

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 602**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 29/02 (2006.01)
G01N 29/22 (2006.01)
G01N 29/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015** **PCT/US2015/049387**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016** **WO16044055**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015** **E 15842191 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021** **EP 3194961**

54 Título: **Resonador acústico de volumen de película delgada con mejora de señal**

30 Prioridad:

15.09.2014 US 201462050589 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SALVATI, MICHAEL y
HARMON, IAN, ROBERT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 863 602 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Resonador acústico de volumen de película delgada con mejora de señal

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a la mejora de señales de los resonadores acústicos de volumen de película delgada (TFBAR) a través de una carga de masa mediada por un elemento de amplificación.

10 **Antecedentes**

Los dispositivos piezoeléctricos tal como los resonadores acústicos de volumen de película delgada (TFBAR) y las tecnologías similares como las de microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) se han empleado como detectores de masa desde hace algún tiempo. Una aplicación de los resonadores piezoeléctricos es la detección de cantidades muy pequeñas de materiales. Los resonadores piezoeléctricos usados como sensores en tales aplicaciones a veces se denominan "microbalanzas". Un resonador piezoeléctrico normalmente se construye como una capa plana, delgada de material piezoeléctrico cristalino o policristalino intercalado entre dos capas de electrodos. Cuando se usa como sensor, el resonador se expone al material que está siendo detectado para permitir que el material se una a una superficie del resonador.

Una forma convencional de detectar la cantidad de material unido en la superficie de un resonador sensor es operar el resonador como un oscilador en su frecuencia resonante. A medida que el material que está siendo detectado se une a la superficie del resonador, se reduce la frecuencia de oscilación del resonador. El cambio en la frecuencia de oscilación del resonador, presumiblemente, provocado por la unión del material a la superficie del resonador, se mide y se usa para calcular la cantidad de material unido en el resonador o la velocidad a la que el material se acumula sobre la superficie del resonador.

La sensibilidad de un resonador piezoeléctrico al aire como sensor de material es teóricamente proporcional al cuadrado de la frecuencia de resonancia. De este modo, las sensibilidades de los sensores de material basados en los populares resonadores de cristal de cuarzo están limitadas por sus frecuencias de oscilación relativamente bajas, que normalmente varían de varios MHz a aproximadamente 100 MHz. El desarrollo de la tecnología de resonador de película delgada (TFR) puede producir potencialmente sensores cuyas sensibilidades mejoran significativamente. Un resonador de película delgada se forma depositando una película delgada de material piezoeléctrico, tal como AlN o ZnO, sobre un sustrato. Debido al escaso grosor espesor de la capa piezoeléctrica en un resonador de película delgada, que es del orden de varios micrones, la frecuencia de resonancia del resonador de película delgada es del orden de 1 GHz. Las altas frecuencias de resonancia y las correspondientes altas sensibilidades hacen que los resonadores de película delgada sean útiles para aplicaciones de detección de materiales. Sin embargo, la sensibilidad de masa incluso de los resonadores de película delgada puede estar limitada para la detección de ciertos analitos, tales como analitos biológicos.

El uso de sensores de resonador piezoeléctrico en inmunoensayos se ha descrito previamente. En general, los inmunoensayos basados en piezoeléctricos, en los que el cambio de masa es atribuible a la reacción inmunológica entre un antígeno y un anticuerpo, en ocasiones, puede adolecer de poca sensibilidad y de un límite de detección deficiente. En consecuencia, en la técnica existe la necesidad de un ensayo de unión específico basado en piezoeléctricos en el que la reacción entre un componente de reconocimiento molecular y su analito diana pueda amplificarse para proporcionar un ensayo más sensible.

Un ejemplo de este tipo se presenta en la patente de EE. UU. n.º 4.999.284 expedida a Ward el 12 de marzo de 1991, que divulga un método que usa un ensayo de microbalanza de cristal de cuarzo, en el que la unión del analito a una superficie en o cerca de una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es detectada por un conjugado que incluye una enzima. La enzima es capaz de catalizar la conversión de un sustrato en un producto capaz de acumularse sobre o de reaccionar con una superficie de la QCM dando lugar a un cambio de masa y, por ende, un cambio en la frecuencia de resonancia. Hay sensores piezoeléctricos alternativos para su uso en ensayos para detectar un analito que están bien documentados, por ejemplo, sensores acústicos de volumen (CN 1.566.933), resonadores acústicos de volumen de película delgada (documento US 2006/0125489) y sensores de ondas acústicas de superficie (documento WO 2008/019693). Los resonadores acústicos de volumen de película delgada pueden utilizar métodos de mejora de la señal, tal como la carga de masa mediada por un elemento de amplificación, como se presenta en el documento WO 2014/143680. El documento WO 2014/143680 toma el 15 de marzo de 2013 como fecha de prioridad y se publicó el 18 de septiembre de 2014. Por lo tanto, se considera parte del estado de la técnica de conformidad con el artículo 54, apartado 3, del CPE.

Sumario

Esta divulgación describe la amplificación de una señal para mejorar la sensibilidad de un TFBAR que opera a alta frecuencia.

La presente invención proporciona un método y un sistema para detectar un analito en una muestra. El método comprende:

entrar en contacto con un analito y, opcionalmente, un analito ligado a una etiqueta, un primer componente de reconocimiento, y un segundo componente de reconocimiento ligado a un elemento de amplificación para generar un complejo que comprenda el primer componente de reconocimiento y el segundo componente de reconocimiento ligado al elemento de amplificación,

en donde el primer componente de reconocimiento está inmovilizado en una superficie de un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR) que tiene una frecuencia de resonancia de 1,8 GHz o más y está configurado para unir selectivamente uno o más analitos y, opcionalmente, un analito ligado a una etiqueta unido al segundo componente de reconocimiento,

en donde el segundo componente de reconocimiento ligado al elemento de amplificación está configurado para unirse selectivamente al analito y, opcionalmente, al analito ligado a una etiqueta unido al primer componente de reconocimiento; y

en donde el segundo componente de reconocimiento se conjuga con un primer compañero de unión, el elemento de amplificación se conjuga con un segundo compañero de unión configurado para unirse selectivamente al primer compañero de unión, y en donde el elemento de amplificación está ligado al segundo componente de reconocimiento mediante la unión entre el primer y segundo compañeros de unión;

entrar en contacto con el elemento de amplificación ligado a un precursor de amplificación en condiciones que permitan convertir el precursor de amplificación en una molécula que añade masa en una superficie del TFBAR; y

medir la masa añadida en la superficie del TFBAR.

La masa añadida puede ser el resultado de la deposición de la molécula de amplificación en la superficie; la unión de la molécula de amplificación a uno o más analitos, la molécula de analito ligado a una etiqueta, el primer componente de reconocimiento o el segundo componente de reconocimiento ligado a un elemento de amplificación; o similares.

El sistema comprende:

un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR) que comprende una superficie en la que se inmoviliza un primer componente de reconocimiento, estando configurado el primer componente de reconocimiento para unirse selectivamente al analito y, opcionalmente, a un analito ligado a una etiqueta al que se une un segundo componente de reconocimiento, teniendo el TFBAR una frecuencia de resonancia de 1,8 GHz o más;

uno o más recipientes que alojan: un precursor de amplificación; opcionalmente, uno o más de la etiqueta y el analito; y el segundo componente de reconocimiento y un elemento de amplificación, estando el segundo componente de reconocimiento opcionalmente ligado al elemento de amplificación, en donde el segundo componente de reconocimiento opcionalmente ligado al elemento de amplificación comprende el segundo componente de reconocimiento conjugado con un primer compañero de unión y el elemento de amplificación conjugado con un segundo compañero de unión que está configurado para unirse selectivamente al primer compañero de unión, en donde, en uso, el elemento de amplificación está ligado al segundo componente de reconocimiento a través de la unión del primer y segundo compañeros de unión;

una trayectoria de fluido desde el uno o más recipientes hasta la superficie del TFBAR a la que está unido el primer componente de reconocimiento;

circuitos de actuación configurados para accionar el TFBAR en un movimiento oscilatorio;

circuitos de medición dispuestos para acoplarse al TFBAR y configurados para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilatorio del resonador sensor; y

un controlador acoplado operativamente a los circuitos de actuación y medición.

El analito o el analito y la molécula de analito ligado a una etiqueta, el primer componente de reconocimiento y el segundo componente de reconocimiento ligados al elemento de amplificación pueden entrar en contacto en cualquier orden adecuado. Por ejemplo, el analito o el analito y la molécula de analito ligado a una etiqueta pueden entrar en contacto con el segundo componente de reconocimiento ligado al elemento de amplificación antes de entrar en contacto con el primer componente de reconocimiento inmovilizado en la superficie del TFBAR. A modo de

ejemplo adicional, el analito o el analito y la molécula de analito ligado a una etiqueta pueden entrar en contacto con el primer componente de reconocimiento antes de entrar en contacto con el segundo componente de reconocimiento ligado al elemento de amplificación. A modo de otro ejemplo adicional, el analito o la molécula de analito ligado a una etiqueta, el primer componente de reconocimiento y el segundo componente de reconocimiento ligados al elemento de amplificación pueden entrar en contacto simultáneamente.

El elemento de amplificación puede ligarse al segundo componente de reconocimiento en cualquier momento adecuado. En algunas realizaciones, el elemento de amplificación está ligado al segundo componente de reconocimiento antes de entrar en contacto con el analito o la molécula de analito ligado a una etiqueta. En algunas realizaciones, el elemento de amplificación se liga al componente de reconocimiento secundario después de que el segundo componente de reconocimiento entre en contacto con el analito o el analito ligado a una etiqueta. En algunas realizaciones, el elemento de amplificación se liga al segundo componente de reconocimiento mediante un enlace covalente. En algunas realizaciones, el elemento de amplificación y el segundo componente de reconocimiento incluyen restos que se unen con gran afinidad. A modo de ejemplo, el componente de reconocimiento secundario puede estar biotinilado y el elemento de amplificación puede conjugarse con avidina o estreptavidina; o viceversa.

La masa añadida o unida a la superficie del TFBAR puede medirse mediante cualquier proceso adecuado. En las realizaciones preferidas, la masa se mide: (i) acoplando una señal eléctrica de entrada al TFBAR, teniendo la señal eléctrica de entrada una frecuencia dentro de una banda de resonancia del resonador piezoeléctrico, en donde la frecuencia es de 1,8 GHz o más (tal como aproximadamente de 2 GHz o más, aproximadamente de 2,2 GHz o más, aproximadamente de 2,4 GHz o más, aproximadamente de 2,5 GHz o más, o desde aproximadamente 2 GHz hasta aproximadamente 2,5 GHz); (ii) transmitiendo la señal eléctrica de entrada a través o por medio del TFBAR para generar una señal eléctrica de salida con una frecuencia; (iii) recibiendo la señal eléctrica de salida del TFBAR; y (iv) determinando un cambio en el desplazamiento de fase de la señal eléctrica de salida provocado por la deposición del precipitado en la superficie del TFBAR, en donde el cambio de desplazamiento de fase sirve como medida de la masa añadida en la superficie del TFBAR.

Una o más realizaciones de los sistemas o métodos descritos en el presente documento proporcionan una o más ventajas sobre los sistemas o métodos anteriores para detectar pequeñas cantidades de un analito. Como se ha descrito en el presente documento, a frecuencias más altas, sorprendentemente, se observó una amplificación de la señal TFBAR mayor con una carga de masa mediada por un elemento de amplificación, que a frecuencias más bajas. Por consiguiente, las ventajas de las frecuencias más altas parecen potenciarse aún más cuando se emplean en combinación con la amplificación de la señal. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente esta y otras ventajas a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Las **FIGS. 1A-1C** son diagramas esquemáticos que ilustran los principios operativos de las realizaciones de los dispositivos de detección de resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR).

La **FIG. 2** es un diagrama esquemático que muestra los componentes de un sistema TFBAR para detectar un analito.

Las **FIGS. 3A-D** son dibujos esquemáticos que ilustran una realización de una amplificación de señal en una superficie de un resonador de película delgada (TFR).

Las **FIGS. 4A-D** son dibujos esquemáticos que ilustran una realización de una amplificación de señal en una superficie de un TFR.

Las **FIGS. 5A-B** son diagramas esquemáticos de una realización de un primer compañero de unión unido a una superficie de un TFR (**5A**) y un componente de reconocimiento unido a un segundo compañero de unión, que está unido al primer compañero de unión (**5B**).

La **FIG. 6A** es un gráfico de la respuesta a lo largo del tiempo de la unión directa del analito y la unión del analito amplificado con enzima en una realización de un TFBAR.

La **FIG. 6B** es un gráfico que muestra detalles de una parte del diagrama presentado en la **FIG. 4A**.

La **FIG. 7** es un dibujo esquemático que ilustra una realización de diversos componentes polinucleótidos unidos a una superficie de un TFR como se describe en el EJEMPLO 2.

Los dibujos esquemáticos no están necesariamente a escala. Los números similares usados en las figuras se refieren a componentes, etapas y similares análogos. Sin embargo, se entenderá que el uso de un número para referirse a un componente en una figura dada no pretende limitar el componente en otra figura etiquetada con el mismo número. Además, el uso de números diferentes para referirse a componentes no pretende indicar que los

componentes numerados de manera diferente no puedan ser iguales o similares.

Descripción detallada

5 Esta divulgación se refiere, en general, a métodos y sistemas para detectar un analito, así como a sensores y dispositivos adecuados para su uso en dichos métodos y sistemas. Los métodos, dispositivos, sensores y sistemas usan un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR) que mide un cambio de frecuencia o fase del resonador provocado por la unión del analito en una superficie del resonador. La señal de unión se potencia a través de la carga de masa mediada por un elemento de amplificación. Una señal eléctrica de entrada que tiene una fase y
10 tiene una frecuencia dentro de una banda de resonancia del resonador piezoeléctrico, que es de 1,8 GHz o más se acopla y se transmite a través del resonador para generar una señal eléctrica de salida que se desplaza en frecuencia o en fase con respecto a la señal de entrada debido a la unión, deposición, etc. del material que está siendo detectando en la superficie del resonador y amplificación debido a la carga de masa mediada por el elemento de amplificación. La señal eléctrica de salida recibida del resonador piezoeléctrico se analiza para determinar el
15 cambio de frecuencia o fase provocado por la unión del analito y la deposición de masa mediada por un elemento de amplificación sobre la superficie del resonador. El cambio de frecuencia o fase medido proporciona información cuantitativa con respecto al analito (o molécula de analito ligado a una etiqueta) unido a la superficie del resonador.

Sensores, dispositivos y sistemas

20 Los sensores divulgados en el presente documento incluyen al menos un sensor basado en un resonador de película delgada, tal como un sensor basado en un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR). Un sensor TFBAR incluye una capa piezoeléctrica o sustrato piezoeléctrico y un transductor de entrada y salida. Los sensores TFBAR son pequeños sensores que hacen que la tecnología sea adecuada para su uso en dispositivos portátiles. Por consiguiente, se contempla un dispositivo portátil para detectar analitos diana que comprende un sensor descrito en el presente documento.

Volviendo ahora a los dibujos con referencia a las **FIGS. 1A y 1B**, se muestran los principios operativos generales de una realización de un resonador piezoeléctrico de ondas acústicas de volumen **20** usado como sensor para detectar
30 un analito. El resonador **20** normalmente incluye una capa plana de material piezoeléctrico delimitada en lados opuestos por dos capas metálicas respectivas que forman los electrodos del resonador. Las dos superficies del resonador son libres de sufrir un movimiento vibratorio cuando el resonador es accionado por una señal dentro de la banda de resonancia del resonador. Cuando el resonador se usa como sensor, al menos una de sus superficies está adaptada para proporcionar sitios de unión para el material que está siendo detectado. La unión del material a la
35 superficie del resonador altera las características resonantes del resonador, y los cambios en las características resonantes se detectan e interpretan para proporcionar información cuantitativa relativa al material que está siendo detectado.

A modo de ejemplo, tal información cuantitativa puede obtenerse detectando un cambio en el desplazamiento de fase del coeficiente de inserción o reflexión del resonador provocado por la unión del material que está siendo detectado en la superficie del resonador. Tales sensores difieren de los que operan el resonador como un oscilador y monitorizan los cambios de la frecuencia de oscilación. En su lugar, tales sensores insertan el resonador en la trayectoria de una señal de una frecuencia preseleccionada y monitorizan la variación del desplazamiento de fase del coeficiente de inserción o reflexión provocado por la unión del material que está siendo detectado en la superficie
45 del resonador. Por supuesto, también se pueden emplear sensores que monitorizan los cambios en la frecuencia de oscilación de conformidad con la amplificación de señal descrita en el presente documento.

Para más detalles, la **FIG. 1A** muestra el resonador **20** antes de que el material que está siendo detectado se una a su superficie **26**. El resonador ilustrado **20** está acoplado eléctricamente a una fuente de señales **22**, que proporciona una señal eléctrica de entrada **21** que tiene una frecuencia **f** dentro de la banda de resonancia del resonador. La señal eléctrica de entrada se acopla al resonador. **20** y se transmite a través del resonador para proporcionar una señal eléctrica de salida **23**. En la realización ilustrada, la señal eléctrica de salida **23** está a la misma frecuencia que la señal de entrada **21**, pero difiere en fase de la señal de entrada en un desplazamiento de fase $\Delta\Phi_1$, que depende de las propiedades piezoeléctricas y de las dimensiones físicas del resonador. La señal de salida **23** se acopla a un detector de fase **24** que proporciona una señal de fase relacionada con el desplazamiento de fase de inserción.

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

La **FIG. 1C** muestra una alternativa a la medición de la fase de inserción del resonador. Se añade un acoplador direccional **27** entre la fuente de señales **22** y el resonador **20** con el electrodo opuesto conectado a tierra. Un

detector de fase **28** está configurado para medir el desplazamiento de fase del coeficiente de reflexión como resultado de la unión del material a la superficie del resonador.

Otros sensores de desplazamiento de fase TFBAR que pueden emplearse con la amplificación de señal descrita en el presente documento incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 8.409.875 titulada "RESONATOR OPERATING FREQUENCY OPTIMIZATION FOR PHASE-SHIFT DETECTION SENSORS". Por ejemplo, los aparatos sensores pueden incluir (i) un resonador sensor que comprende sitios de unión para un analito; (ii) circuitos de actuación configurados para accionar el resonador sensor en un movimiento oscilatorio; (iii) circuitos de medición dispuestos para acoplarse al resonador sensor y configurados para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilatorio del resonador de detección; y (iv) un controlador acoplado operativamente a los circuitos de actuación y medición. El controlador puede interactuar con el almacenamiento de datos que contiene instrucciones que, cuando se ejecutan, hacen que el controlador ajuste la frecuencia a la que los circuitos de actuación accionan el resonador sensor para mantener un punto de resonancia del resonador sensor. Por consiguiente, la detección se puede obtener accionando el TFBAR en un movimiento oscilatorio; midiendo una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilatorio del TFBAR; y ajustando la frecuencia de actuación del resonador sensor para mantener un punto de resonancia del TFBAR. La frecuencia a la que los circuitos de actuación accionan el resonador sensor puede ser una frecuencia de retardo de grupo máximo.

Tales planteamientos de detección de fase se pueden usar ventajosamente con resonadores piezoeléctricos de diferentes frecuencias de resonancia.

Los TFBAR para su uso con los métodos y el sistema descritos en el presente documento tienen frecuencias de resonancia de 1,8 GHz o más, tal como de aproximadamente 2 GHz o más, 2,2 GHz o más, 2,5 GHz o más, de aproximadamente 3 GHz o más o de aproximadamente 5 GHz o más. Dichos TFBAR pueden proporcionar una mayor sensibilidad cuando se usan con carga de masa mediada por un elemento de amplificación, como se describe con más detalle a continuación. Los TFBAR pueden tener frecuencias de resonancia de 2 GHz a aproximadamente 2,5 GHz. Algunas de estas frecuencias son sustancialmente más altas que las frecuencias de los resonadores piezoeléctricos descritos anteriormente.

Los resonadores sensores descritos en el presente documento son resonadores de película delgada. Los resonadores de película delgada comprenden una capa delgada de material piezoeléctrico depositada sobre un sustrato, en lugar de usar, por ejemplo, cuarzo de corte AT. Las películas piezoeléctricas normalmente tienen un grosor menor que aproximadamente 5 micrómetros, tal como menos de aproximadamente 2 micrómetros, y puede tener grosores de menos de aproximadamente 100 nanómetros. Generalmente se prefieren los resonadores de película delgada debido a sus altas frecuencias de resonancia y las sensibilidades teóricamente más altas. Dependiendo de las aplicaciones, se puede formar un resonador de película delgada usado como elemento sensor para soportar modos de resonancia de onda acústica de volumen, longitudinales o bien de cizallamiento. Preferentemente, el elemento sensor está formado para soportar modos de resonancia de ondas acústicas de cizallamiento de volumen, ya que son más adecuados para su uso en una muestra líquida.

Los detalles adicionales relativos a los dispositivos y sistemas sensores que pueden emplear TFR se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.932.953 expedida el 3 de agosto de 1999 a Drees *et al.*

Los sensores TFR se pueden fabricar de cualquier manera adecuada y con cualquier material adecuado. A modo de ejemplo, un resonador puede incluir un sustrato tal como una oblea de silicio o zafiro, una capa de espejo de Bragg u otro medio de aislamiento acústico adecuado, un electrodo inferior, un material piezoeléctrico y un electrodo superior.

Se puede usar cualquier material piezoeléctrico adecuado en un TFR. Entre los ejemplos de sustratos piezoeléctricos adecuados se incluyen tantalato de litio (LiTaO_3), niobato de litio (LiNbO_3), óxido de zinc (ZnO), nitruro de aluminio (AlN), titanato de circonato de plomo (PZT) y similares.

Los electrodos pueden formarse con cualquier material adecuado, tal como aluminio, tungsteno, oro, titanio, molibdeno o similares. Los electrodos pueden depositarse por deposición de vapor o pueden formarse mediante cualquier otro proceso adecuado.

Cualquier sistema adecuado de la invención puede emplear un resonador de película delgada y una amplificación como se describe en el presente documento. A modo de ejemplo y con referencia a la **FIG. 2**, un sistema para detectar un analito puede incluir un recipiente **10** (o más de un recipiente), el resonador de película delgada **20**, circuitos de actuación **22**, circuitos de medición **29** y electrónica de control **30**. Una trayectoria de fluido acopla el uno o más recipientes **10** al resonador **20**. La electrónica de control **30** está operativamente acoplada a los circuitos de actuación y a los circuitos de medición. En unas realizaciones, la electrónica de control **30** está configurada para modificar la frecuencia a la que los circuitos de actuación **22** hacen oscilar el resonador **20** basándose en la entrada de los circuitos de medición **29**.

Todavía con referencia a la **FIG. 2**, el recipiente **10** (o más de un recipiente) puede albergar una molécula de amplificación, un segundo componente de reconocimiento ligado a un elemento de amplificación o componentes del mismo y, opcionalmente, uno o más de una etiqueta, una molécula de analito y un primer componente de reconocimiento. Cada uno de estos reactivos se describe con más detalle más adelante. La electrónica de control **30** puede controlar el flujo de tales reactivos desde el recipiente **10** al resonador **20**; por ejemplo, por medio de una bomba, vacío o similar.

Cualquier electrónica de control adecuada **30** puede emplearse. Por ejemplo, la electrónica de control puede incluir un procesador, un controlador, una memoria o similares. La memoria puede incluir instrucciones legibles por ordenador que, cuando son ejecutadas por el procesador o el controlador, hacen que el dispositivo y la electrónica de control realicen diversas funciones atribuidas al dispositivo y a la electrónica de control descritas en el presente documento. La memoria puede incluir cualquier medio volátil, no volátil, magnético, óptico o eléctrico, tal como una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), una memoria RAM no volátil (NVRAM), una ROM programable eléctricamente borrrable (EEPROM), una memoria flash o cualquier otro medio digital. La electrónica de control **30** puede incluir uno o más de un microprocesador, un controlador, un procesador de señal digital (DSP), un circuito integrado de aplicación específica (ASIC), una matriz de puertas lógicas programables en campo (FPGA) o circuitos lógicos discretos o integrados equivalentes. En algunos ejemplos, la electrónica de control **30** puede incluir múltiples componentes, tal como cualquier combinación de uno o más microprocesadores, uno o más controladores, uno o más DSP, uno o más ASIC o uno o más FPGA, así como otros circuitos lógicos discretos o integrados. Las funciones atribuidas a la electrónica de control en el presente documento pueden incorporarse como software, firmware, hardware o cualquier combinación de los mismos.

Reconocimiento molecular y amplificación de señales

El reconocimiento molecular de una muestra que comprende una señal de fondo significativa puede facilitarse mediante la amplificación de la señal. Los sistemas y métodos descritos en el presente documento emplean un segundo componente de reconocimiento que comprende un elemento de amplificación tal como una enzima ligada. Los sensores TFBAR, en los intervalos de frecuencia más altos descritos en el presente documento, respondieron de manera muy eficiente al aumento de masa de la superficie del sensor debido a la precipitación de un sustrato escindido por una enzima.

Con referencia ahora a la **FIGS. 3A-D**, se muestran dibujos esquemáticos que ilustran la amplificación enzimática en un TFBAR. Como se ilustra en la **FIG. 3A**, un componente de reconocimiento molecular **100** configurado para unirse a un analito se ha inmovilizado en una superficie **26** de un resonador **20**. El resonador **20**, que tiene un componente de reconocimiento molecular inmovilizado **100**, puede entrar en contacto con una composición que comprende un analito **110**, que puede unirse al componente de reconocimiento molecular **100** (véase la **FIG. 3B**). El resonador **20**, que tiene un componente de reconocimiento molecular inmovilizado **100** al que está unido el analito **110**, puede entrar en contacto con una composición que comprende un segundo componente de reconocimiento molecular **120** ligado a un elemento de amplificación **130** tal como una enzima. El segundo componente de reconocimiento molecular **120** está configurado para unirse al analito **110** tal como el segundo componente de reconocimiento molecular **120** y el elemento de amplificación ligado **130** están inmovilizados con respecto a la superficie **26** (véase la **FIG. 3C**). En las realizaciones ilustradas, un elemento de amplificación **130** puede convertir un sustrato soluble **140** en un producto insoluble **150**, que se precipita y acumula en la superficie **26** del resonador **20**, amplificando así la señal de masa en función de la cantidad o concentración del analito unido **110** (véase la **FIG. 3D**).

Se debe entender que la serie de acontecimientos descritos en las **FIGS. 3A-3D** se muestran con fines ilustrativos y que se puede emplear cualquier otra secuencia adecuada de acontecimientos. Por ejemplo, el analito **110** puede entrar en contacto con el segundo componente de reconocimiento molecular **120** (y un elemento de amplificación unido **130**) antes de que el analito (con el segundo componente de reconocimiento molecular unido) entre en contacto con la superficie **26** del resonador **20** con respecto al cual el componente de reconocimiento molecular **100** está inmovilizado. El sustrato **140** puede estar presente en el momento en el que el segundo componente de reconocimiento molecular **120** - elemento de amplificación **130** se añade o se puede añadir más tarde. En cualquier caso, el lavado se puede realizar antes de la amplificación.

Entre los ejemplos no limitantes de analitos diana se incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, anticuerpos, enzimas, carbohidratos, compuestos químicos o especies infecciosas como bacterias, hongos, protozoos, virus y similares. En determinadas aplicaciones, el analito diana es capaz de unirse a más de un componente de reconocimiento molecular.

Cualquier componente de reconocimiento molecular adecuado (p. ej., **100** en la **FIG. 3**) puede estar unido a la superficie de un resonador. El componente de reconocimiento molecular se une preferentemente de manera selectiva al analito de interés. A modo de ejemplo, el componente de reconocimiento molecular puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos, análogos de ácidos nucleicos, tales como moléculas de PNA y LNA, proteínas, péptidos, anticuerpos incluyendo IgA, IgG, IgM, IgE, lectinas, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos de enzimas, inhibidores de enzimas, receptores, ligandos, quinasas, Proteína A, Poli U, Poli A, Polilisina, tinte de triazina, ácido borónico, tiol, heparina, polisacáridos, azul de Coomassie, azul A,

péptidos de unión a metales, azúcar, hidratos de carbono, agentes quelantes, células procariotas y células eucariotas.

Se puede usar cualquier método adecuado para inmovilizar un componente de reconocimiento molecular en una superficie de un TFBAR. A modo de ejemplo, se puede depositar un revestimiento uniforme de epoxisilano sobre la superficie del sensor usando un proceso de deposición por vapor. Los componentes de reconocimiento molecular, de ensayo y referencia, tales como unos anticuerpos, se pueden depositar a continuación, sobre los resonadores de ensayo y referencia usando, por ejemplo, una nano-dispensación basada en piezotecnología. Las aminas primarias de los anticuerpos reaccionan con los grupos epóxido que unen covalentemente el anticuerpo a la superficie del sensor. A modo de ejemplo adicional, un grupo tiol, si estuviera presente, en el componente de reconocimiento molecular puede unirse a una superficie del TFBAR. La superficie del TFBAR se puede modificar, según resulte apropiado o necesario, para permitir la unión del componente de reconocimiento molecular.

Cualquier componente de reconocimiento molecular adecuado, como los descritos anteriormente, se puede usar como segundo componente de reconocimiento molecular (p. ej., **120** en la **FIG. 3**). El segundo componente de reconocimiento molecular puede estar ligado a cualquier elemento de amplificación adecuado, tal como una enzima. Preferentemente, el segundo componente de reconocimiento molecular es un anticuerpo y el elemento de amplificación es una enzima.

Cualquier elemento de amplificación adecuado puede ligarse al segundo componente de reconocimiento molecular. El elemento de amplificación puede ser un iniciador de polimerización activable, tal como un fotoiniciador, un iniciador químico o un termoiniciador. El iniciador de polimerización puede activarse en presencia de uno o más monómeros para hacer que un polímero se injerte desde el segundo componente de reconocimiento molecular. El elemento de amplificación puede ser una enzima. La enzima puede ser capaz de convertir un sustrato que es soluble en el entorno del ensayo en un producto insoluble que se precipita sobre la superficie del sensor. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina (ALP), peroxidasa de rábano picante (HRP), beta galactosidasa y glucosa oxidasa.

Ejemplos de sistemas de enzima/sustrato que son capaces de producir un producto insoluble que es capaz de acumularse sobre la superficie de un TFBAR incluyen fosfatasa alcalina y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/cloruro de nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT). La hidrólisis catalizada enzimáticamente de BCIP produce un dímero insoluble, que puede precipitarse sobre la superficie de los sensores. Se pueden usar otros sustratos análogos en los que se ha sustituido el resto de fosfato por tales funcionalidades hidrolíticamente escindibles como galactosa, glucosa, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y aminoácidos con sus enzimas complementarias. Otros sistemas de enzimas/sustratos incluyen enzimas peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o mieloperoxidasa, y uno de los siguientes: bencideno, diclorhidrato de bencideno, diaminobencidina, o-tolideno, o-dianisidina y tetrametilbencideno, carbazoles, en particular, 3-amino-9-etilcarbazol y varios compuestos fenólicos, de todos los cuales se ha informado que forman precipitados al reaccionar con peroxidasas. También, se pueden usar oxidasas tales como alfa-hidroxiácido oxidasa, aldehído oxidasa, glucosa oxidasa, L-aminoácido oxidasa y xantina oxidasa con sistemas de sustrato oxidables tales como una mezcla de metosulfato de fenazina-nitroazul de tetrazolio.

Se debe entender que puede emplearse cualquier tipo de ensayo competitivo. Se debe entender, además, que el analito puede modificarse para incluir una etiqueta reconocible por el primer o segundo complejo de reconocimiento, tal como una etiqueta de estreptavidina; etiqueta de biotina; una etiqueta de proteína de unión a quitina; una etiqueta de proteína de unión a maltosa; una etiqueta de glutatión-S-transferasa; una etiqueta de poli(His); una etiqueta de epítopo tal como un marcador MYC, una etiqueta HA o una etiqueta V5; o similares. Se debe entender, además, que el analito ligado a una etiqueta puede incluir una variante o derivado del analito. La variante o derivado es una variante o derivado que es reconocible selectivamente por el primer o segundo componente de reconocimiento molecular que está configurado para reconocer el analito. En algunas situaciones, podría ser deseable que la variante o el derivado de analito tenga afinidad por el primer o segundo componente de reconocimiento molecular que sea diferente de la afinidad del analito no ligado a una etiqueta. La variante o derivado del analito puede ser una variante o derivado que permita facilitar la fabricación del analito ligado a una etiqueta. Por ejemplo, el analito ligado a una etiqueta puede comprender un polipéptido recombinante, etc.

Cuando se realizan ensayos competitivos que emplean moléculas de analito ligadas a una etiqueta, la molécula de analito ligado a una etiqueta, en lugar de o además del analito, puede unirse a un primer componente de reconocimiento molecular inmovilizado en una superficie de un resonador.

Ahora con referencia a la **FIG. 4**, se ilustra una realización de un ensayo de amplificación de señal. Muchos de los componentes de la **FIG. 4** son iguales o similares a los componentes ilustrados en la **FIG. 3**. Si un elemento en particular no se expone específicamente con respecto a la **FIG. 4**, se hace referencia al elemento numerado en la **FIG. 3** anterior. Un elemento de amplificación de señal, **130** puede ligarse al segundo componente de reconocimiento **120** en cualquier momento adecuado. En algunas realizaciones (no ilustradas en la **FIG. 4**), el elemento de amplificación de señal **130** está ligado al segundo componente de reconocimiento **120** antes de entrar en contacto con el analito **110** o la molécula de analito ligada a una etiqueta. En algunas de estas realizaciones, el

elemento de amplificación de señal **130** está unido covalentemente al segundo componente de reconocimiento **120**.

En algunas realizaciones (p. ej., como se muestra en las **FIGS. 4C-D**), el elemento de amplificación de señal **130** está ligado al componente de reconocimiento secundario **120** después de que el segundo componente de reconocimiento **120** entre en contacto con el analito **110** o el analito ligado a una etiqueta. A modo de ejemplo, el segundo componente de reconocimiento **120** puede incluir un primer compañero de unión **123** configurado para unirse selectivamente al segundo compañero de unión del elemento de amplificación de señal **130**. Preferentemente, el primer compañero de unión **123** está unido covalentemente al segundo componente de reconocimiento **120**. Preferentemente, el segundo compañero de unión **135** está unido covalentemente al elemento de amplificación de señal **130**. Preferentemente, el primer **123** y el segundo **135** compañeros de unión se unen con alta afinidad.

Se puede emplear cualquier combinación adecuada del primer **123** y segundo **135** compañeros de unión. A modo de ejemplo, un componente de reconocimiento secundario **120** puede ser biotinilado, y el elemento de amplificación de señal **130** puede conjugarse con estreptavidina; o viceversa. A modo de ejemplo adicional, uno del primer y segundo compañeros de unión puede ser una etiqueta de polihistidina (His), y el otro del primer y segundo compañeros de unión puede ser, por ejemplo, un quelante del níquel o del cobre, tales como ácido iminodiacético (Ni-IDA) y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) para el níquel y carboximetilaspartato (Co-CMA) para el cobalto, al que la etiqueta de poli (His) puede unirse con afinidad micromolar. Generalmente, las resinas a base de níquel tienen una mayor capacidad de unión, mientras que las resinas a base de cobalto ofrecen la mayor pureza. A modo de otro ejemplo adicional, uno del primer y segundo compañeros de unión puede ser una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) y el otro del primer y segundo compañeros de unión puede ser glutatión. En otro ejemplo adicional, uno del primer y segundo compañeros de unión puede ser una etiqueta de proteína de unión a maltosa y el otro del primer y segundo compañeros de unión puede ser amilosa o maltosa. A modo de otro ejemplo, uno del primer y segundo compañeros de unión puede ser una etiqueta de proteína de unión a quitina y el otro del primer y segundo compañeros de unión puede ser quitina. Se debe entender que los compañeros de unión presentados anteriormente son meros ejemplos de compañeros de unión de alta afinidad que pueden conjugarse con un segundo componente de reconocimiento o un elemento de amplificación de señal y que se contemplan otros compañeros de unión en el presente documento.

Los compañeros de unión se pueden conjugar con un segundo componente de reconocimiento o un elemento de amplificación de señal mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se pueden emplear técnicas de conjugación química o recombinantes para ligar un compañero de unión al segundo componente de reconocimiento o elemento de amplificación de señal, según resulte apropiado. Tales técnicas resultan bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear un reticulante heterobifuncional que utiliza grupos funcionales éster de NHS y maleimida, como los que conocen los expertos en la técnica.

Se debe entender que, si el elemento de amplificación de señal y el segundo componente de reconocimiento incluyen compañeros de unión complementarios, el elemento de amplificación de señal puede ligarse al segundo componente de reconocimiento a través de compañeros de unión en cualquier momento adecuado. Por ejemplo y como se muestra en las **FIGS. 4C-D**, el elemento de amplificación de señal **130** puede ligarse al segundo componente de reconocimiento **120** después de que el segundo componente de reconocimiento **120** entre en contacto con el analito **110** o analito ligado a una etiqueta. En algunas realizaciones, el elemento de amplificación de señal **130** que contiene un segundo compañero de unión **135** entra en contacto con el segundo componente de reconocimiento **120** que contiene el primer compañero de unión **123** antes de que el segundo componente de reconocimiento **120** entre en contacto con el analito **110** o analito ligado a una etiqueta o al mismo tiempo que el segundo componente de reconocimiento **120** se introduce en el resonador.

Con referencia ahora a las **FIGS. 5A-B**, un primer componente de reconocimiento molecular **100** puede estar unido a una superficie **26** de un TFBAR **20** a través de uno o más intermediarios. Por ejemplo, un primer compañero de unión **99** puede unirse a la superficie **26** y el primer componente de reconocimiento molecular **100** puede incluir un segundo compañero de unión **101** configurado para unirse selectivamente al primer compañero de unión **99**. Los compañeros de unión **99, 101** pueden ser compañeros de unión como los que se han descrito anteriormente (p. ej., con respecto a la **FIG. 4**). El primer componente de reconocimiento **100** puede unirse a la superficie **26** a través de unos compañeros de unión **99, 101** en cualquier momento adecuado, tal como antes de que se incorpore el sensor **20** en un sistema o después de que el sensor **20** se incorpore al sistema. Por ejemplo, el primer componente de reconocimiento **100** puede unirse a la superficie **26** a través de unos compañeros de unión **99, 101** a modo de primera etapa de, o durante, un ensayo de detección de analitos.

Carga de masa mediada por un elemento de amplificación/amplificación de señal con TFBAR

Se ha observado que, a medida que aumenta la frecuencia de resonancia, también debería aumentar la sensibilidad en cuanto a la detección de masas. Sin embargo, esto no siempre se observa en la práctica. En teoría, un TFBAR que tiene una frecuencia de resonancia de aproximadamente 2,2 GHz debería proporcionar suficiente sensibilidad como para detectar concentraciones bajas de analitos sin el uso de una amplificación de señal/carga de masa como se describe en el presente documento. Sin embargo, los inventores han descubierto que incluso con frecuencias de resonancia tan altas, los sensores TFBAR no eran lo suficientemente sensibles como para detectar niveles bajos de analito. Sin embargo, utilizando las técnicas de amplificación/carga de masa descritas en el presente documento, se

pueden obtener ganancias de sensibilidad más altas que las teóricas ofrecidas operando a frecuencias más altas.

La susceptibilidad al ruido está relacionada con la propagación de la señal expuesta teóricamente más arriba. A frecuencias más altas, la señal se propaga a distancias más cortas, creando así un filtro de proximidad. Es decir, solo se mide lo que está próximo a la superficie. Sin embargo, lo que constituye una proximidad cambiará con la frecuencia y puede tener importantes ramificaciones prácticas con respecto a la susceptibilidad al ruido de fondo. La operación a frecuencias más altas con la carga de masa no solo da como resultado una mayor sensibilidad de la señal, también resulta en una menor susceptibilidad al ruido. Eso se puede traducir funcionalmente en, por ejemplo, requisitos de lavado menos estrictos ya que el segundo componente de reconocimiento molecular ligado al elemento de amplificación, que no está unido a la superficie del resonador (p. ej., vía analito unido al primer componente de reconocimiento molecular), no debería añadir una masa significativa en las proximidades de la superficie del resonador. Asimismo, se ha descubierto que los requisitos de lavado para obtener una lectura de referencia estable en una muestra negativa eran mucho menos estrictos con unos TFBAR de mayor frecuencia, lo que también puede deberse a la distancia más corta de propagación de una señal a una frecuencia más alta.

Sorprendentemente, se ha descubierto que se observa una mayor amplificación de la señal a frecuencias más altas que a frecuencias más bajas. Véase, p.ej. la **Tabla 2** de los siguientes EJEMPLOS, donde se observó una mayor amplificación de la señal con una carga de masa mediada por enzimas (en relación con la unión directa) a 2250 MHz en comparación con los resonadores de 900 MHz. El que se pudieran obtener mayores niveles de amplificación de señal a frecuencias más altas fue inesperado porque los diferentes resonadores (900 MHz y 2250 MHz) fueron contruidos para contener la misma concentración o cantidad del primer componente de reconocimiento, los ensayos usaron la misma concentración y cantidad de analito, y se usó la misma concentración y cantidad de segundo componente de reconocimiento molecular ligado a enzima y sustrato. De este modo, en teoría, se esperaría que la cantidad de amplificación que realmente tiene lugar sea la misma (se esperaría que la cantidad de producto precipitado sobre la superficie fuera la misma). Sin embargo, se observó una mayor cantidad de amplificación de la señal a frecuencias más altas.

Uso

Los sensores, dispositivos y sistemas descritos en el presente documento se pueden emplear para detectar un analito en una muestra. Los sensores pueden ser de utilidad en numerosas aplicaciones químicas, medioambientales, de seguridad alimentaria o médicas. A modo de ejemplo, una muestra que se quiera analizar puede ser o puede derivarse de sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina y similares. Otras composiciones de ensayo que no son composiciones fluidas pueden disolverse o suspenderse en una solución o disolvente apropiado para su análisis.

Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen los significados comúnmente usados en la técnica a menos que se especifique lo contrario. Las definiciones proporcionadas en el presente documento son para facilitar la comprensión de determinados términos usados con frecuencia en el presente documento y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Tal y como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" abarcan realizaciones que tienen referencias plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Tal y como se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, el término "o" generalmente se emplea en un sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario. El término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación cualquiera de dos o más de los elementos enumerados.

Tal y como se usa en el presente documento, "tiene", "que tiene", "incluye", "que incluye", "comprende", "que comprende" o similares se usan en su sentido más amplio y generalmente significan "que incluye, pero no se limita a". Se entenderá que las expresiones "consiste esencialmente en", "que consiste en" y similares están incluidas en las expresiones "que comprende" y similares. Tal y como se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en", en lo que respecta a una composición, producto, método o similar, significa que los componentes de la composición, producto, método o similares se limitan a los componentes enumerados y a cualquier otro componente que no afecte materialmente a la característica o características básicas y novedosas de la composición, producto, método o similar.

Los términos "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden aportar ciertos beneficios, en determinadas circunstancias. Sin embargo, también se pueden preferir otras realizaciones, en las mismas o en otras circunstancias. Asimismo, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles y no se pretende excluir otras realizaciones del ámbito de la divulgación, incluyendo las reivindicaciones.

También en el presente documento, las enumeraciones de intervalos numéricos entre puntos finales incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (p. ej., 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc. o 10 o menos incluye 10, 9,4, 7,6, 5, 4,3, 2,9, 1,62, 0,3, etc.). Cuando un intervalo de valores sea "hasta" un valor particular, ese valor está incluido dentro del intervalo.

Cualquier dirección a la que se haga referencia en el presente documento, como "arriba", "abajo", "izquierda", "derecha", "superior", "inferior", y otras direcciones y orientaciones se han descrito en el presente documento para una mayor claridad con referencia a las figuras y no deben limitar un dispositivo o sistema real o el uso del dispositivo o sistema. Los dispositivos o sistemas descritos en el presente documento pueden usarse en una serie de direcciones y orientaciones.

La expresión "evento de unión" tal y como se usa en el presente documento, significa la unión de un analito diana a un componente de reconocimiento molecular inmovilizado en la superficie de un sensor.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para describir de manera más exhaustiva la forma de usar los sensores, métodos y sistemas descritos anteriormente. Se debe entender que estos ejemplos sirven en modo alguno para limitar el alcance de esta divulgación, sino que se presentan con fines ilustrativos. Las realizaciones que queden fuera del alcance de las reivindicaciones se incluyen únicamente a efectos de referencia.

EJEMPLO 1: Prueba de concepto de amplificación de enzimas

Los estudios iniciales de prueba de concepto se realizaron utilizando un ensayo de IgG anti-bovino y fosfatasa alcalina (ALP) como enzima conjugada con BCIP/NBT como sustrato de precipitación. Brevemente, se inmovilizaron anticuerpos de cabra anti-bovino y anti-rata en los resonadores de prueba y de referencia dispensando puntos de 350 μm usando un dispensador piezoeléctrico en sensores recubiertos con epoxisilano con una frecuencia de resonancia de 2,2 GHz. Los sensores se incubaron durante la noche en un entorno muy húmedo a 4 °C. Los sensores se bloquearon con gelatina de piel de pescado antes del ensayo. A continuación, la señal de referencia se restó de la señal de prueba y esta señal delta se utilizó como respuesta de unión. Todas las pruebas se realizaron con los sensores sumergidos en placas de microtitulación. La agitación de la muestra se obtuvo usando varillas de agitación. La secuencia del ensayo fue como sigue, los sensores se expusieron a 1 $\mu\text{g/ml}$ de IgG bovina durante 60 segundos seguido de un aclarado de 30 segundos y de una exposición a un conjugado de IgG anti-bovino de conejo con fosfatasa alcalina durante 60 segundos. Luego, los sensores se aclararon 2 veces durante 30 segundos y se expusieron al sustrato BCIP/NBT durante 60 segundos. Los sensores se conectaron eléctricamente a un analizador de red que se usó para monitorizar el desplazamiento de frecuencia de los dispositivos. En este caso, se realizó un seguimiento de la fase resultante en el retardo de grupo máximo y se determinó el cambio en la frecuencia de entrada para mantener la fase a medida que cambiaba la masa. Se recopiló una ventana de 50 MHz alrededor de la frecuencia de resonancia a una frecuencia de muestreo de 2 muestras por segundo tanto para los resonadores de prueba como para los de referencia. Estos datos se procesaron posteriormente para determinar el desplazamiento de frecuencia en función del tiempo tanto para los resonadores de prueba y como para los de referencia. El desplazamiento de frecuencia observado a partir de la unión directa al antígeno se comparó luego con la señal observada en el sustrato enzimático.

Los resultados de este estudio inicial se presentan en la **FIG. 4A**, siendo la **FIG. 4B** una vista detallada de una porción del gráfico presentado en la **FIG. 4A**. Tal y como se muestra, la amplificación de la enzima ALP dio como resultado una mejora significativa de la sensibilidad en relación con la unión directa sin la adición del sustrato. Tal y como se muestra en la siguiente **Tabla 1**, en respuesta, se observó una amplificación de más de 100 veces y se observó una pendiente como resultado de la amplificación de la enzima.

Tabla 1: Resultados de la amplificación de la ALP

	Unión directa	Amplificación de enzimas
Respuesta (integral)	-9.024	-1.094.473
Amplificación (X)	121	
Pendiente	-3,24	-374,77
Amplificación de pendiente	115,71	

Se realizaron estudios similares utilizando un ensayo de IgG anti-bovino y peroxidasa de rábano picante (HRP) como enzima conjugada. El sustrato de precipitación en esta reacción fue peróxido de hidrógeno y ácido p-hidroxicinámico (datos no mostrados). También se realizó un análisis adicional sobre la mejora de la ALP con BCIP/NBT usando un ensayo de anticuerpo IgG anti-rata (datos no mostrados). El trabajo de desarrollo posterior con el sistema de ALP y BCIP/NBT ha incluido la evaluación con una variedad u otra.

Los beneficios de la amplificación de precipitados parecen depender de la frecuencia. Los dispositivos con frecuencias de funcionamiento de 2250 MHz y 850 MHz se recubrieron con un fragmento F(ab') de cabra anti-rata.

El grupo sulfhidrido natural en el F(ab') reducido se usó para ligarse a la superficie de oro del resonador formando un enlace dativo de oro y azufre. A continuación, estos sensores se bloquearon con gelatina de piel de pescado y se ensayaron en una muestra de tampón negativa o de IgG de rata de 1 µg/ml seguido de una incubación con un anticuerpo de cabra anti-rata conjugado con fosfatasa alcalina. A continuación, los sensores se aclararon dos veces y se expusieron al sustrato BCIP/NBT. Los datos se redujeron como se describió anteriormente tanto para el evento de unión directa como para la amplificación del sustrato. La comparación de los TFBAR de 2250 MHz a 900 MHz demuestra un aumento de 2,5 veces en la amplificación de la señal con la frecuencia más alta (2250 MHz) en relación con los dispositivos de 850 MHz. Adicionalmente, el nivel de fondo observado en la muestra negativa fue considerablemente más alto en los dispositivos de 850 MHz. Esto fue así cuando los datos se analizaron como kHz/s de respuesta, pero la diferencia se acusó aún más cuando los resultados se convirtieron a ppm/s dividiendo la respuesta al desplazamiento de frecuencia entre la frecuencia de operación. La adición de dos etapas de lavado adicionales antes de la exposición del sustrato redujo la cantidad de señal de fondo en los dispositivos de 850 MHz a niveles comparables a los observados en los dispositivos de 2250 MHz (datos no mostrados).

Tabla 2: Comparación de amplificación con TFBAR de 850 y 2250 MHz

Frecuencia (MHz)	2250	850
Señal de fondo en números negativos (ppm/s)	-0,86	-23,11
Unión directa (kHz/s)	-3,26	-0,70
Señal amplificada (kHz/s)	-233,7	-22,3
Amplificación (X)	71,7	31,9

EJEMPLO 2: Prueba de viabilidad de ADN

Para la unión del ADN a la superficie de los sensores, se disolvieron 10 µM de 27 meros marcado con 5'-amina (complementario al extremo 3' del oligonucleótido diana) y 10 µM de 27 meros sin sentido en 3X de solución salina con citrato de sodio (3X SSC) y se añadieron por puntos sobre los sensores funcionalizados con epoxisilano como ensayo y referencia respectivamente (TFBAR de 2150 MHz).

Se usó un oligonucleótido de 125 meros como modelo diana. El oligonucleótido diana se mezcló con 6 nM de 18 meros marcado con biotina 3' complementario al extremo 5' de 125 meros en tampón de hibridación (5X SSC, Formamida al 10 %, SDS al 0,1 %) y se hizo reaccionar con la superficie del sensor durante 4 minutos a 39 °C.

En la **FIG. 7** se muestra un diagrama esquemático del oligómero de 27 meros unido a la superficie del sensor y la diana de 125 meros, que está unida al biotinilado de 18 meros.

Luego se realizaron dos etapas de lavado (1X SSC con un 0,01 % de SDS y solución salina tamponada con HEPES más detergente) y el sensor se expuso a 2 µg/ml de conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina adquirido en Jackson Immuno (número de referencia 016-050-084) durante 2 minutos en tampón HEPES que contiene 1 mg/ml de gelatina de piel de pescado (FSG).

Se realizaron dos etapas de lavado adicionales con HEPES más detergente y el sensor se expuso al sustrato de precipitación NBT/BCIP adquirido en Thermo (número de referencia 34042). Los datos de desplazamiento de frecuencia se recopilaron durante 1,5 minutos a 39 °C y se presentan a continuación en la **Tabla 3**. El límite de detección estimado usando la respuesta cero más 3 desviaciones estándar arrojó un valor de 0,6 pM.

Tabla 3: Datos de desplazamiento de frecuencia

ADN diana (pM)	Respuesta promedio (kHz/s)
0	0,93
0,8	-0,48
4	-2,93
40	-38,15
400	-111,61

EJEMPLO 3: Inmunoensayo de dos etapas de interleucina-6 (IL-6)

Reactivos:

Se colocó anticuerpo de cabra anti IL-6 purificado por afinidad (R&D Systems Número de referencia AF-206-NA) sobre los sensores activados con epoxisilano (TFBAR de 2175 MHz) como se expuso anteriormente en general para el anticuerpo del EJEMPLO 1.

El anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IL-6 (número de referencia de R&D Systems MAB206) se marcó con un exceso molar 5X de sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El exceso de reactivo de biotina no incorporado se eliminó por desalación.

La matriz del calibrador se preparó mezclando suero de pollo al 10 % (v/v) (Carbón despojado, de Equitech, inactivado por calor) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) más azida de sodio al 0,1 %. Los calibradores se prepararon diluyendo IL-6 humana recombinante (número de referencia 206-IL de R&D Systems) en la matriz del calibrador.

5 La estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (SA-ALP) se adquirió en Jackson Immuno (número de referencia 016-050-084).

El tampón de lavado es una solución salina tamponada con Hepes más detergente.

10 El sustrato es 1-Step NBT/BCIP adquirido en Thermo Scientific (número de referencia 34042).

Ensayo:

15 Se diluyó anti IL-6 de ratón biotinilado hasta una concentración de trabajo de 8,3 µg/ml en un tampón Hepes que contenía gelatina de piel de pescado (Hepes/FSG).

Se diluyó SA-ALP hasta una concentración de trabajo de 1 µg/ml en Hepes/FSG.

20 Se mezclaron 60 µl de anti IL-6 de ratón biotinilado con 40 µl de calibrador y se hicieron pasar de un lado a otro sobre el sensor durante 16 minutos. A continuación, se retiró la mezcla de reacción del canal de microfluidos y se hizo pasar SA-ALP de un lado a otro del sensor durante 2 minutos. Después, el sensor se lavó tres veces con tampón de lavado seguido de la adición de sustrato BCIP/NBT. La tasa de cambio de la frecuencia de resonancia durante la etapa del sustrato se representó gráficamente con respecto a la concentración de IL-6. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 4**, incluyendo una estimación de la sensibilidad analítica (respuesta cero más 3 desviaciones estándar).

Tabla 4: Cambio de frecuencia para el ensayo IL-6

IL6 (pg/ml)	Respuesta (kHz/s)		Desv. estándar	VC	Calculada		
	Prueba	Promedio			(pg/ml)	Residuos	% Recuperación
0	-2,28	-2,12	0,23	11 %	0,83	0,83	
	-1,96				<0,83	NA	NA
5	-3,53	-3,48	0,08	2 %	5,83	0,83	116,6
	-3,42				5,42	0,42	108,4
10	-3,75	-4,67	0,88	19 %	6,65	-3,35	66,5
	-4,75				10,23	0,23	102,3
	-5,51				12,87	2,87	128,7
25	-8,61	-9,24	0,89	10 %	23,32	-1,68	93,28
	-9,87				27,48	2,48	109,92
100	-28,49	-31,44	2,77	9 %	90,05	-9,95	90,05
	-33,99				109,87	9,87	109,87
	-31,85				102,05	2,05	102,05
0+3SD	-2,82	estimación de sensibilidad analítica			3,11		

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito en una muestra, que comprende:

5 entrar en contacto con un analito (110) y, opcionalmente, un analito ligado a una etiqueta, un primer componente de reconocimiento (100) y un segundo componente de reconocimiento (120) ligado a un elemento de amplificación (130) para generar un complejo que comprende el primer componente de reconocimiento (100) y el segundo componente de reconocimiento (120) ligado al elemento de amplificación (130),

10 en donde el primer componente de reconocimiento (100) está inmovilizado en una superficie (26) de un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR) (20) con una frecuencia de resonancia de 1,8 GHz o más y está configurado para unirse selectivamente a uno o más analitos (110) y, opcionalmente, a un analito ligado a una etiqueta unido al segundo componente de reconocimiento (120),

15 en donde el segundo componente de reconocimiento (120) ligado al elemento de amplificación (130) está configurado para unirse selectivamente al analito (110) y, opcionalmente, al analito ligado a una etiqueta unido al primer componente de reconocimiento (100); y

20 en donde el segundo componente de reconocimiento (120) se conjuga con un primer compañero de unión (123), el elemento de amplificación (130) se conjuga con un segundo compañero de unión (135) configurado para unirse selectivamente al primer compañero de unión (123), y en donde el elemento de amplificación (130) está ligado al segundo componente de reconocimiento (120) mediante la unión entre el primer y segundo compañeros de unión (123 y 135);

25 entrar en contacto con el elemento de amplificación (130) ligado a un precursor de amplificación (140) en condiciones que permitan convertir el precursor de amplificación (140) en una molécula (150) que añade masa en una superficie (26) del TFBAR (20); y
medir la masa añadida en la superficie (26) del TFBAR (20).

30 2. El método de la reivindicación 1, en donde el analito (110) o el analito y el analito ligado a una etiqueta entran en contacto con el segundo componente de reconocimiento (120) ligado al elemento de amplificación (130) antes de entrar en contacto con el primer componente de reconocimiento (100) inmovilizado en la superficie (26) del TFBAR (20).

35 3. El método de la reivindicación 1, en donde el analito (110) o el analito y el analito ligado a una etiqueta entran en contacto con el primer componente de reconocimiento (100) antes de entrar en contacto con el segundo componente de reconocimiento (120) ligado al elemento de amplificación (130).

40 4. El método de la reivindicación 1, en donde el analito (110) o el analito ligado a una etiqueta, el primer componente de reconocimiento (100) y el segundo componente de reconocimiento (120) ligado al elemento de amplificación (130) entran en contacto simultáneamente.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde medir la masa añadida o unida a la superficie (26) del TFBAR (20) comprende:

45 acoplar una señal eléctrica de entrada al TFBAR (20), teniendo la señal eléctrica de entrada una frecuencia dentro de una banda de resonancia del resonador piezoeléctrico, en donde la frecuencia es de 1,8 GHz o más; transmitir la señal eléctrica de entrada a través o por medio del TFBAR (20) para generar una señal eléctrica de salida que tiene una frecuencia;

50 recibir la señal eléctrica de salida del TFBAR (20); y
determinar un cambio de desplazamiento fase de la señal eléctrica de salida provocado por la deposición del precipitado en la superficie (26) del TFBAR (20).

6. El método de la reivindicación 5, en donde el cambio de desplazamiento de fase es un cambio en el desplazamiento de fase del coeficiente de inserción o reflexión.

55 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde medir la masa añadida o unida a la superficie (26) del TFBAR (20) comprende:

60 accionar el TFBAR (20) en un movimiento oscilatorio a una frecuencia de aproximadamente 1,8 GHz o más; medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilatorio del TFBAR (20); y
ajustar la frecuencia de actuación del resonador sensor para mantener un punto de resonancia del TFBAR (20).

8. El método de la reivindicación 7, en donde el punto de resonancia del TFBAR (20) es un punto de retardo de grupo máximo.

65 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde la frecuencia es de 2 GHz o más.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde la frecuencia es de 2 GHz a 2,5 GHz.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el elemento de amplificación (130) es una enzima y el precursor de amplificación (140) es un sustrato, y en donde la enzima está configurada para convertir el sustrato en un precipitado.

12. Un sistema para detectar un analito en una muestra, que comprende:

- 10 un resonador acústico de volumen de película delgada (TFBAR) (20) que comprende una superficie (26) en la que se inmoviliza un primer componente de reconocimiento (100), estando configurado el primer componente de reconocimiento (100) para unirse selectivamente al analito (110) y, opcionalmente, a un analito ligado a una etiqueta al que se une un segundo componente de reconocimiento (120), teniendo el TFBAR (20) una frecuencia de resonancia de 1,8 GHz o más;
- 15 uno o más recipientes (10) que alojan: un precursor de amplificación (140); opcionalmente, uno o más de la etiqueta y el analito (110); y el segundo componente de reconocimiento (120) y un elemento de amplificación (130), estando el segundo componente de reconocimiento (120) opcionalmente ligado al elemento de amplificación (130), en donde el segundo componente de reconocimiento (120) opcionalmente ligado al elemento de amplificación (130) comprende el segundo componente de reconocimiento (120) conjugado con un primer compañero de unión (123) y el elemento de amplificación (130) conjugado con un segundo compañero de unión (135) que está configurado para unirse selectivamente al primer compañero de unión (123), en donde, en uso, el elemento de amplificación (130) está ligado al segundo componente de reconocimiento (120) a través de la unión del primer y segundo compañeros de unión (123 y 135);
- 20 una trayectoria de fluido desde el uno o más recipientes (10) hasta la superficie (26) del TFBAR (20) al que está unido el primer componente de reconocimiento (100);
- 25 circuitos de actuación (22) configurados para accionar el TFBAR (20) en un movimiento oscilatorio; circuitos de medición (29) dispuestos para acoplarse al TFBAR (20) y configurados para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilatorio del resonador sensor; y
- 30 un controlador (30) acoplado operativamente a los circuitos de actuación y medición (22 y 29).

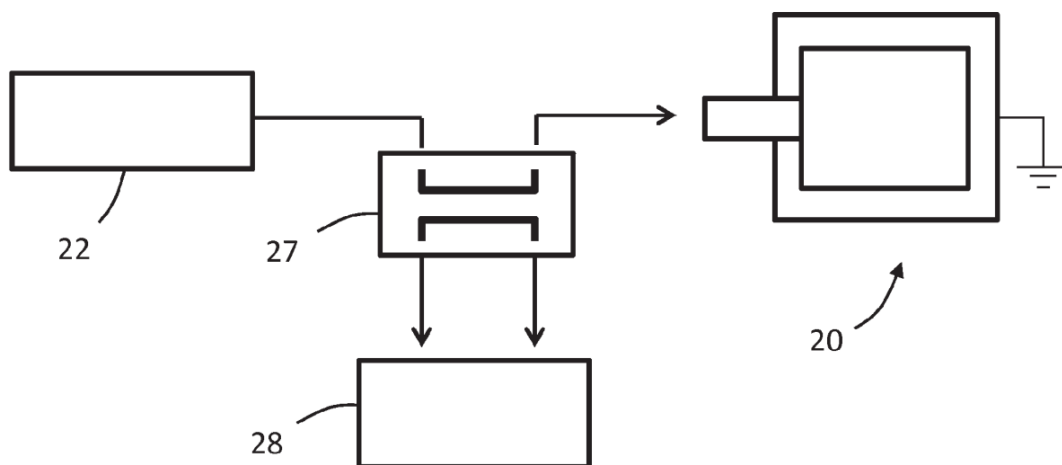
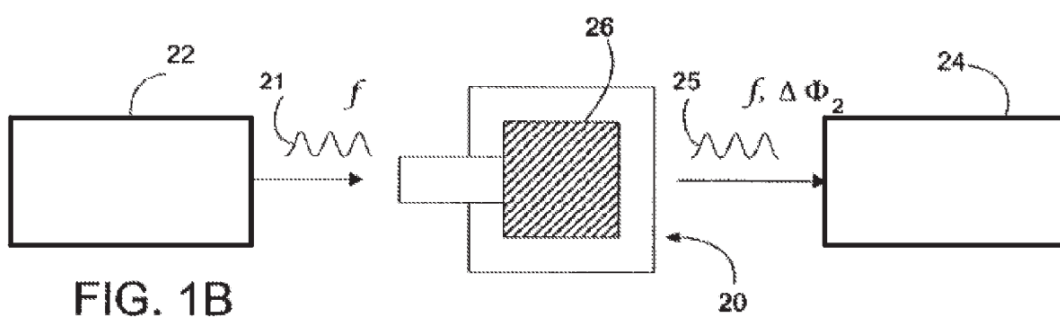
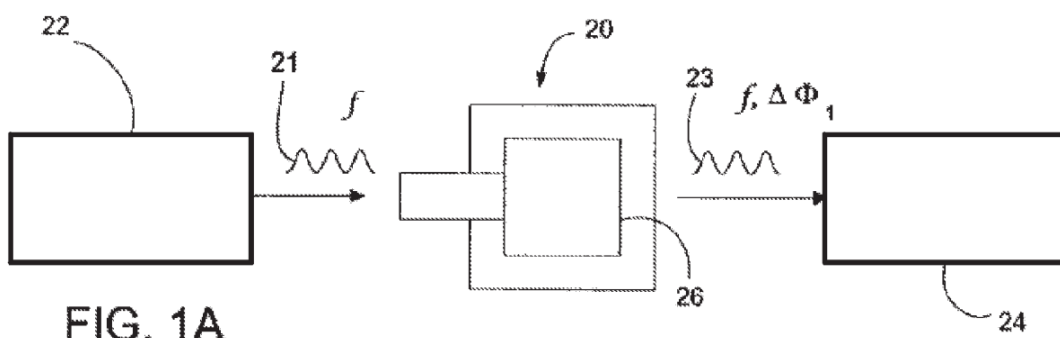


FIG. 1C

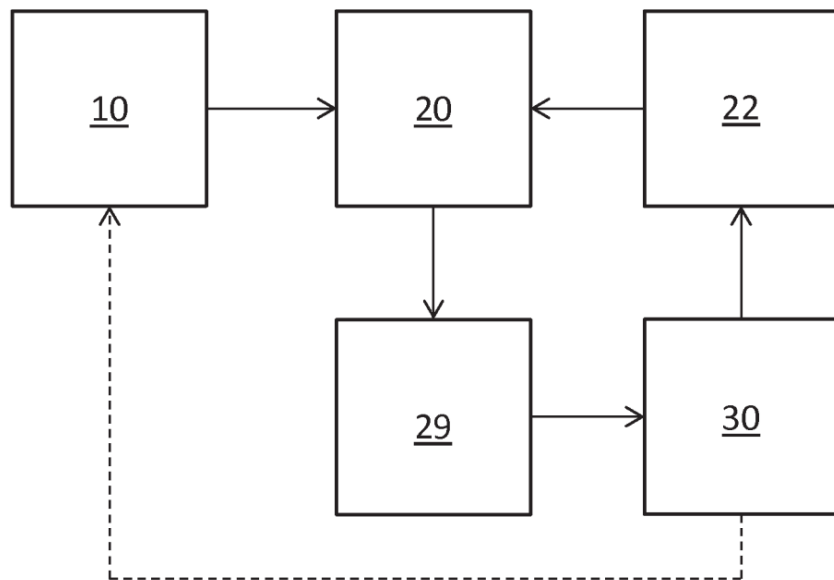


FIG. 2

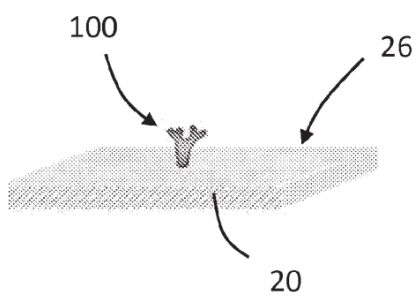


FIG. 3A

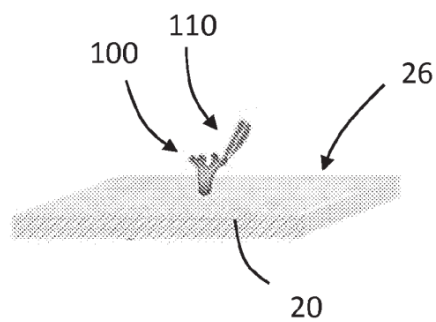


FIG. 3B

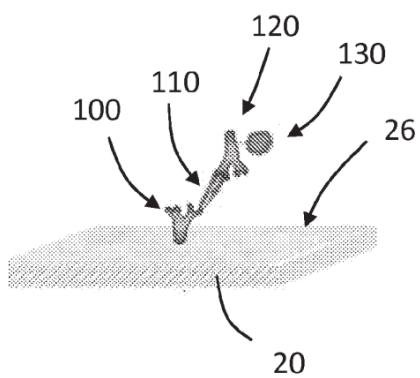


FIG. 3C

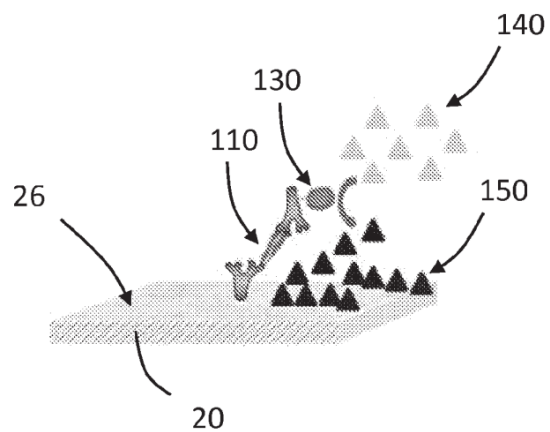


FIG. 3D

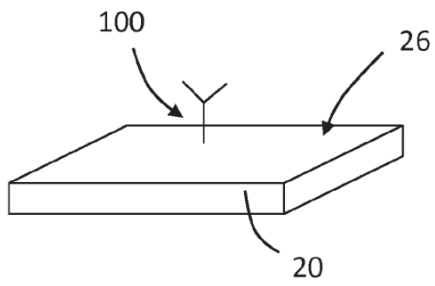


FIG. 4A

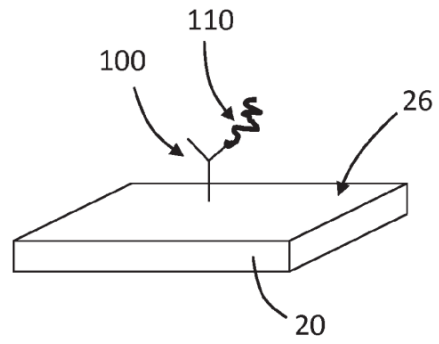


FIG. 4B

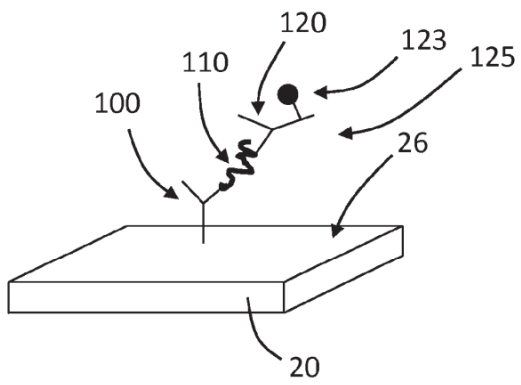


FIG. 4C

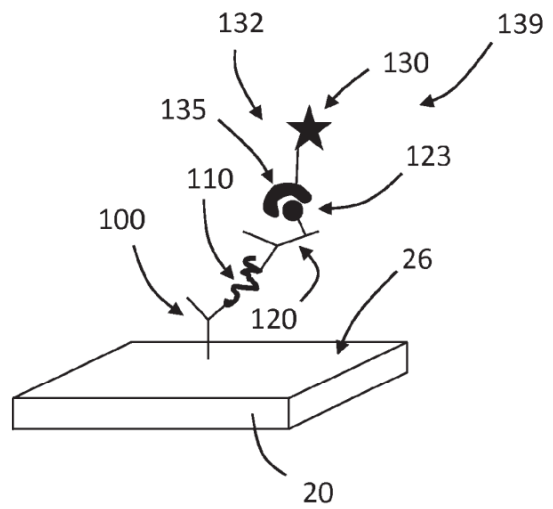


FIG. 4D

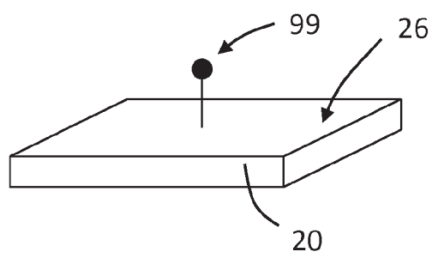


FIG. 5A

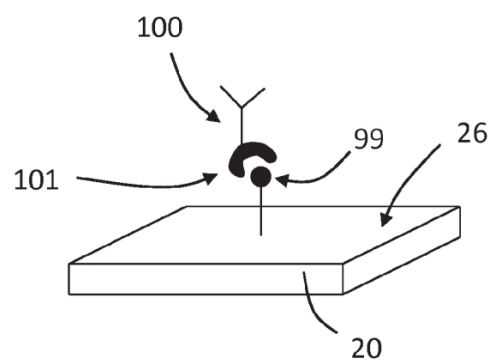


FIG. 5B

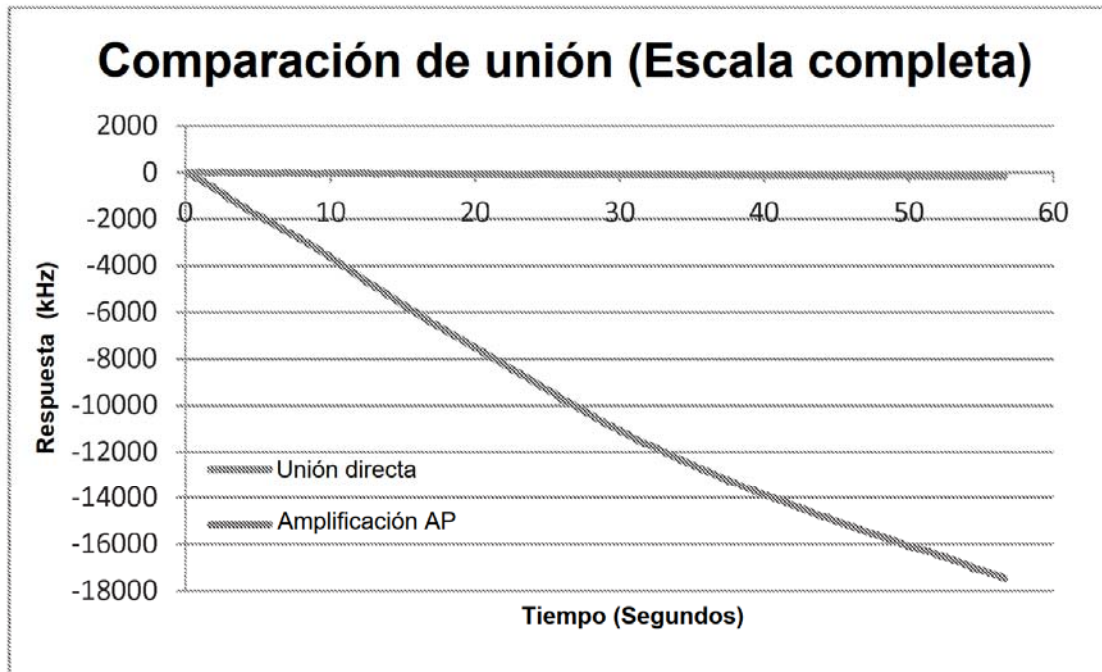


FIG. 6A

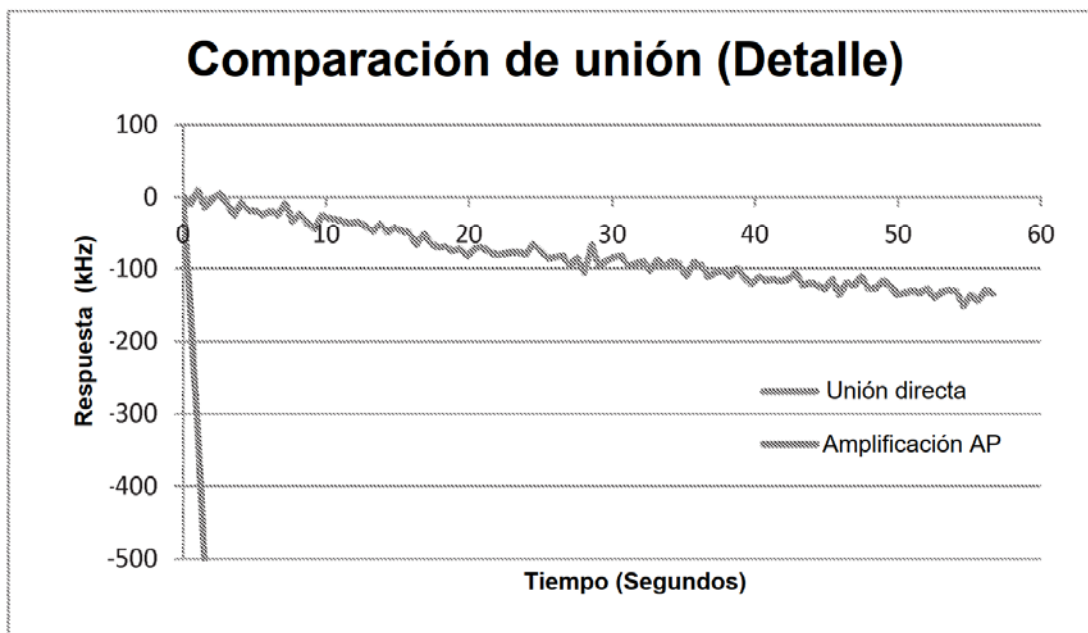


FIG. 6B

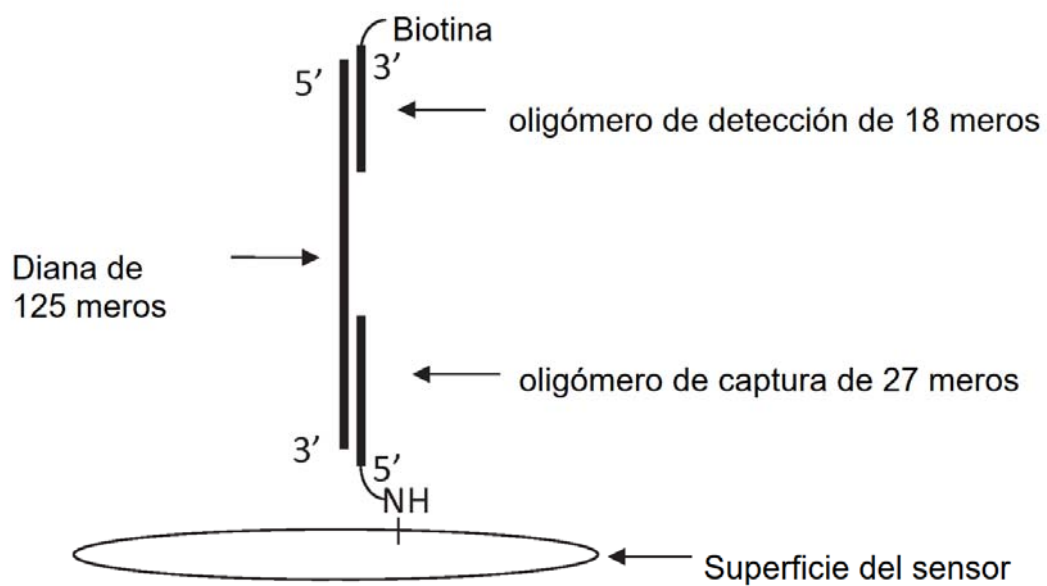


FIG. 7