pequenas moléculas tais como drogas, metabólitos, hormônios, venenos (por exemplo, toxinas) e vitaminas não podem acomodar duas metades de vinculação e então o ensaio competitivo é preferido. No caso do ensaio de sanduíche, a quantidade de rótulos detectados é diretamente relacionada à concentração do alvo no sensor, ao passo que no caso de um ensaio competitivo, a quantidade de rótulos é relacionada à concentração de locais de vinculação livres no sensor, o que diminui com a concentração da substância a ser detectada.

O limite de sensibilidade de um ensaio é dado por:

$$R_{det}=2*s.dB$$

onde R_{det} é o limite de sensibilidade e $s.dB$ é o desvio padrão do sinal resultante do instrumental fundamental e vinculação não específica. No sentido de diminuir a sensibilidade do ensaio e então ser capaz de detectar concentrações mais baixas, o sinal nestas concentrações precisa ser pelo menos R_{det} , preferivelmente muito mais alto. O sinal detectado por um rótulo magnético é proporcional à densidade de rótulos no sensor do volume do conteúdo magnético no rótulo. O aumento da densidade de rótulos vinculados ao sensor pode ser obtido reforçando a eficiência de vinculação entre os componentes do ensaio e melhorando a velocidade e efetividade da vinculação de rótulo à superfície. Entretanto, aumentando o volume magnético dos rótulos usando grandes rótulos ($>1 \mu m$ de diâmetro) em um ensaio aumentará a contribuição por rótulo no sinal, porém é desvantajoso, uma vez que o estágio final no ensaio requer a vinculação do rótulo magnético na superfície do sensor. Este processo pode ser muito lento e ineficiente para rótulos maiores, devido ao impedimento estérico e à superfície reduzida (para vincular à superfície do sensor) para relação de volume de rótulos maiores comparados a rótulos maiores. Como uma consequência, embora o sinal por rótulo aumente com o diâmetro do rótulo, o número de rótulos que contribui para o sinal diminui.

Breve Descrição da Invenção

O objetivo da presente invenção é superar as deficiências acima

mencionadas, aumentando a sensibilidade de um ensaio e então habilitar uma detecção de concentrações mais baixas.

De acordo com um aspecto, a presente invenção relaciona-se a um dispositivo para amplificar o sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, compreendendo:

- um meio de separação para manter pelo menos rótulos secundários de nanopartículas separados dos rótulos primários de nanopartículas, onde os rótulos secundários de nanopartículas são adaptados para se vincular aos rótulos primários de nanopartículas;

- uma unidade de controle para controlar a liberação dos rótulos secundários no ensaio, sendo o pelo menos um dentre os rótulos primários e secundários de nanopartículas rótulos magnéticos;

- um produtor de campo magnético para gerar um campo magnético e deste modo induzir momentos magnéticos nos rótulos; e,

- um biossensor incluindo uma superfície para detectar o campo produzido pelo tal pelo menos um dos rótulos primários de nanopartículas afixado à superfície e pelos rótulos secundários de nanopartículas afixado aos rótulos primários de nanopartículas onde o controle da liberação dos rótulos secundários no ensaio é baseada em um comando de liberação indicando que os rótulos primários de nanopartículas estão afixados à superfície.

Deste modo, é provido um dispositivo que é capaz de amplificar o sinal gerado produzido pelos rótulos de nanopartículas uma vez que a densidade dos rótulos a ser detectada, e então o sinal, é aumentada porque um ou mais rótulos secundários podem se vincular a um único rótulo primário. Segue que baixas concentrações da substância a ser detectada, por exemplo, $< \text{nM}$, podem ser facilmente detectadas. Uma vantagem adicional é que os rótulos primários anexados à superfície de detecção podem ser pequenos, reduzindo deste modo o impedimento estérico e aumentando a área de superfície por grama de rótulo que pode se vincular à superfície do biossensor. Os rótulos primários podem ser

rótulos que são vinculados a um alvo em uma solução, ou alvos anexados a uma superfície de biossensor. Esta vinculação pode ter lugar através de grupos de vinculação intermediários. De acordo com a presente invenção, o termo rótulo de nanopartícula pode incluir partículas na faixa de micrometro, mas tipicamente as partículas são de várias centenas de nanômetros até poucos nanômetros, ou mesmo uma fração de um nanômetro. Também, a geometria das nanopartículas pode ser variada. O termo meio de separação de acordo com a presente invenção significa separação física, por exemplo, onde os rótulos primário e secundário estão em um reservatório, ou uma separação química, isto é, os rótulos primário e secundário podem não se vincular juntos.

Em uma relação, o meio de separação é selecionado de um grupo consistindo de:

- um reservatório que é fisicamente isolado de uma câmara contendo os rótulos primários e secundários de nanopartículas,
- uma superfície de alojamento adaptada para receber os rótulos secundários de nanopartículas via campos de força externos ou via força de vinculação química, e um mecanismo de força para aplicar a força externa,
- uma superfície de alojamento adaptada para receber os rótulos secundários de nanopartículas via campos de força externos ou via força de vinculação química, uma camada de encapsulamento de rótulos inertes para gerar uma camada inerte cobrindo a superfície dos rótulos secundários de nanopartículas na superfície de alojamento, e um mecanismo de força para aplicar a força externa,
- um meio de encapsulamento e um removedor de encapsulamento para liberar os rótulos do meio de encapsulamento, e
- um reservatório compreendendo um complexo contendo os meios de vinculação para prover um elemento de vinculação necessário para vincular os rótulos primário e secundário juntos, e
- uma superfície de alojamento compreendendo um complexo

contendo os meios de vinculação para prover o elemento de vinculação necessário para vincular os rótulos primário e secundário juntos e um meio de encapsulamento para encapsular o complexo e removedor de encapsulamento para remover o meio do encapsulamento do complexo.

5 Em uma realização, os rótulos primários de nanopartículas compreendem dois ou mais tipos diferentes de rótulos de nanopartículas em um ensaio multi substâncias a serem detectadas.

 Em uma realização, pelo menos os rótulos secundários de nanopartículas compreendem adicionalmente rótulos terciários de nanopartículas, rótulos quaternários de nanopartículas, etc., que são separados um do outro, onde
10 os rótulos terciários de nanopartículas são adaptados para se vincular a rótulos secundários de nanopartículas, os rótulos quaternários de nanopartículas são adaptados para se vincular a rótulos terciários de nanopartículas, etc. Uma vez que o número de locais de vinculação para o rótulo secundário ao rótulo primário é
15 limitado, vinculações adicionais de rótulos terciários ao rótulo secundário, etc., permitirão amplificação adicional do sinal do sensor.

 Em uma realização, pelo menos os rótulos secundários de nanopartículas compreendem um ou mais tipos diferentes de rótulos secundários de nanopartículas. Daquele modo, os rótulos secundários de nanopartículas são
20 capazes de se vincular a vários tipos de vinculação de rótulos ou a vários locais de vinculação no mesmo rótulo primário.

 Os rótulos magnéticos possuem a vantagem de que podem ser atuados em um campo magnético. Deste modo, podem ser ativamente movidos de uma localização para outra. Esta propriedade pode ser usada, por exemplo, para
25 reforçar a velocidade na qual as partículas atingem a superfície do sensor, através de uma força atrativa, e para remoção de rótulos que não estão vinculados ou são fracamente vinculados à superfície do sensor, através de uma força na direção oposta. Biossensores que detectam momento magnético possuem a vantagem adicional de que matrizes biológicas são fortemente magnéticas e então não

contribuem para sinais de segundo plano.

Em uma realização, o biossensor compreende um dispositivo GMR, TMR, AMR ou dispositivo de efeito Hall para detectar o campo produzido.

Em uma realização, os rótulos são seleccionados de um grupo consistindo de: nanopartículas de metal, nanopartículas semicondutoras, nanopartículas poliméricas contendo um corante, nanopartículas de carbono e partículas magnéticas contendo um rótulo corante onde pelo menos um dos rótulos primário ou secundário é um rótulo magnético.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção relaciona-se adicionalmente a um método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, o método compreendendo as etapas de:

- manter pelo menos os rótulos secundários de nanopartículas separados dos rótulos primários de nanopartículas, pelo menos um dos rótulos primários e secundários de nanopartículas sendo rótulos magnéticos, e onde os rótulos secundários de nanopartículas são adaptados para se vincular aos rótulos primários de nanopartículas;

- controlar a liberação dos rótulos secundários no ensaio, com o controle incluindo a liberação dos rótulos secundários no ensaio subsequentemente após os rótulos primários serem vinculados a uma superfície de um biossensor compreendida no ensaio; e,

- detectar o campo produzido pelo tal pelo menos um dos rótulos primários e secundários de nanopartículas, onde o diâmetro dos rótulos secundários é menor que o dos rótulos primários.

Conseqüentemente, devido à grande contribuição para o sinal total por rótulo primário, uma baixa concentração de substância a ser detectada ($<nM$) pode ser facilmente detectada.

Em uma realização, o ensaio é seleccionado de um grupo consistindo de:

- um ensaio sanduíche,
- um ensaio direto, e
- um ensaio competitivo ou de inibição,
- ensaios de ácido nucléico, e
- ensaios de atividade de enzima.

5

Conseqüentemente, sinal gerado produzido pelos rótulos de nanopartículas pode ser amplificado independente do tipo de ensaio. Segue-se a isto que o impedimento estérico é adicionalmente reduzido. Entretanto, o diâmetro do rótulo secundário pode ser exatamente similar ao do rótulo primário, ou ainda maior.

10

Em uma realização, onde a liberação é efetuada subsequente inclui ainda uma subsequente não vinculação ou uma vinculação fraca de rótulos primários ao biossensor após serem removidas.

15

Em uma realização, antes da detecção do sinal gerado, os rótulos primários e secundários que são não vinculados ou fracamente vinculados a uma superfície de um biossensor compreendido no ensaio são removidos do ensaio.

20

De acordo com ainda um outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a um uso de uma combinação de rótulo primário de nanopartículas e rótulos secundários de nanopartículas para amplificar um sinal gerado a partir de rótulo primário de nanopartículas em um ensaio, em que os pelo menos um rótulo secundário de nanopartículas que têm diâmetro que é menor que o diâmetro do rótulo primário de nanopartículas são adaptados para serem anexados aos rótulos primários de nanopartículas e deste modo atuam como um agente de amplificação e onde pelo menos um dos rótulos primários e secundários de nanopartículas são rótulos magnéticos.

25

Em uma realização, o primário e pelo menos um rótulo secundário de nanopartículas são rótulos magnético e onde o sinal é um campo magnético produzido pelos rótulos.

Em uma realização, o uso compreende detectar drogas

selecionadas de um grupo consistindo de: maconha, ecstasy, metanfetamina, metadona e anfetamina, cocaína, crack e heroína em uma amostra de fluido de sangue.

Em uma realização, o uso compreende detectar proteínas, pequenas moléculas tais como glicose, hormônios, toxinas, esteróides, vitaminas e metabólitos, peptídeos, ácidos nucleicos tais como DNA e RNA.

Os aspectos da presente invenção podem ser cada um combinados com qualquer dos outros aspectos. Estes e outros aspectos da invenção serão aparentes e esclarecidos com referência às realizações posteriormente descritas.

Breve Descrição dos Desenhos

Realizações da invenção serão descritas, somente por meio de exemplo, com referência aos desenhos, nos quais:

a Figura 1 mostra um dispositivo de acordo com a presente invenção para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, usando rótulos secundários de nanopartículas,

a Figura 2 mostra uma realização do dispositivo mostrado na Figura 1,

a Figura 3 ilustra graficamente as etapas funcionais executadas no dispositivo mostrado na Figura 2,

a Figura 4 mostra uma outra realização de um dispositivo mostrado na Figura 1,

a Figura 5 ilustra graficamente as etapas funcionais executadas no dispositivo mostrado na Figura 4,

a Figura 6 mostra uma outra realização de um dispositivo mostrado na Figura 1,

a Figura 7 ilustra graficamente as etapas funcionais efetuadas no dispositivo mostrado na Figura 6,

a Figura 8 mostra uma outra realização de um dispositivo mostrado na Figura 1,

a Figura 9 ilustra graficamente as etapas funcionais executadas no dispositivo mostrado na Figura 8,

a Figura 10 mostra uma outra realização de um dispositivo mostrado na Figura 1,

5 a Figura 11 ilustra graficamente as etapas funcionais efetuadas no dispositivo mostrado na Figura 10, e

a Figura 12 mostra um fluxograma de um método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio.

Descrição Das Realizações Preferenciais

10 A Figura 1 mostra um dispositivo 100 de acordo com a presente invenção para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio usando rótulos secundários de nanopartículas. Na seguinte realização, é suposto que os rótulos de nanopartículas compreendem
15 rótulos magnéticos, porém outros tipos de rótulos são possíveis, tais como nanopartículas de metal, nanopartículas semicondutoras, nanopartículas poliméricas contendo um corante, nanopartículas de carbono e partículas magnéticas contendo um rótulo corante.

A amplificação é obtida anexando um ou mais dos rótulos magnéticos secundários aos rótulos magnéticos primários. Conforme mostrado, o
20 dispositivo compreende meio de separação (S_U) 101, uma unidade de controle (C_U) 102, tipicamente um sensor magnético, um produtor de campo magnético (F_P) 104 e um biossensor 103 incluindo uma superfície para detectar o campo produzido pelos rótulos 203. O sensor pode ser qualquer sensor adequado para detectar a presença de partículas magnéticas na ou próximo a uma superfície do
25 sensor, com base em qualquer propriedade das partículas, por exemplo, pode ser detectado via métodos magnéticos (por exemplo, magneto resistivo, Hall, bobinas), métodos ópticos (geração de imagens, fluorescência, quimioluminescência, absorção, difusão, ressonância de plasmon de superfície, Raman, etc.), detecção sônica (onda acústica de superfície, onda acústica de

volume, cantilever, cristal de quartzo, etc.), detecção elétrica (por exemplo, condução, impedância, amperométrica, ciclagem redox), etc. O meio de separação (S_U) 101 é adaptado para separar os rótulos secundários dos rótulos primários e deste modo selar os rótulos secundários do biossensor 103. A separação pode
5 compreender uma separação física, por exemplo, na forma de um reservatório, ou uma separação química onde os rótulos podem ser quimicamente vinculados juntos. A unidade de controle (C_U) 102 é adaptada para controlar a liberação dos rótulos secundários do reservatório do meio de separação (S_U) 101. O produtor de campo magnético (F_P) 104 pode ser uma unidade interna ou externa e pode
10 compreender fios onde o campo magnético produzido é produzido pela corrente nos fios, bobinas eletromagnéticas, e magnetos permanentes. O produtor de campo é adaptado para gerar um campo magnético 106 no sentido de induzir momentos magnéticos nos rótulos 203, 204. O biossensor 103 então detecta o campo produzido 107 pelos rótulos, por exemplo, usando elemento Resistivo
15 Magneto Gigante (GMR), elemento Resistivo Magnético de Tunelização (TMR), elemento Resistivo Magneto Anizotrópico (AMR), elemento Hall, e similares.

A Figura 2 mostra uma realização de um dispositivo 200 de acordo com a presente invenção, para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários em um ensaio, usando rótulos magnéticos secundários. Nesta
20 realização, o meio de separação (S_U) 101 inclui um reservatório ou câmara 201 para manter os rótulos secundários 204 fisicamente separados dos rótulos primários 203. O reservatório 201 contém adicionalmente uma porta 205, ou mecânica, elétrica ou válvula magneticamente ativa, operada pela unidade de controle (C_U) 102 para permitir um fluxo de partículas secundárias 204 na
25 câmara principal 206. Em uma realização, a unidade de controle (C_U) 102 é controlada por computador onde o controle pode, por exemplo, compreender introduzir somente uma porção de rótulos secundários na câmara principal 206, onde o biossensor 103 é colocado. Conseqüentemente, o computador (não mostrado) poderia ser adaptado para utilizar parâmetros físicos tais como a

pressão no reservatório 201 para aproximar o número de rótulos secundários 202, e para otimizar o tempo de abertura para controlar o fluxo externo das partículas secundárias.

A Figura 3 ilustra graficamente as etapas funcionais executadas no dispositivo mostrado na Figura 2, a partir de onde os rótulos primários 204 são anexados à superfície do biossensor 103 na ausência dos rótulos secundários 204 (o lado esquerdo da Figura 3), até que os rótulos secundários 204 tenham sido liberados do reservatório 201 e sejam anexados aos rótulos primários (o lado direito da Figura 3). Nesta realização, os rótulos primários compreendem duas metades de vinculação 301, 302, uma metade 302 para vincular o rótulo primário ao alvo 303, onde o alvo 303 então se vincula à superfície via metade de vinculação 304, e uma metade de vinculação 301 para se vincular ao rótulo secundário 204. O número de metades de vinculação do rótulo primário poderia exatamente compreender uma metade de vinculação ou mais de duas metades de vinculação. As metades de vinculação podem incluir avidin, biotin, hapten, anticorpo, proteína, peptídeo, lecitina, carboidrato, aptâmero e ácido nucléico.

O diâmetro dos rótulos magnéticos primários pode ser de poucos nanômetros até várias centenas de nanômetros, ou mesmo até a faixa de micron. Em uma realização, os rótulos de nanopartículas são feitos de polímero englobando pequenos grãos de óxido de ferro e formam uma matriz de óxido de ferro, e portanto, apresentam propriedades super paramagnéticas. As propriedades do material dos rótulos magnéticos poderiam entretanto, ser tais que os rótulos apresentem propriedades para ou ferromagnéticas.

As metades de vinculação na superfície dos rótulos primário 204 e secundário 203 estão em uma realização obtida funcionalizando a superfície dos rótulos 203, 204, por exemplo, revestindo-os ou realizando reações de superfície para criar grupos funcionais reativos tais como ácido carboxílico, amina, tosil, aldeído, maleimida, tiol ou epóxi. O resultado de tal revestimento provê os grupos reativos para a imobilização de metade de vinculação incluindo moléculas

biológicas tais como avidin, biotin, anticorpos, peptídeos, aptâmeros, e oligonucleotídeos. Tais metais de vinculação podem também ser modificados de tal modo que reajam mais facilmente com os grupos reativos na superfície. Por exemplo, grupos de ácido carboxílico reagem com os grupos de amina, e que pode
5 ocorrer naturalmente nas proteínas e peptídeos, porém estes grupos de amina podem também ser adicionados a oligonucleotídeos e aptâmeros para habilitar sua imobilização sobre superfícies carboxiladas.

Deveria ser notado que a realização mostrada aqui é o assim chamado ensaio de sanduíche, onde o alvo 303 é sanduichado entre a metade 304
10 na superfície do biossensor 103 e metade 302 que está acoplada ao rótulo primário 203, isto é, a substância a ser detectada alvo precisa ter dois locais disponíveis para vinculação. O cenário conforme ilustrado na Figura 3, bem como outras realizações descritas mais tarde, poderia igualmente se aplicar a outros tipos de ensaio, por exemplo, ensaio direto, no qual uma substância a ser detectada
15 rotulada se vincula ao sensor, seguida pela vinculação de uma metade contendo o rótulo primário 204, ou ensaio competitivo de inibição que é preferido por exemplo, para moléculas tais como drogas, metabólitos, hormônios, venenos (por exemplo, toxinas) e vitaminas que não podem acomodar duas metades de vinculação.

O rótulo secundário 204 compreende nesta realização, um tipo de metade de vinculação 309 que é adequado para se vincular à metade de vinculação 301 no rótulo primário. O número de metades de vinculação no rótulo secundário 204 poderia naturalmente compreender mais de um tipo de metades de vinculação, onde cada respectiva metade de vinculação poderia ser adaptada a
20 uma metade de vinculação específica no rótulo primário (e também metade terciária).

A seta 308 ilustra a abertura do reservatório, isto é, liberação dos níveis secundários 204 na câmara principal 206. O lado direito da Figura 3 mostra onde os rótulos secundários 204 estão anexados ao rótulo primário 203 via metade

de vinculação 301. Tendo estes segundos rótulos 204 anexados ao rótulo primário, resultará em que o sinal gerado pelo rótulo primário 203 será amplificado e portanto, a sensibilidade do ensaio será aumentada devido à densidade aumentada dos rótulos associados a cada alvo respectivo 303.

5 A Figura 4 mostra uma outra realização de um dispositivo 400 de acordo com a presente invenção para amplificar um sinal gerado a partir dos rótulos primários 203 em um ensaio, usando rótulos magnéticos secundários 204, onde os rótulos primário 203 e secundário 204 são colocados dentro da mesma câmara. Nesta realização, o meio de separação (S_M) 101 compreende uma
10 superfície de alojamento 401 à qual os rótulos secundários 204 são anexados. A anexação pode ser obtida aplicando um campo magnético em uma localização específica, por exemplo, na superfície 401, e utilizar as propriedades magnéticas dos rótulos secundários 204 para mantê-las na superfície 401. Removendo o campo magnético, os rótulos secundários 204 serão liberados da superfície, onde a
15 unidade de controle (C_U) 102 compreende mecanismo 402, preferivelmente controlado por computador, para fornecer o campo magnético 302 e para liberar o campo magnético localmente. Um outro modo de atrair os rótulos secundários para a superfície poderia ser usar atração eletrostática, onde a etapa de liberar o rótulo da superfície 401 poderia compreender uma aplicação de uma corrente ou
20 tensão à superfície 401, a um nível e sinal que remove a força de atração eletrostática e/ou provê uma força repulsiva eletrostática.

Ainda mais, para acelerar a vinculação dos rótulos secundários 204, estes podem ser atraídos para a localização desejada contendo os rótulos primários 203, isto é, a superfície se sensor 103 com um campo magnético.
25 Remoção ou não vinculação ou vinculação fraca de rótulos secundários 204 pode ser obtida com uma força magnética distante da superfície do sensor 203. Ainda mais, o tipo de rótulo a ser atraído para uma certa localização pode ser discriminado pela frequência do campo de atuação. Rótulos de um tipo particular podem ser magnetizados em frequências de campo mais altas do que rótulos de

um outro tipo. Usando campo de alta frequência é possível atrair um tipo de rótulo, embora não afetando rótulos de um outro tipo. A detecção das partículas seria feita tipicamente usando uma frequência de campo onde ambos os rótulos são magnetizados.

5 Ao invés de usar campo magnético e utilizar as propriedades magnéticas, o meio de separação (S_M) 101 poderia exatamente compreender uma superfície apresentando tais propriedades de superfície de modo que os rótulos secundários 204 serão anexados, onde a etapa de liberar os rótulos da superfície 401 compreende fornecer energia de calor à superfície 401 (de tal modo
10 que a energia seguida pelo calor excede a energia de vinculação entre o rótulo e a superfície). Conseqüentemente, um aquecedor controlado a computador pode exatamente ser implementado para controlar a liberação dos rótulos secundários 204. Um método adicional para atrair os rótulos secundários 204 para a superfície 401 pode ser devido a atração eletrostática, onde a etapa de liberar os rótulos da
15 superfície 401 compreende aplicação de uma corrente ou tensão à superfície 401 em um nível e sinal que remova a força de atração eletrostática e/ou proveja uma força repulsiva eletrostática.

 A Figura 5 ilustra graficamente as etapas funcionais a partir de onde os rótulos primários 203 na Figura 4 são anexados a superfície 103 na
20 ausência dos rótulos secundários 204 (o lado esquerdo da Figura 5), até que os rótulos secundários 204 tenham sido liberados da superfície 401 e sejam anexados aos rótulos primários (lado direito da Figura 5). A seta 501 pode responder pela aplicação prévia de um campo magnético ou energia de calor que causa a liberação dos rótulos secundários 204 da superfície 401.

25 A Figura 6 mostra ainda uma outra realização de um dispositivo 600 de acordo com a presente invenção, para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários, em um ensaio, usando rótulos magnéticos secundários 204, onde o meio de separação (S_M) 101 compreende uma superfície de alojamento 603 à qual os rótulos magnéticos secundários 204 estão ligados via, por exemplo,

vinculação química ou atraídos via força externa para a superfície de alojamento 603, de tal modo que uma força magnética ou elétrica nesta realização, rótulos inertes secundários ou quaisquer outras espécies de rótulos inertes ou partículas não possuindo elementos de vinculação, são usados para prover uma camada
5 inerte nos rótulos secundários 204. Os rótulos secundários 204 inertes podem ser atraídos para a superfície 603 onde os rótulos primários 204 estão, por exemplo, aplicando um campo magnético, onde o mesmo campo magnético pode ser adaptado para manter ambos rótulos secundários “ativos” (compreendendo elementos de vinculação) e os rótulos secundários 204 inertes. O resultado disto é
10 que os rótulos primários 203, que ainda não tenham se ligado à superfície do biossensor 103, não podem se vincular aos rótulos secundários, protegidos pela camada inerte, e os rótulos secundários podem ser colocados dentro da mesma câmara. A liberação dos rótulos secundários 204, ambos aqueles não possuindo elementos de vinculação, e aqueles possuindo elemento de vinculação, poderiam
15 ser realizados liberando ou trocando o campo. O papel da unidade de controle (C_U) 102 nesta realização poderia compreender controlar o campo elétrico ou magnético.

A Figura 7 ilustra graficamente as etapas funcionais realizadas no dispositivo mostrado na Figura 6, onde o lado esquerdo mostra a camada inerte
20 700 formada pelos rótulos secundários 204 inertes e rótulos primários 204 ao redor dos rótulos secundários 203. O lado direito da Figura 7 mostra onde os rótulos inertes 204 foram liberados da superfície, por exemplo, liberando o campo magnético.

A Figura 8 mostra ainda uma outra realização de um dispositivo
25 800 de acordo com a presente invenção, para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários em um ensaio, usando rótulos magnéticos secundários. Nesta realização, o meio de separação compreende um meio de encapsulamento 803 e removedor de encapsulamento 801 possuindo um acoplamento com um material que pode ser ativado magneticamente, mecanicamente, quimicamente ou

eletricamente, para se dissolver ou se decompor e então liberar o rótulo do meio de encapsulamento 803. O processo de encapsulamento 803 pode ser executado no local no dispositivo 800, ou externamente. Se, como um exemplo, os rótulos secundários 204 estão encapsulados em um polímero, ou se dissolverão o derreterão na aplicação de calor (por exemplo, geles tais como agarose de baixo ponto de fusão, ceras, e polímeros vinculados por hidrogênio). Conseqüentemente, o removedor de encapsulamento 801 poderia compreender um aquecedor para fornecer o calor. Em uma realização, os rótulos secundários podem ser encapsulados colocando-os em um polímero ou cápsula lipídica e então pode ser forçado a abrir, na exposição a um pulso de ultra som. O meio de encapsulamento pode cobrir nanopartículas individuais ou grupos de nanopartículas. A unidade de controle (C_U) 102 é conseqüentemente adaptada para controlar o removedor de encapsulamento 801 e o acoplamento ao material.

A Figura 9 ilustra graficamente as etapas funcionais efetuadas no dispositivo mostrado na Figura 8, onde inicialmente os rótulos secundários 203 são encapsulados no meio de encapsulamento 803, até que o meio de encapsulamento 803 tenha sido removido e a metade de vinculação 309 seja exposta e possa se vincular à metade 310 no rótulo primário 204.

A Figura 10 mostra ainda uma outra realização de um dispositivo 1000 de acordo com a presente invenção, para encapsular os rótulos secundários para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários em um ensaio, usando rótulos magnéticos secundários. Nesta realização, o meio de separação compreende um complexo 1004 que poderia inicialmente ser mantido separado dos rótulos em um reservatório 1001, onde o complexo contém pelo menos uma primeira metade 1002 para vincular os rótulos primários e uma segunda metade 1003 para vincular ao rótulo secundário 203. Nesta realização, os rótulos primários não compreendem metades de vinculação que os habilitem a se vincular diretamente ao rótulo secundário. Conseqüentemente, o complexo 1004 provê uma vinculação entre os rótulos primários e secundários 203, 204. O resultado

disto é que os rótulos primários e os rótulos secundários podem ser colocados dentro da mesma câmara.

O complexo pode ser liberado a partir de um reservatório 1001 isolado fisicamente, conforme mostrado aqui, ou ativado e liberado a partir de uma camada de encapsulamento similar à descrita previamente. A unidade de controle (C_U) 102 pode ser adaptada para controlar o reservatório 1001, por exemplo controlando o fluxo dos complexos 1002 do reservatório na câmara principal.

A Figura 11 ilustra graficamente as etapas funcionais executadas no dispositivo mostrado na Figura 10, mostrando o rótulo primário 204 com apenas um tipo de metade de vinculação 302, onde, após a adição do complexo 1004, o rótulo secundário 203 pode se vincular ao rótulo primário 204 via metades de vinculação 1002, 1003.

A Figura 12 mostra um fluxograma de um método para amplificar um sinal gerado a partir dos rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, usando rótulos secundários de nanopartículas. O ensaio pode compreender um ensaio de sanduíche, um ensaio direto, um ensaio competitivo ou de inibição e similar. Inicialmente, os rótulos secundários de nanopartículas são separados dos rótulos primários de nanopartículas (S1) 1201. Isto pode ser feito para permitir que rótulos primários se vinculem inicialmente a uma superfície de biossensor. Os rótulos primários que não tenham se vinculado ou sejam vinculados fracamente, podem ser posteriormente removidos através de lavagem com força (por exemplo, magnética ou hidrodinâmica) no sentido de evitar a amplificação de rótulos primários não vinculados especificamente (isto é, rótulos que não estão anexados a um alvo). Subseqüentemente, os rótulos secundários são liberados no ensaio compreendendo os rótulos primários (S2) 1202, onde a liberação dos rótulos secundários é feita de um modo controlado. Os rótulos secundários se vinculam aos rótulos primários e os rótulos secundários que não são vinculados ou são fracamente vinculados aos rótulos primários podem ser removidos.

Certos detalhes específicos da realização descrita são relatados para fins de explanação ao invés de limitação, de modo a prover um entendimento claro e direto da presente invenção. Entretanto, deveria ser entendido por aqueles especialistas na técnica que a presente invenção pode ser praticada em outras realizações que não são exatamente conformes aos detalhes aqui relatados, sem se afastar significativamente do espírito e escopo desta descrição. Adicionalmente, neste contexto, e para as finalidades de brevidade e clareza, descrições detalhadas de aparelhos, circuitos e metodologias bem conhecidos, foram omitidos de modo a evitar detalhe desnecessário e possível confusão.

A inclusão dos sinais de referência nas reivindicações é somente por razões de clareza e não deve ser considerada como limitando o escopo das reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1 Método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas (204) em um ensaio, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- 5 - manter (1201) pelo menos os rótulos secundários de nanopartículas (203) separados dos rótulos primários de nanopartículas, pelo menos um dos rótulos primários e secundários de nanopartículas (203, 204) sendo rótulos magnéticos, e onde os rótulos secundários de nanopartículas (203) são adaptados para se vincular aos rótulos primários de nanopartículas (204);
- 10 - controlar (1202) a liberação dos rótulos secundários (203) no ensaio, com o controle incluindo a liberação dos rótulos secundários (203) no ensaio subsequente após os rótulos primários (204) serem vinculados a uma superfície de um biossensor (103) compreendida no ensaio; e,
- 15 - detectar o campo produzido pelo tal pelo menos um dos rótulos primários e secundários de nanopartículas (203, 204),
 onde o diâmetro dos rótulos secundários (203) é menor que o dos rótulos primários (204).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a liberação subsequente inclui ainda uma subsequente não vinculação ou uma vinculação fraca de rótulos primários ao biossensor (103) após serem removidas.

20

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os rótulos primários (204) de nanopartículas compreendem dois ou mais tipos diferentes de rótulos de nanopartículas em um ensaio de multi substância a ser detectada.

25

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, pelo menos os rótulos secundários de nanopartículas (203), compreendem adicionalmente rótulos terciários de nanopartículas, rótulos quaternários de nanopartículas; etc., que são separados um do outro, onde os

rótulos terciários de nanopartículas são adaptados para se vincular a rótulos secundários de nanopartículas, os rótulos quaternários de nanopartículas são adaptados para se vincular a rótulos terciários de nanopartículas, etc.

5 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos rótulos secundários de nanopartículas (203) compreende um ou mais tipos diferentes de rótulos secundários de nanopartículas.

10 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, antes da detecção do sinal gerado, os rótulos primário (204) e secundário (203) que são não vinculados ou fracamente vinculados a uma superfície de um biossensor 103 compreendia no ensaio, são removidos do ensaio.

15 7. Uso de uma combinação de rótulo primário de nanopartículas e rótulos secundários de nanopartículas para amplificar um sinal gerado a partir de rótulo primário de nanopartículas em um ensaio, caracterizado pelo fato de que os pelo menos um rótulo secundário de nanopartículas que têm diâmetro que é menor que o diâmetro do rótulo primário de nanopartículas são adaptados para serem anexados aos rótulos primários de nanopartículas e deste modo atuam como um agente de amplificação.

20 8. Dispositivo (100) para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas (204) em um ensaio, caracterizado pelo fato de que compreender:

- um meio de separação (101) para manter pelo menos rótulos secundários de nanopartículas (203) separados dos rótulos primários de nanopartículas, onde os rótulos secundários de nanopartículas (203) são adaptados para se vincular aos rótulos primários de nanopartículas (204);
- 25 - uma unidade de controle (102) para controlar a liberação dos rótulos secundários no ensaio, sendo o pelo menos um dentre os rótulos primários e secundários de nanopartículas (203, 204) rótulos magnéticos;
- um produtor de campo magnético (F_P) (104) para gerar um campo magnético (106) e deste modo induzir momentos magnéticos nos rótulos; e,

- um biossensor (103) incluindo uma superfície (103) para detectar o campo produzido pelo tal pelo menos um dos rótulos primários de nanopartículas (203) afixado à superfície (103) e pelos rótulos secundários de nanopartículas (204) afixado aos rótulos primários de nanopartículas (203) onde o controle da liberação dos rótulos secundários no ensaio é baseada em um comando de liberação indicando que os rótulos primários de nanopartículas (203) estão afixados à superfície (103).

9. Dispositivo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio de separação (101) é selecionado de um grupo consistindo de:

- um reservatório (201) que é fisicamente isolado de uma câmara contendo os rótulos primários (204) e secundários (203) de nanopartículas,
- uma superfície de alojamento (401) adaptada para receber os rótulos secundários de nanopartículas via campos de força externos ou via força de vinculação química, e um mecanismo de força para aplicar a força externa,

- uma superfície de alojamento (603) adaptada para receber os rótulos secundários de nanopartículas via campos de força externos ou via força de vinculação química, uma camada de encapsulamento de rótulos inertes para gerar uma camada inerte (701) cobrindo a superfície dos rótulos secundários de nanopartículas (203) na superfície de alojamento (603), e um mecanismo de força para aplicar a força externa,

- um meio de encapsulamento (803) e um removedor de encapsulamento (801) para liberar os rótulos do meio de encapsulamento, e

- um reservatório (1001) compreendendo um complexo (1004) contendo os meios de vinculação para prover um elemento de vinculação necessário para vincular os rótulos primário (204) e secundário (203) juntos; e,

- uma superfície de alojamento compreendendo um complexo (1004) contendo os meios de vinculação para prover o elemento de vinculação necessário para vincular os rótulos primário e secundário juntos e um meio de encapsulamento para encapsular o complexo e removedor de encapsulamento para

remover o meio do encapsulamento do complexo.

10. Dispositivo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o biossensor (103) compreende um dispositivo GMR, TMR, AMR ou Hall para detectar o campo produzido.

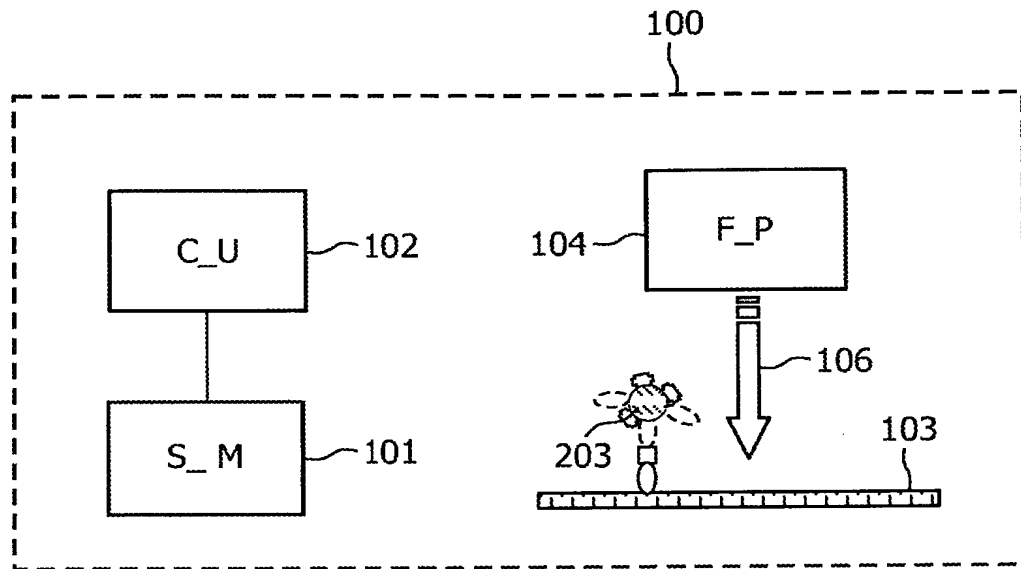


FIG. 1

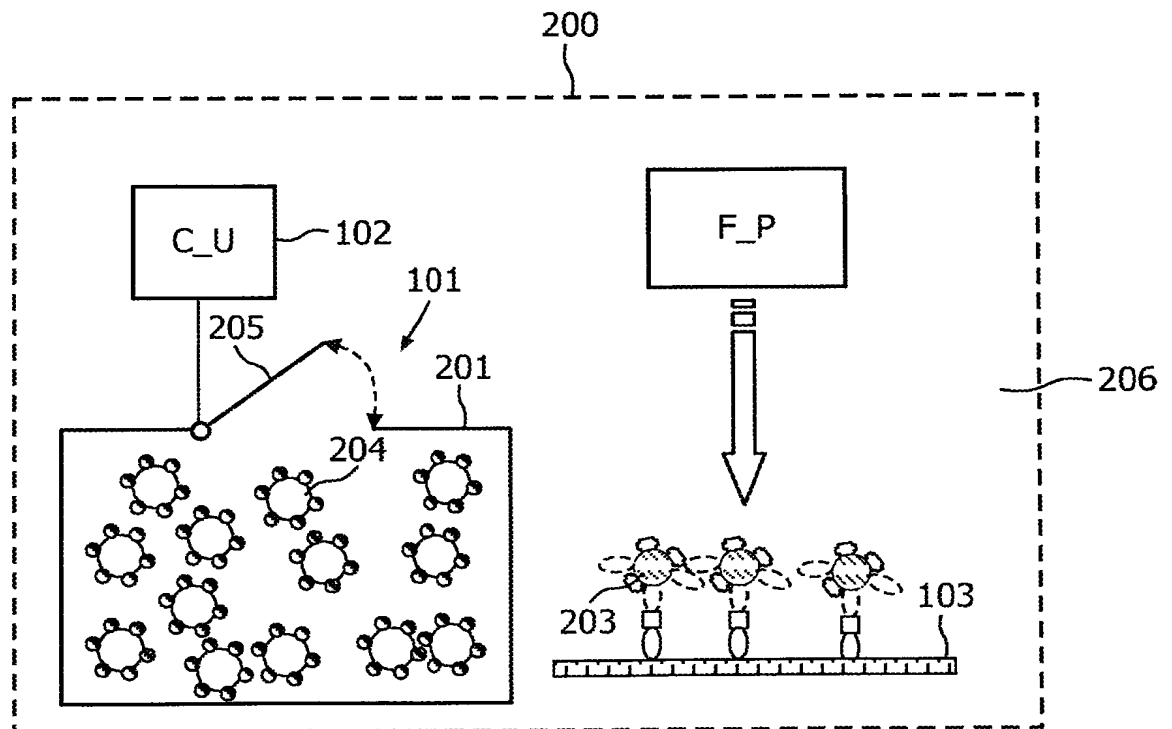


FIG. 2

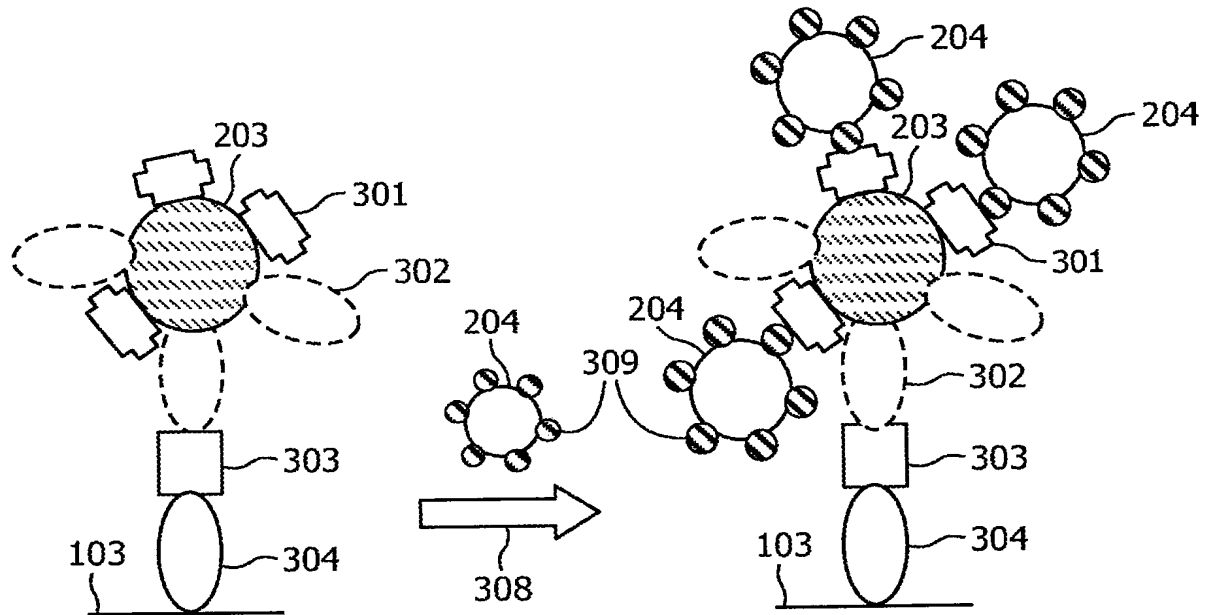


FIG. 3

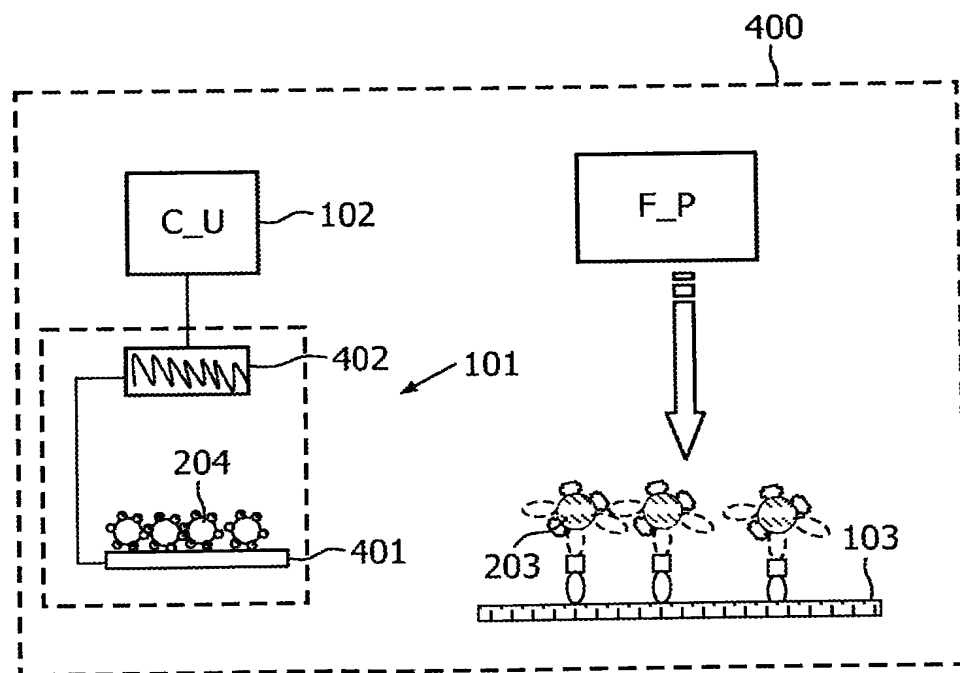


FIG. 4

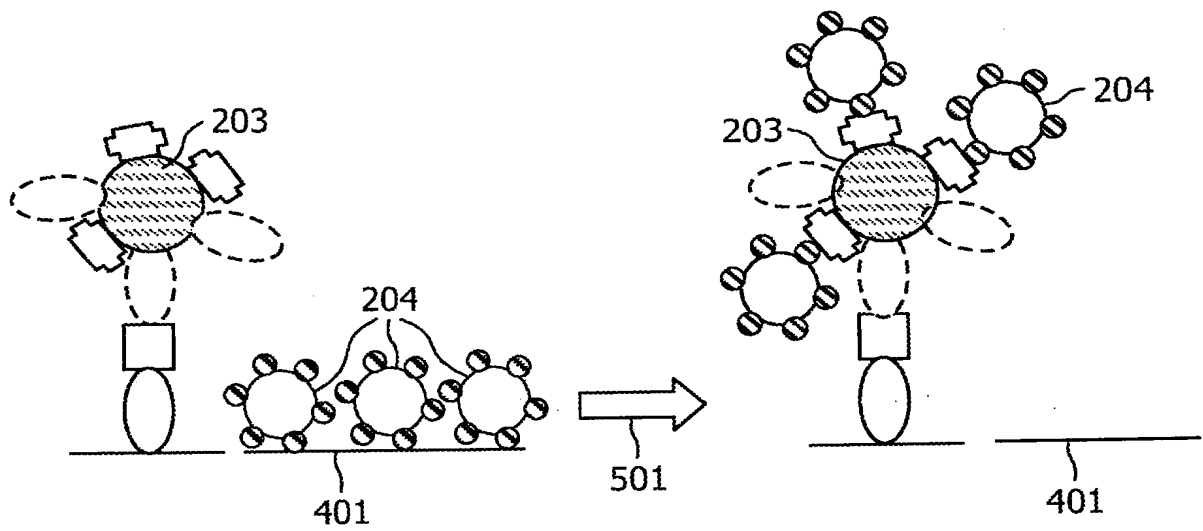


FIG. 5

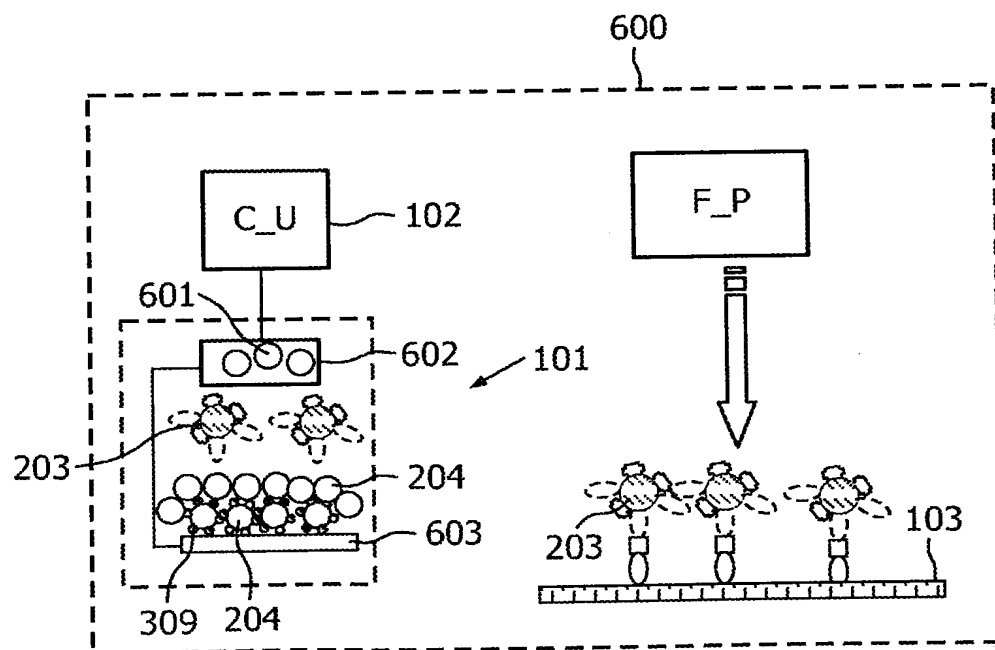


FIG. 6

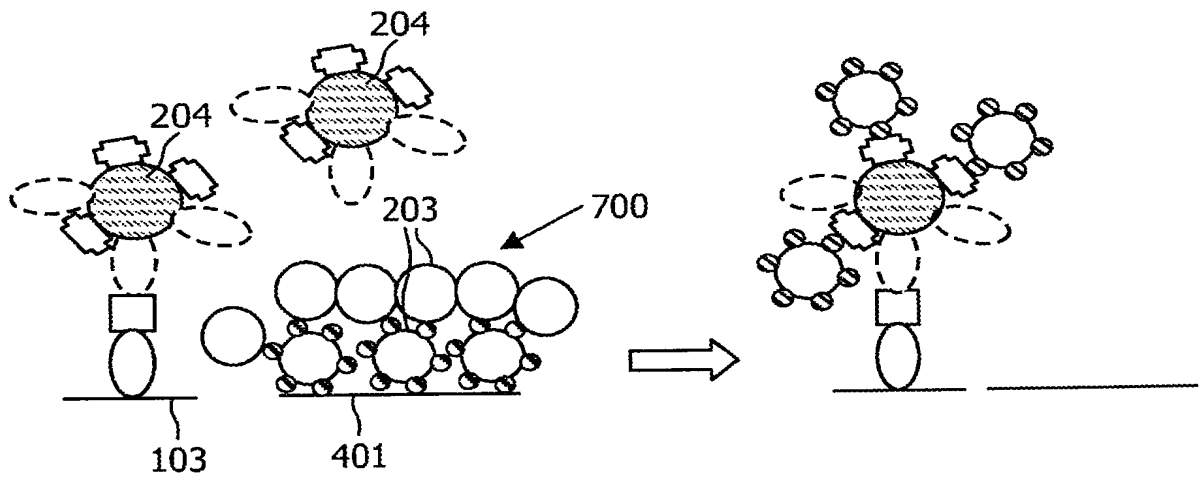


FIG. 7

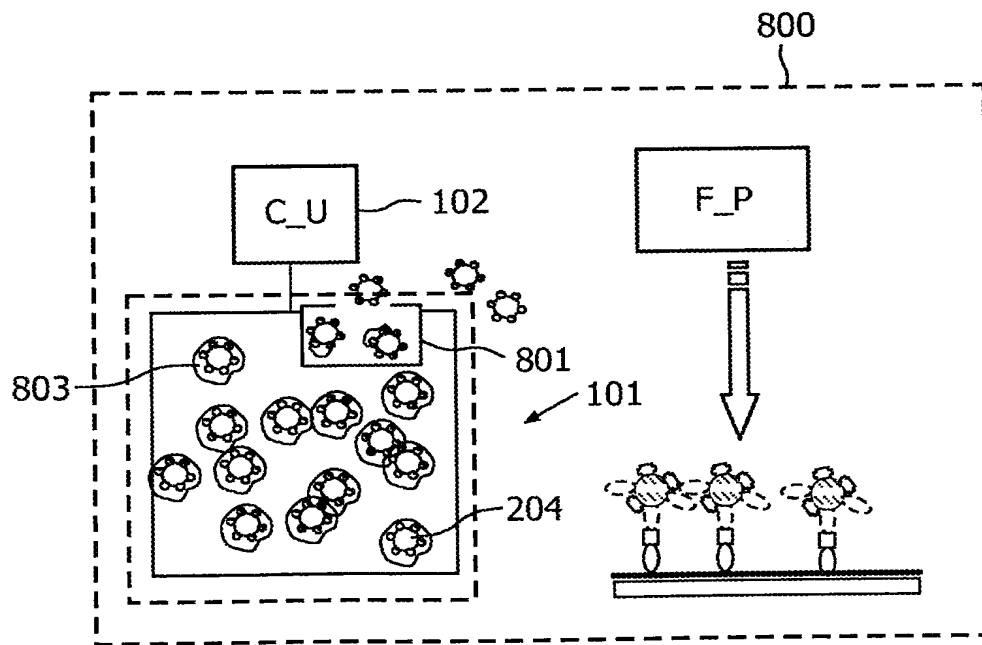


FIG. 8

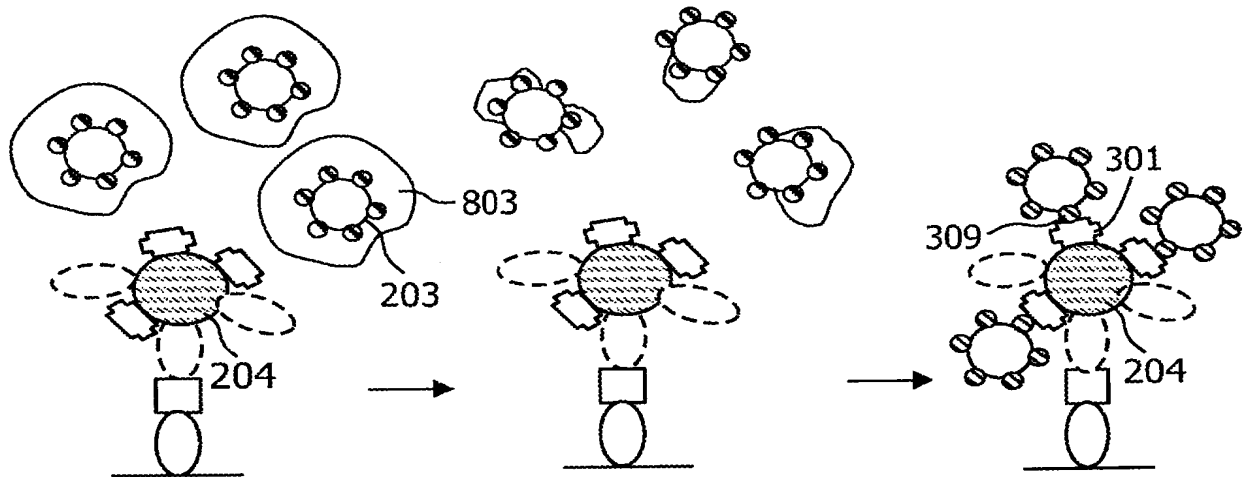


FIG. 9

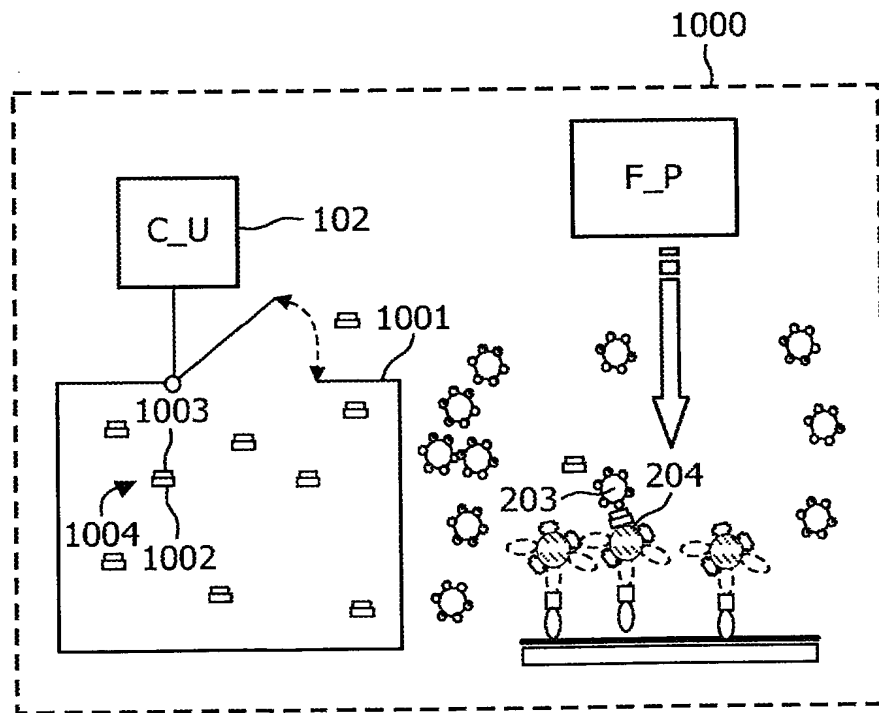


FIG. 10

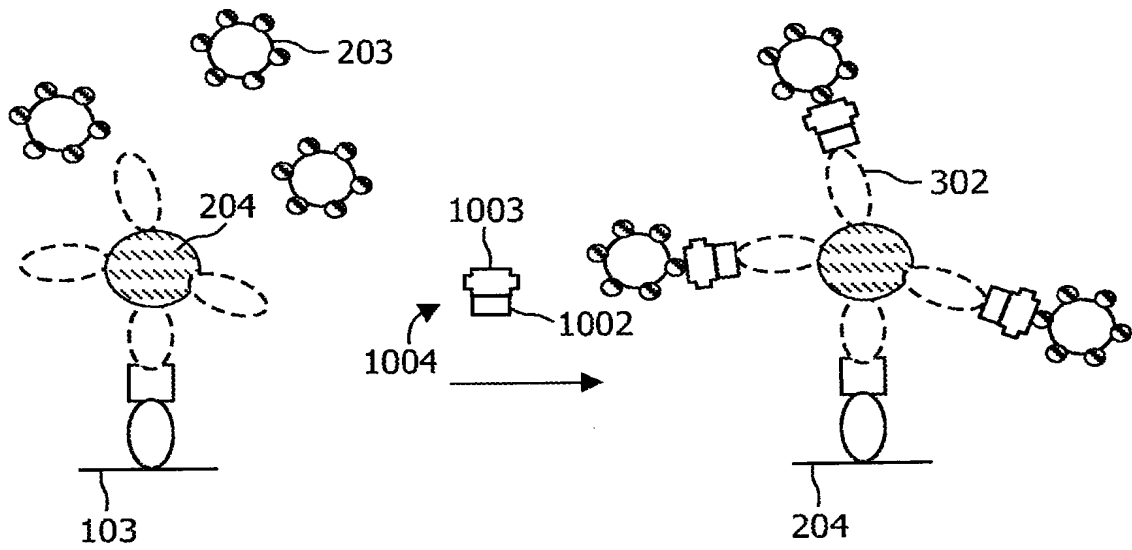


FIG. 11

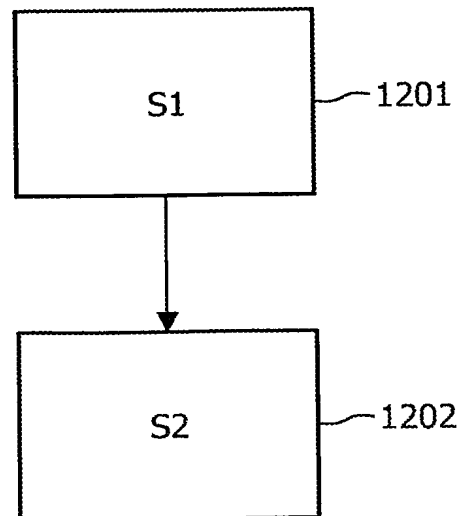


FIG. 12

RESUMO

“MÉTODO, USO DE UMA COMBINAÇÃO DE RÓTULO PRIMÁRIO DE NANOPARTÍCULAS E RÓTULOS SECUNDÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS, E, DISPOSITIVO PARA AMPLIFICAR UM SINAL GERADO A PARTIR DE RÓTULOS PRIMÁRIOS DE NANOPARTÍCULAS EM UM ENSAIO”

Esta invenção relaciona-se a um dispositivo e um método para amplificar um sinal gerado a partir de rótulos primários de nanopartículas em um ensaio, usando rótulos secundários de nanopartículas, tipicamente rótulos magnéticos, onde vinculando os rótulos secundários aos rótulos primários, os resultados naquele sinal produzidos a partir dos rótulos será amplificado.