

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

(21) **PI0711348-0 A2**

(22) Data de Depósito: 24/04/2007
(43) Data da Publicação: 30/08/2011
(RPI 2121)



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

(54) Título: **MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE PELO MENOS UM TIPO DE ALVOS EM UM FLUIDO CONTENDO PELO MENOS UM TIPO DE MARCADORES MAGNÉTICOS POLARIZADOS OU POLIMERIZÁVEIS**

(30) Prioridade Unionista: 09/05/2006 EP 06113686.7

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

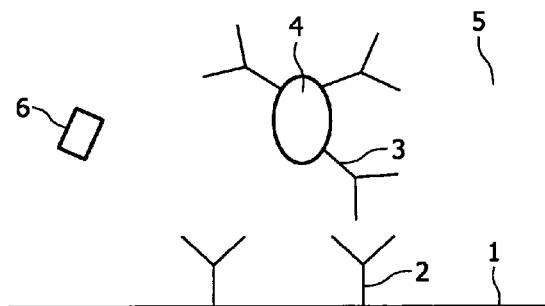
(72) Inventor(es): Albert H. J. Immink, Femke K. De Theije

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

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007051509 de 24/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/132367 de 22/11/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE PELO MENOS UM TIPO DE ALVOS EM UM FLUIDO CONTENDO PELO MENOS UM TIPO DE MARCADORES MAGNÉTICOS POLARIZADOS OU POLIMERIZÁVEIS. Um método é fornecido para determinar a concentração de alvo em uma amostra de fluido usando um marcador magnético e um sensor magnético para detecção. De modo surpreendente foi encontrado que medidas eficientes e precisas podem ser realizada através da determinação de um sinal assim que o sinal atinge um nível de limite especificado. Em uma modalidade alternativa, um estágio de deslocamento é usado assim que o sinal atinge um nível de limite pré-especificado.



“MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE PELO MENOS UM TIPO DE ALVOS EM UM FLUIDO CONTENDO PELO MENOS UM TIPO DE MARCADORES MAGNÉTICOS POLARIZADOS OU POLIMERIZÁVEIS”

5 A presente invenção se relaciona a um método para determinar a concentração de pelo menos um tipo de marcadores magnéticos polarizados ou polimerizáveis em um fluido usando o dispositivo de sensoreamento.

10 No campo do diagnóstico, especialmente em diagnóstico biomédico, tal como diagnóstico médico e de alimentação para ambas as aplicações em vivo e em vitro, mas também para diagnóstico de animal, diagnóstico sobre saúde e doença, ou para controle de qualidade, o uso de biossensores ou biochips é bem conhecido. Esses biossensores ou biochips são de forma geral, usados na forma de micro-matrizes de biochips possibilitando as análises de entidades biológicas tal como e. g. DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), proteínas ou pequenas moléculas, por exemplo, hormônios ou droga. Nos dias de hoje, existem muitos tipos de ensaios usados para analisar pequenas quantidades de entidades biológicas ou moléculas biológicas ou fragmentos de entidades biológicas, tais como ensaios de amarração, ensaios de competição, ensaios de deslocamento, ensaios de imprensar ou ensaios de difusão. O desafio em teste bioquímico é apresentado através da baixa concentração de moléculas alvo (e. g. pmol.l^{-1} e mais baixo) a serem detectadas em uma amostra de fluido com uma concentração alta de material de exame variado (e.g. mmol.l^{-1}). Os alvos podem ser entidades biológicas como peptídeos, metabólitos, hormônios, proteínas, ácidos nucleicos, esteróides, enzimas, antígenos, haptenos, drogas, componentes de célula, ou elementos de tecido. A matéria de exame ou matriz pode ser urina, sangue, soro, saliva ou outro líquido ou extrato derivado do ser humano ou derivado de não ser humanos. Marcadores presos aos alvos melhoram o limite de detecção de um alvo. Exemplos de

25

marcadores são marcadores ópticos, contas coloridas, grupos químicos fluorescentes, enzimas, barra de codificação óptica ou marcadores magnéticos.

5 Biossensores, de forma geral, empregam uma superfície de
sensoreamento 1 com sítios de ligação 2 específicos equipados com moléculas
de captura. Essas moléculas de captura podem especificamente ligar outras
moléculas ou complexos moleculares presentes no fluido. Outras moléculas
de captura 3 e marcadores 4 facilitam a detecção. Isto é ilustrado na Fig. 1,
que mostra uma superfície de sensoreamento de biossensor 1 à qual, as
10 moléculas de captura são acopladas, fornecendo sítios de ligação 2 para outras
entidades biológicas, e. g. as moléculas alvos 6 ou alvos 6. A solução 5
contém alvos 6 e marcadores 4 às quais ainda moléculas de captura 3 são
acopladas.

15 Alvos 6 e marcadores 4 são permitidas ligar aos sítios de
ligação 2 da superfície de sensoreamento de biossensor 1 em uma maneira
específica que é daqui em diante chamado “ especificamente anexada ”.

Nas Figuras, entidades biológicas biologicamente (e. g.
moléculas de captura 3 ou sítios de ligação 2) estão desenhadas como sendo
diretamente acopladas uma carregador sólido (e. g. superfície de
20 sensoreamento 1 ou marcador 4). Como é conhecido na técnica, tais camadas
ativas biologicamente, são de forma geral, ligadas a um carregador sólido
através de entidades intermediárias, e. g. uma camada de área de
armazenamento temporário ou moléculas de espaçamento. Tais entidades
intermediárias são adicionadas para alcançar uma densidade alta e atividade
25 biológica alta de moléculas na superfície. Para clareza e simplicidade, as
entidades intermediárias são omitidas nas Figuras.

Em contraste a esta ligação biológica à superfície de
sensoreamento 1, marcadores 4 podem também prender-se à superfície de
sensoreamento 1 em uma maneira não específica ou não biológica, i. e. ligar à

superfície 1 sem mediação das moléculas alvos específicas 6.

Em um biossensor magnético, a medida de uma concentração de contas especificamente ligadas à superfície pode ser perturbada através da presença de contas desligadas ou não especificamente ligadas. Por conseguinte, um ponto de dados confiável pode somente ser considerado quando contas desligadas ou não especificamente ligadas são removidas da superfície.

Ainda, ensaios biológicos, de forma geral, tomam um muito longo tempo para alcançar equilíbrio. Na prática, medidas tomam um muito longo tempo para alcançar equilíbrio. Na prática, medidas são feitas bem antes do equilíbrio ser alcançado.

Um método que é adequado para reduzir um tempo de medida é o assim chamado medida cinética. Este método depende da medida de um sinal como uma função do tempo. O método é especificado em mais detalhe na descrição detalhada desta aplicação.

Para ser capaz de fazer uma medida cinética que é específica somente para as contas especificamente ligadas, a seguinte seqüência é de forma geral, aplicada em uma maneira cíclica:

- puxar as contas em direção a superfície; lá, ligação pode ocorrer;
- então as contas precisam ser puxadas da superfície, para distinguir entre contas especificamente se ligando à superfície e contas desligadas ou de ligação não específica;
- após este estágio de deslocamento alguém pode medir o sinal efetivo.

No exame de ponto de necessidades, e.g., teste de beira de estrada através de janela para drogas de abuso na saliva, e. g., para segurança de tráfego, é essencial fornecer para equipamento de teste que é suficientemente robusto para ser usado em uma base de dia a dia e fornecer

para um método de teste conduzindo a resultados, que são suficientemente rápidos e precisos.

É um objeto da presente invenção para fornecer um método para análise de alvo que é rápida e precisa.

5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto da presente invenção, um método de sensoreamento é fornecido para determinar uma concentração de pelo menos um tipo de alvos (6) em um fluido (5) contendo pelo menos um tipo de marcadores polarizados ou polimerizáveis (4) usando um dispositivo de sensoreamento magnético compreendendo uma superfície de sensoreamento (1), o método compreendendo os estágios de:

- fornecer um fluido (5) compreendendo pelo menos um tipo de marcadores magnéticos (4) sobre a superfície de sensoreamento (1);
- puxar as marcadores magnéticos em direção a superfície;
- 15 - determinar o sinal que é gerado pelos marcadores, caracterizado no qual a determinação do sinal é iniciado assim que o sinal alcançou um nível limite predefinido.

Em um ainda aspecto, uma invenção se relaciona a um método que ainda compreende um estágio de deslocamento compreendendo remover marcadores da, ou movê-las para um lado da, superfície de sensoreamento, para distinguir entre contas especificamente se ligando à superfície e contas desligadas ou de ligação não específica, onde o estágio de deslocamento é realizado assim que o sinal alcança o nível limite predefinido.

25 No método reivindicado, a concentração de alvo é mais preferencialmente determinado pela combinação do sinal determinado com o tempo entre o início da incubação com marcador magnético e a determinação do sinal, ou o tempo entre o início da incubação com marcador magnético e o estágio de deslocamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção será descrita com respeito a particulares modalidades e com referência a certos desenhos, mas a invenção é não limitada neles mas somente através das reivindicações. Os desenhos descritos são somente esquemáticos e são não limitantes. Nos desenhos, o tamanho de algum dos elementos pode estar exagerados e não desenhados em escala para propósitos ilustrativos.

Onde um artigo indefinido ou definido é usado quando referindo a um substantivo singular, e. g. “ um ”, “ uma ”, “ o ”, “ a ”, isto inclui um plural daqueles substantivos ao menos alguma coisa a mais seja especificamente colocada.

Ainda mais, os termos primeiro, segundo, terceiro e o similar na descrição e nas reivindicações são usados para distinguir entre elementos similares e não necessariamente para descrever uma ordem seqüencial ou cronológica. É para ser entendido que os termos assim usados são intercambiáveis sob circunstâncias apropriadas e que as modalidades da invenção descrita aqui são capazes de operar em outras seqüências do que a descrita ou ilustrada aqui.

Mais ainda, os termos topo, fundo, sobre, sob e o similar na descrição e nas reivindicações são usados para propósitos descritivos e não necessariamente para descrever posições relativas. É para ser entendido que os termos assim usados são intercambiáveis sob circunstâncias apropriadas e que as modalidades da invenção descritas aqui são capazes de operar em outras orientações do que as descritas ou ilustradas aqui.

É para ser observado que o termo “ compreendendo ”, usados na presente descrição e reivindicações, não deve ser interpretado como sendo restritos aos significados listados daqui em diante; isto não exclui outros elementos ou estágios. Assim sendo, o escopo da expressão “ um dispositivo compreendendo significados A e B ” não deve ser limitado aos dispositivos

consistindo somente de componentes A e B. Isto significa que com respeito a uma presente invenção, o somente componentes relevantes do dispositivo são A e B.

No seguinte, uma presente invenção principalmente será descrita com referência aos marcadores magnéticos, também chamadas contas magnéticas ou contas. Os marcadores magnéticos não são necessariamente de forma esféricas, mas podem ser de qualquer forma adequada, e. g. na forma de esferas, cilindros ou bastões, cubos, de ovais, etc. ou podem não ter forma definida ou constante. Pelo termo “marcadores magnéticos” é significado que os marcadores incluem qualquer forma adequada de uma partícula magnética ou mais partículas magnéticas, e.g. magnética, diamagnética, paramagnética, super-paramagnética, ferro-magnético, isto é qualquer forma de magnetismo que gera um dipolo magnético em um campo magnético, ou permanentemente, ou permanentemente de temporariamente. Para efetuar a presente invenção, não há limitação da forma dos marcadores magnéticos, mas marcadores esféricos são presentemente mais fáceis e mais baratas de fabricar em uma maneira confiável. O tamanho dos marcadores magnéticos não é para o sinal só um fator limitante da presente invenção. Contudo, para detectar interações em um biossensor, marcadores magnéticos de pequeno tamanho serão vantajosas. Quando contas magnéticas de tamanhos micrômetros são usadas como marcadores magnéticos, elas limitam a escala para baixo porque cada marcador ocupa uma área de pelo menos, $1\ \mu\text{m}^2$. Ainda mais, marcadores magnéticos pequenos têm melhores propriedades de difusão e de forma geral, mostram uma tendência mais baixa para sedimentação do que contas magnéticas grandes. De acordo com a presente invenção, marcadores magnéticos são usados no intervalo de tamanho entre 1 e 3000 nm, mais preferencialmente entre 5 e 500 nm.

O método de acordo com a presente invenção é especificamente adequado para determinação de uma concentração de

entidades biológicas em um fluido.

Na presente descrição e reivindicações da invenção, o termo “entidades biológicas” deve ser interpretado amplamente. Isto inclui s moléculas ativas biologicamente tais como proteínas, peptídeos, RNA, DNA, lipídios, fosfolipídios, carboidratos como açúcares, ou o similar. O termo “entidades biológicas ” também inclui fragmentos de célula tal como porções de membranas de célula, particularmente porções de membranas de células que podem conter um receptor. O termo entidades biológicas também se relaciona à compostos pequenos que potencialmente podem se ligar à entidade biológica. Exemplos são hormônios, drogas, ligamentos, antagonistas, inibidores e moduladores. As entidades biológicas podem ser isoladas ou moléculas sintetizadas. Moléculas sintetizadas podem incluir compostos ocorrendo não naturalmente tal como aminoácidos ou nucleotídeos. As entidades biológicas podem também ocorrer em um meio ou fluido tal como sangue ou soro ou saliva ou outros fluidos ou secreções do corpo, ou extratos, ou amostras de tecidos ou amostras de culturas de células, ou qualquer outras amostras compreendendo entidades biológicas tal como amostras de comida, de alimentos, de água e etc.

A presente invenção fornece um método para determinar uma concentração de pelo menos um tipo de alvos, especialmente entidades biológicas, em uma amostra biológica complexa.

Nesta invenção, é particularmente preferida para determinar a concentração de marcadores através do cálculo da proporção entre a concentração de marcadores especificamente ligadas e a concentração de marcadores não ligadas, i. e. a proporção entre a taxa de ligação (representada pela concentração dos marcadores magnéticos na superfície de sensoreamento) e a taxa de exposição (representada pela concentração dos marcadores magnéticos no volume do liquido). A concentração de alvos de acordo com a invenção é proporcional ao parâmetro ϵ , que é um parâmetro

que representa a posse fracionária de porções de ligação, que estão presentes no marcador 4 ou na superfície de sensoreamento 1, dependendo do tipo de ensaio. Este parâmetro é relacionado à concentração de alvo no fluido, in a maneira que depende do ensaio.

5 Essas e outras características, recursos e vantagens da presente invenção se tornarão aparente da seguinte descrição detalhada, tomada em conjunto com os desenhos anexos, que ilustram, a título de exemplo, os princípios da invenção. A descrição é dada a título de exemplo somente, e é não para ser construída como limitando o escopo da invenção. Os números de
10 referência cotados abaixo se referem aos desenhos anexados.

Fig. 1 ilustra um biossensor ao qual as primeiras moléculas de captura são acopladas em uma solução compreendendo alvos e marcadores para as quais segundas moléculas de captura são acopladas.

15 Figs. 2a, 2b, 2c, 3.1a, 3.1b, 3.2a, 3.2b, 3.2c, 3.3 ilustram alguns exemplos de possíveis configurações de ligação de marcadores 4 para uma superfície de sensoreamento do biossensor.

Figura 4 mostra um gráfico do número de contas versus o sinal.

20 Figura 5 desenha o sinal de um sensor que é sensetivo para os marcadores ligados à superfície e, para uma certa extensão, para contas desligadas na vizinhança da superfície de sensoreamento. O sinal é desenhado como uma função do tempo, e é descrita como a inclinação da curva de ligação da superfície pode ser derivada.

25 Figura 6 é um esboço de uma sessão transversal do sensor com um marcador magnético na superfície de chip.

Em ensaios biológicos é comum a prática para de modo cuidadoso sintonizar a quantidade de compostos marcados (e. g. anti-corpos) que necessitam ser adicionados ao meio do ensaio. Um excesso de marcadores conduziria a um ensaio não sensetivo, porque muitas marcadores

ligam-se à superfície de sensoreamento em uma maneira não específica. A escassez de marcadores conduziria para uma proporção sinal para ruído diminuída. Em muitos ensaios, o ensaio é executado para conclusão e o sinal final é medido após conclusão.

5 De forma surpreendente foi encontrado que para obter um ensaio reproduzível, o tempo de início para a medida do sinal específico que é gerado por marcadores magnéticos especificamente ligadas, e o tempo de início para lavagem magnética (um estágio de deslocamento), não é determinada pelo tempo de medida mas comparando o nível de sinal da curva
10 de sedimentação com um nível de limite fixo, pré-determinado para o sinal. Isto significa que no método de acordo com a invenção, a medida do sinal e o tempo de início de um estágio de deslocamento opcional são determinados pelo sinal atingindo um nível de limite predefinido. Este nível de limite representa um número mínimo de contas magnéticas sendo especificamente
15 ligadas à superfície do sensor. Em combinação com uma medida cinética, isto fornece pontos de medida precisa em um quadro de tempo relativamente curto.

Por conseguinte, em um primeiro aspecto, a invenção se relaciona a um método para determinar a concentração de pelo menos um tipo
20 de alvos (6) em um fluido (5) contendo pelo menos um tipo de marcadores magnéticos polarizados ou polimerizáveis (4) usando um dispositivo de sensoreamento magnético compreendendo uma superfície de sensoreamento (1), o método compreendendo os estágios de:

- fornecer um fluido (5) compreendendo pelo menos um tipo
25 de marcadores magnéticos (4) sobre uma superfície de sensoreamento (1);
 - puxar as marcadores magnéticos em direção à superfície;
 - determinar o sinal que é gerado pelos marcadores,
- onde a determinação do sinal é iniciada assim que o sinal alcança um nível de limite predefinido.

Este nível de limite predefinido pode ser determinado individualmente para cada configuração do sensor magnético.

O método de acordo com a invenção oferece as seguintes vantagens.

5 Primeiramente, o ensaio se torna menos sensível ao número de contas de captura em termos de sinal para ruído térmico e sinal para ruído estatístico. Em segundo lugar, o ensaio pode ser realizado em um quadro de tempo curto, otimizado porque o somente tempo de espera é o tempo necessário para preencher os requisitos de precisão do teste. Em terceiro
10 lugar, o espalhamento da susceptibilidade magnética/tamanho se torna menos importante. A presença de algumas contas grandes ou contas com alta susceptibilidade magnética é ponderada sobre um número de contas razoavelmente bem definido. Isto é importante porque preparações de contas magnéticas disponíveis comercialmente podem mostrar um espalhamento
15 significativo no tamanho e na susceptibilidade magnética.

Com explicado acima, biossensores magnéticos são de forma geral, feitos para serem tanto sensíveis quanto possível para contas especificamente ligadas à superfície do sensor. Contudo, a medida de uma concentração de contas (ou marcadores) especificamente ligadas à uma
20 superfície pode ser perturbada pela presença de contas (ou marcadores) desligadas ou não especificamente ligadas. Por conseguinte, um ponto de dados confiável para medir uma concentração de alvo através de uma concentração de alvo é preferencialmente tomado quando contas desligadas e/ou não especificamente ligadas. Tal remoção de contas não especificamente
25 ligadas de uma superfície é, por exemplo, feita em um estágio de deslocamento que é também referido como estágio de lavagem. Em sensores magnéticos, tal um estágio de lavagem é frequentemente realizada como lavagem magnética. Na lavagem magnética um campo magnético é usado para gentilmente puxar as contas não especificamente ligadas da superfície do

sensor. A força aplicada é suficientemente forte para remover as contas não especificamente ligadas e, suficientemente fraca para manter as contas especificamente ligadas no lugar.

5 Por conseguinte, a seguinte sequência ou ciclo é preferencialmente aplicado, ou uma vez ou de maneira repetida:

- as contas são puxadas em direção à superfície; por meio disso, ligação pode acontecer;

10 - então as contas podem ser movidas da, ou para um lado, da superfície do sensor, para distinguir entre contas especificamente se ligando à superfície e contas desligadas ou não especificamente ligadas;

- após este estágio de deslocamento alguém pode medir o sinal efetivo das contas especificamente ligadas.

15 Então, em um aspecto preferido, a invenção se relaciona a um método que ainda compreende um estágio de deslocamento compreendendo remover os marcadores da, ou movê-las para um lado da, superfície do sensor para distinguir entre contas especificamente se ligando à superfície e contas desligadas ou não especificamente ligadas, onde o estágio de deslocamento é realizado assim que o sinal alcança um nível de limite predefinido.

20 O nível de limite predefinido, preferido para medir o sinal e para começara a lavagem magnética opcional é o sinal que é gerado por Nb contas magnéticas especificamente presas à superfície do sensor, as quais contas, são aplicadas como marcadores neste método.

25 Esperar para o sinal atingir um nível de limite predefinido garante um número mínimo de contas magnéticas no sensor. Isto garante uma proporção mínima de sinal para ruído para ambas o sinal para ruído térmico e o sinal para ruído estatístico. O ruído estatístico é devido ao processo de chegada aleatório das contas na superfície. Um histograma do número de contas na superfície após um tempo fixo para um grande número de testes nas mesmas condições (conjunto) vai levar a uma distribuição de Poisson. Isto

significa que a variância no número de contas depende do número médio de contas capturadas N_b . Esta variância é igual à raiz quadrada (N_b) levando a uma proporção de sinal para ruído estatístico de $N_b/\text{raiz quadrada } (N_b)$. Para uma variação de 3%, N_b necessita ser pelo menos, 1.000 porque $1.000/\text{raiz quadrada } (1.000) = 1.000/32=32$. Agora se pode calcular ou medir o nível de sinal correspondendo à 1.000 contas. Isto foi feito para contas de 300 e 1000 nm (ver Figura 4). A partir deste gráfico se pode ver que 100 contas dá 0,5 microV (para 300 nm contas), i. e. 1.000 contas daria 5 microV. O sensor que foi usado para obter este gráfico é especificado abaixo.

O ruído térmico é dado pela resistência do sensor (em um exemplo específico de 500 Ohm nominalmente) se o eletrônico é projetado apropriadamente. A voltagem raiz quadrada média (rms) do ruído térmico é então igual à $U_n = \text{raiz quadrada } (4kTR \cdot BW)$, onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, R é a resistência do sensor e BW é a largura de banda de uma medida (i. e. a largura de banda dos eletrônicos). Isto significa que a voltagem rms do ruído térmico é 2,8 nV/raiz quadrada (Hz). Isto significa que em situações com uma largura de banda limitada (na maioria dos casos suficiente para medidas biológicas) o ruído estatístico é dominante. Em um sistema preferido, N_b é escolhido maior do que 1000 para alcançar uma variação, devido a uma variação estatística no número de contas especificamente ligadas, menor do que 3%. Note que o tempo para o ensaio nesta modalidade preferida agora varia dependendo da concentração de alvo. A concentração de alvo pode ser extraída do sinal medido e do tempo necessário entre o início da incubação com marcador magnético e medir o sinal, ou alternativamente a partir do sinal medido e do tempo necessário entre o início da incubação com marcador magnético e o estágio de deslocamento.

O método de acordo com a invenção é preferencialmente combinado com uma medida cinética da concentração de alvo. A medida

cinética é descrita abaixo.

Figura 5 desenha o sinal de um sensor que é sensitivo aos marcadores ligados à superfície e, a uma certa extensão, para contas desligadas na vizinhança do superfície do sensor. O sinal é desenhado como uma função do tempo, e é descrito como a inclinação da curva de ligação da superfície pode ser derivada. No contexto da presente invenção, o sinal sensitivo à superfície é também chamado de sinal bruto do sinal do sensor dependente do alvo S. A seqüência ou ciclo mencionado acima é usado para determinar a inclinação do sinal sensitivo da superfície representado pela linha pontilhada. O sinal representado pela linha pontilhadas é idêntico ao sinal do sensor dependente do alvo. Por conseguinte, a inclinação medida deste sinal conduz a uma determinação da concentração de alvo na amostra de fluido. A seqüência ou ciclo mencionado acima é também representado na Fig. 5, onde o símbolo de referência 210 denota o estágio de permitir marcadores próximos a uma superfície ou puxar marcadores para a superfície, e onde o símbolo de referência 220 denota o estágio de remover marcadores ou puxar marcadores da superfície.

O sinal durante o estágio denotado pelo símbolo de referência 210 é causado por contas se ligando à superfície do sensor assim como por contas desligadas na vizinhança da superfície do sensor. Usando os sinais durante os estágios denotados pelos símbolos de referência 210 e 220, o sinal ligado à superfície assim como o sinal devido às contas desligadas pode ser derivada. Como um resultado, a concentração de marcadores na solução assim como a concentração de marcadores ligadas à superfície do sensor pode ser derivada. De acordo com a presente invenção, essas duas medidas levam a uma determinação bem precisa da concentração de alvo no fluido.

Nesta modalidade preferida, a inclinação da curve é proporcional à taxa de ligação de marcadores para a superfície do sensor. A inclinação média dS/dt do sinal durante um tempo de medida t_m é dado pelo

5 sinal S (no final de t_m) dividido por uma tempo de medida t_m . A
concentração de alvo é relacionada à taxa de ligação, em uma maneira que
depende do ensaio. A concentração de alvo pode ser determinada bem
precisamente quando o sinal é gravado com uma proporção alta de sinal para
10 ruído. No caso de detecção através de um biossensor resistivo à magneto, um
proporção alta de sinal para ruído pode ser alcançada através do uso de altas
correntes. Altas correntes podem causar aquecimento ou mudanças
irreversíveis de materiais biológicos. Contudo, quando sinais são medidos nos
pontos finais do ensaio, aquecimento e mudanças dos materiais biológicos
15 não são importantes. Em outras palavras, sinais dos pontos finais (i.e.
especificamente marcadores ligados e/ou marcadores desligados na solução
na vizinhança dos sítios de ligação) podem ser medidos com uma proporção
bem alta de sinal para ruído, que aprimora a precisão da determinação da
concentração de alvo. Será apreciado que isto requer que bastantes contas se
20 liguem especificamente à superfície do sensor dentro do tempo configurado
para a incubação.

Em geral, um dispositivo de sensoreamento será sensetivo aos
marcadores especificamente presos a uma superfície de sensoreamento (Tipo
1 de ligação, cf. acima) assim como para marcadores que não são
25 especificamente presas mas ainda na vizinhança da superfície de
sensoreamento. Esta segunda alternativa pode ser realizada por marcador se
ligando à superfície de sensoreamento na maneira de Tipo 2 ou por
marcadores não presas à superfície de superfície de sensoreamento, mas
localizadas na vizinhança da superfície.

25 De acordo com a presente invenção, essas concentrações de
marcador diferentes são ou medidas independentemente ou o sinal que é
medido é tão forte comparado com o sinal de volume que não há necessidade
de medir o sinal de volume. É a partir das capacidades da pessoa qualificada
para estimar uma proporção entre o sinal de contas especificamente ligadas e

o sinal de volume (por exemplo, efetuando vários experimentos em concentrações de alvo diferentes, conhecidas). A estimativa de uma proporção pode ser usada para gerar uma estimativa do número de contas especificamente ligadas (que permanecem após o deslocamento) de modo a
5 determinar o nível predefinido no qual o deslocamento deve acontecer para assegurar que pelo menos, Nb contas permaneçam na superfície do sensor após o estágio de deslocamento.

De acordo com uma modalidade da invenção, é, por exemplo, possível diferenciar os marcadores magnéticos especificamente presos de
10 outros marcadores através das diferenças em mobilidade rotacional e/ou translacional de marcadores especificamente presos versus marcadores não especificamente presos e marcadores que não são presos, por exemplo, é possível aplicar campos magnéticos e determinar sinais dependentes da mobilidade. Tais campos magnéticos também pode ser modulados, e. g.
15 através de fios de corrente ou magnetos, para atrair marcadores magnéticos para a superfície de sensoreamento, ou para repelir marcadores magnéticos da superfície de sensoreamento, ou para mover marcadores magnéticos sobre a superfície de sensoreamento. Uma comparação do sinal do elemento do sensor magnético para as diferentes posições dos marcadores magnéticos
20 permite a determinação do número de marcadores magnéticos de comunicação móvel na vizinhança da superfície de sensoreamento, marcadores magnéticos de comunicação móvel mencionadas estando presente na solução a ser medida.

Em ainda uma modalidade preferida da presente invenção, o
25 meio de geração de campo magnético é uma estrutura de fio em duas dimensões localizada dispositivo de sensoreamento.

Conforme descrito previamente, um dispositivo de sensoreamento será sensível aos marcadores especificamente presos a uma superfície de sensoreamento (Tipo 1 de ligação) assim como para marcadores

que não são especificamente presas, mas ainda na vizinhança da superfície, e. g. Tipo 2 de marcador de ligação ou marcadores não presos à superfície de sensoramento, mas na vizinhança da superfície de sensoramento. De acordo com a presente invenção, essas concentrações de marcadores magnéticos diferentes são preferencialmente medidas independentemente.

Para todas as modalidades do dispositivo de sensoramento, O elemento de sensor magnético pode ser um elemento sensor de um AMR (Magneto Resistivo Anômalo), de um GMR (Magneto Resistivo Gigante) ou de um TMR (com base em outros princípios como elementos sensores de Hall ou de SQUIDs (Dispositivo de Interferência de Quantum Supercondutor) são também adequados para uso de acordo com a presente invenção.

O dispositivo pode ser equipado para um intervalo de formatos de ensaio diferente, e. g. ensaios de competição, de inibição, de deslocamento, de imprimir. Como é conhecido na técnica, as espécies bioquímicas e químicas (e.g. alvos, moléculas como alvo, rótulos, sítios de ligação) podem ser trazidos junto de uma vez ou seqüencialmente. Para velocidade aprimorada, é vantajoso trazer os reagentes juntos de uma vez. No último caso, a cinética dos processos e a seqüência factual dos processos de ligação dependem e. g. da difusão e velocidades de ligação.

Note que o substrato do sensor ou chip pode ser qualquer adequado transportador mecânico, de material orgânico ou inorgânico, e. g. vidro, plástico, silicone, ou uma combinação deles. Em uma modalidade preferida do dispositivo de sensoramento 10, um circuito eletrônico 30 é fornecido no substrato 20. O circuito eletrônico 30 é fornecido para coletar sinais ou dados coletados ou medidos através de um elemento do sensor magnético 11 localizado no substrato 20. Em uma modalidade alternativa da presente invenção, o circuito eletrônico 30 também pode ser localizado fora do substrato 20.

Os meios de geração de campo magnético 13 podem, por

exemplo, ser materiais magnéticos (girando ou não girando) e/ou condutores tal como, e. g., fios de corrente 13. Na modalidade descrita, o meio de geração de campo magnético 13 é preferencialmente gerado por meio de fios de corrente. A detecção de movimento rotacional e/ou translacional de marcadores 4 pode preferencialmente ser efetuada de forma magnética. Na primeira assim como nas seguintes modalidades da presente invenção, a detecção magnética pode preferencialmente ser efetuada usando o elemento magnético de sensor integrado 11. Vários tipos de elementos de sensor 11 podem ser usados tal como, e. g., um sensor de Hall, impedância de magneto, SQUID, ou qualquer sensor magnético adequado. O elemento magnético do sensor 11 é preferencialmente fornecido como um elemento magneto resistivo, por exemplo, um elemento sensor de GMR ou de TMR ou de AMR 11. Um meio para gerar um campo magnético para gerar um campo magnético rotacional pode ser fornecido por meio de fios de corrente assim como meios de geração de corrente integrados no substrato 20 do dispositivo de sensoreamento 10. O elemento do sensor magnético 11 pode ter, e. g., uma geometria em tira alongada (longa e estreita). O campo magnético rotacional está assim sendo aplicado para os marcadores magnéticos 4 por meio de corrente fluindo nos fios de corrente integrados. Preferencialmente, os fios de corrente podem ser posicionados de tal maneira que eles gerem campos magnéticos no volume onde marcadores magnéticos 4 estão presentes.

Em uma modalidade preferida, um seguinte sensor é aplicado. Isto é o sensor que foi usado para obter os dados da Figura 4.

Um esboço de uma seção transversal de um sensor com um marcador magnético na superfície do chip superfície é apresentado na figura 6. Uma corrente de excitação que flui através dos condutores integrados produz o campo de excitação. O campo desgarrado de um marcador que é magnetizado pelo campo de excitação resulta em uma variação de resistência do sensor de GMR.

A plataforma de detecção tipicamente fornece uma corrente senoidal de percepção de 1,1 mARMS (I_s) com uma frequência (f_s) de 1 MHz para o GMR e uma corrente senoidal de excitação de 25 mARMS (I_E) com a frequência (f_E) de 1,05 MHz para ambos os fios de excitação do sensor.

5 Isto resulta em um sinal de diferença em 50 kHz, denotado como o sinal magnético. As frequências das correntes de percepção e de excitação são escolhidas tais que a frequência do sinal magnético (f_m) é tão baixa quanto possível para facilitar amplificação. Contudo, para manter SNR ótima, a frequência do sinal magnético deve estar fora do intervalo onde o $1/f$ ruído gerado pelo amplificador gerado (A) é dominante sobre o ruído térmico. Note que o $1/f$ ruído do GMR, que é sobreposto na resistência do sensor, se deslocou no espectro e está presente em torno das frequências de corrente de percepção (f_s). Um filtro passa baixo (LPF1) é empregado para suprimir o sinal grande de percepção e interferência (atfe), por meio disso, 10 reduzindo o intervalo dinâmico do sinal detectado. O sinal magnético de 50 kHz é de forma subsequente amplificado por um amplificador de baixo ruído e demodulado por um sinal de referência de 50 kHz (V_{ref}) para obter um sinal de banda base do qual a largura de banda é determinada pela velocidade do ensaio biológico. Como o processo de contagem se ligando à superfície do sensor 15 é relativamente baixo, a largura de banda do sinal de banda base é tipicamente somente de uns poucos Hz. Um segundo filtro passa baixo (LPF2) suprime o ruído fora da banda. O sinal é convertido para o domínio digital e comunicado a um PC para avaliação adicional.

25 Contas disponíveis comercialmente foram usadas, a saber, partículas de Ademtech com um diâmetro de 300 nm e uma susceptibilidade de $4 \times 10^{-20} \text{ m}^3$.

Nesta invenção, ênfase foi colocada na aplicação da invenção em ensaios imunes. Será claro para uma pessoa qualificada na técnica que também ensaios com outros alvos e outras entidades de ligação podem ser

usadas, e. g. ensaios com ácidos nucleicos e entidades hibridizadas.

Nota-se que a invenção acima pode ser combinada com sensor multiplexação de sensor e/ou multiplexação de marcador. Na multiplexação de sensor, sensores são usados com diferentes tipos de sítios de ligação 2.

- 5 Também as moléculas de captura 3 sobre os marcadores 4 podem ser de diferentes tipos. Na multiplexação de marcador, diferentes tipos de marcadores 4 são usados, e.g., marcadores com diferentes tamanhos ou diferentes propriedades magnéticas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a concentração de pelo menos um tipo de alvos (6) em um fluido (5) contendo pelo menos um tipo de marcadores magnéticos polarizados ou polimerizáveis (4) usando um dispositivo de sensoriamento magnético compreendendo uma superfície de sensoriamento (1), compreendendo os estágios de:

- fornecer um fluido (5) compreendendo pelo menos um tipo de marcadores magnéticos (4) sobre a superfície de sensoriamento (1);

- puxar os marcadores magnéticos em direção à superfície;

- determinar o sinal que é gerado pelos marcadores, caracterizado pelo fato que a determinação do sinal é iniciada assim que o sinal alcança um nível de limite predefinido.

2. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o compreende adicionalmente um estágio de deslocamento compreendendo remover os marcadores de, ou movê-las para, um lado, superfície do sensor, para distinguir entre contas especificamente se ligando à superfície e contas desligadas ou de ligação não específica, o estágio de deslocamento sendo realizado assim que o sinal alcança um nível de limite predefinido.

3. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de alvo é determinado pelo menos, em parte através do tempo entre o início da incubação com marcadores magnéticos e o momento de atingir o nível de limite predefinido ou o estágio de deslocamento.

4. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o nível de limite predefinido é o sinal que é gerado por contas magnéticas de Nb especificamente presas à superfície do sensor, cujas contas são aplicadas como marcadores neste método, e Nb é escolhido de acordo com $Nb/\text{raiz quadrada}(Nb)$ de tal maneira que a variação esperada seja menor

do que a variação requerida especificada no resultado do método quando efetuado com iguais concentrações de alvo.

5 5. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o nível de limite predefinido é o sinal que é gerado para um valor de Nb de pelo menos, 1000, contas magnéticas presas especificamente a superfície do sensor.

10 6. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de alvos (6) é determinada através do cálculo da proporção entre a concentração de especificamente marcadores presos (4) e a concentração de marcadores não presos (4).

7. Método de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser combinado com determinação cinética da concentração de alvo.

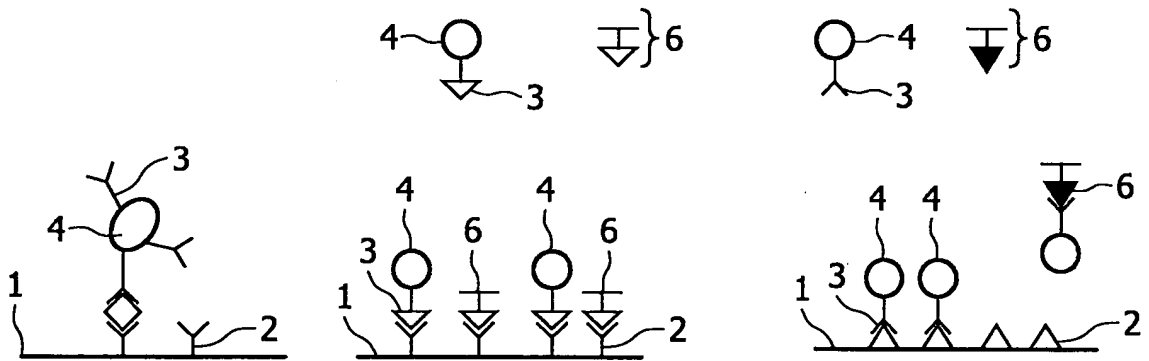
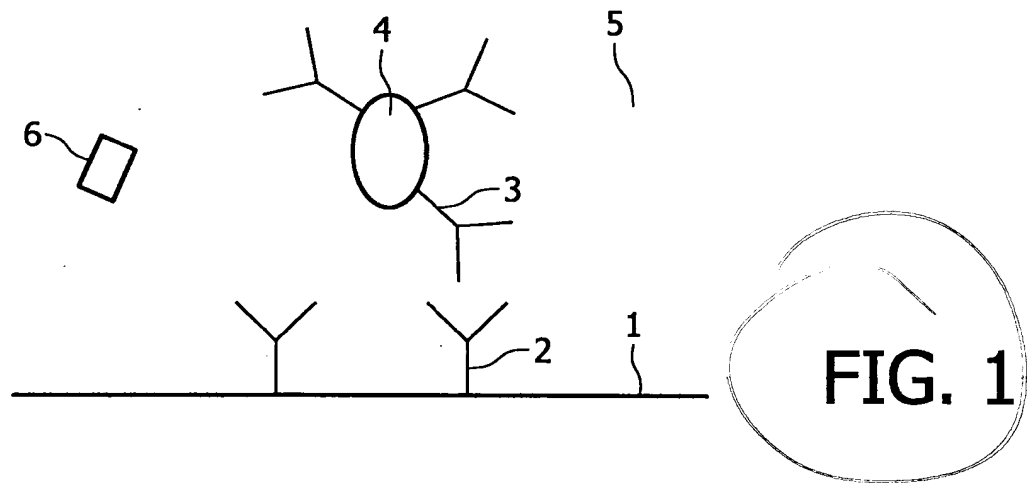


FIG. 2a

FIG. 2b

FIG. 2c

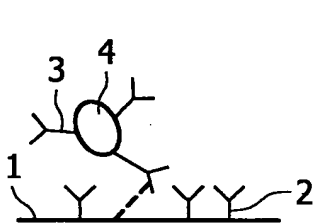


FIG. 3.1a

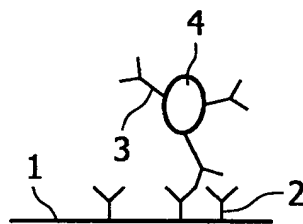


FIG. 3.1b

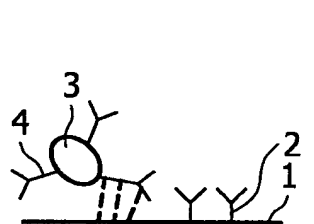


FIG. 3.2a

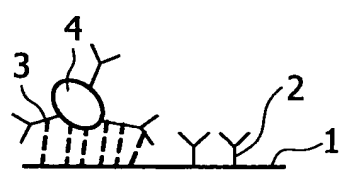


FIG. 3.2b

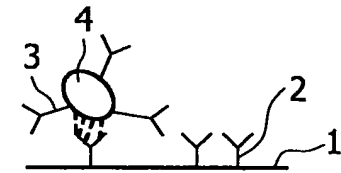


FIG. 3.2c

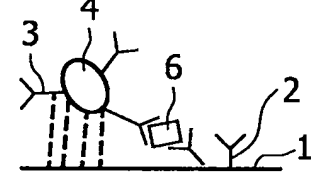


FIG. 3.3

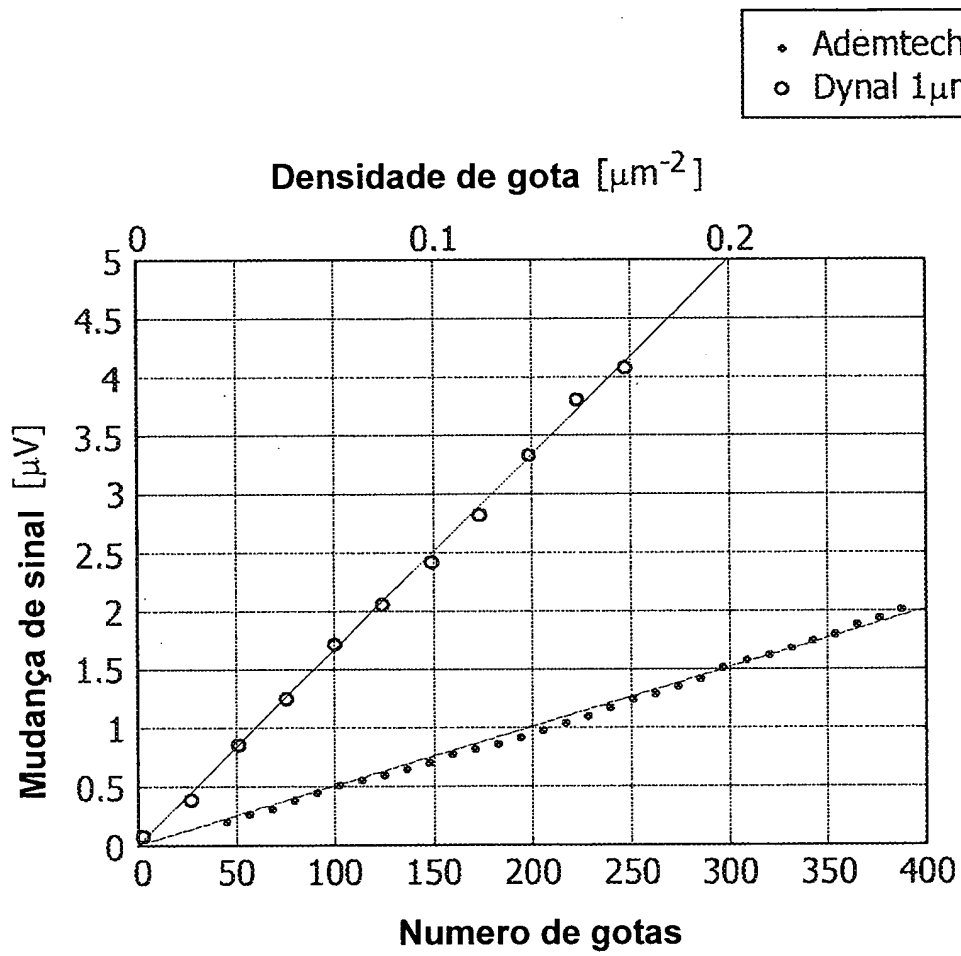


FIG. 4

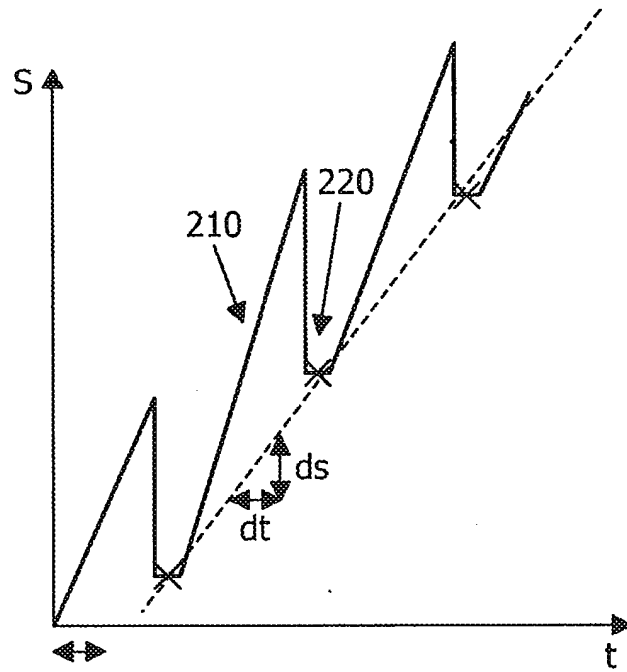


FIG. 5

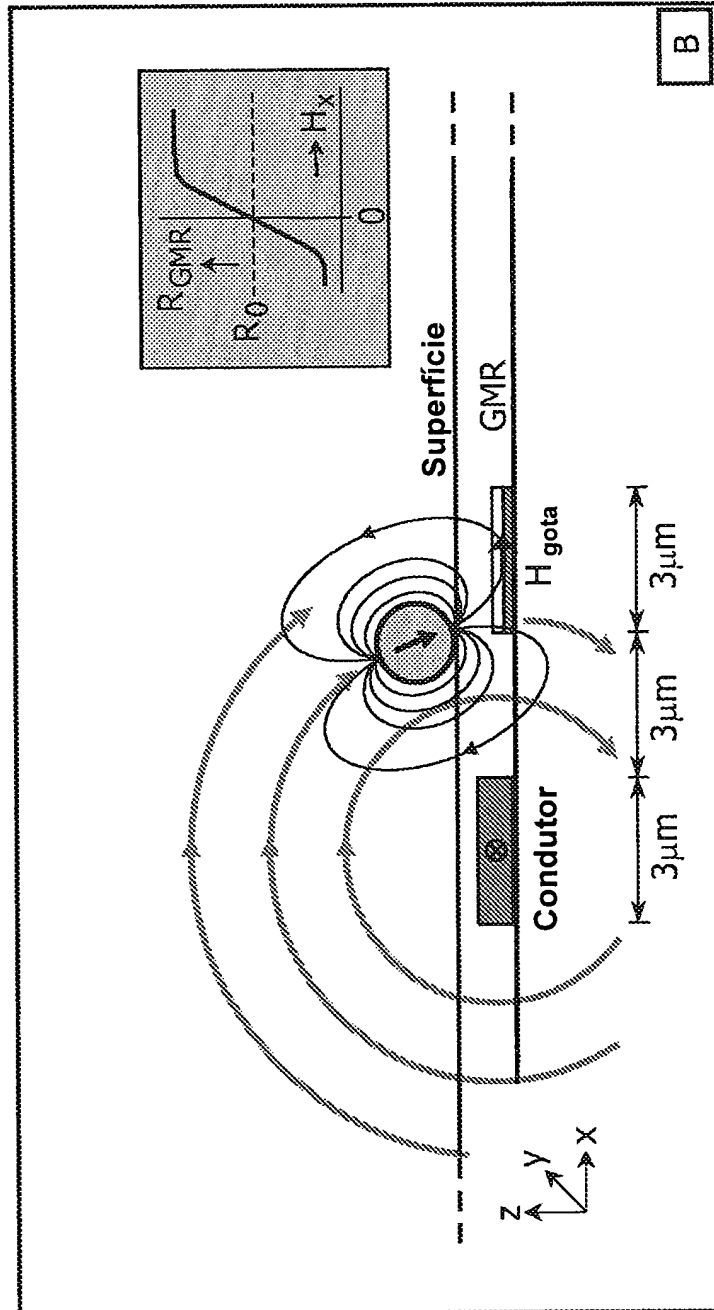


FIG. 6

RESUMO

5 “MÉTODO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE PELO
MENOS UM TIPO DE ALVOS EM UM FLUIDO CONTENDO PELO
MENOS UM TIPO DE MARCADORES MAGNÉTICOS POLARIZADOS
OU POLIMERIZÁVEIS”

10 Um método é fornecido para determinar a concentração de
alvo em uma amostra de fluido usando um marcador magnético e um sensor
magnético para detecção. De modo surpreendente foi encontrado que medidas
eficientes e precisas podem ser realizada através da determinação de um sinal
assim que o sinal atinge um nível de limite especificado. Em uma modalidade
alternativa, um estágio de deslocamento é usado assim que o sinal atinge um
nível de limite pré-especificado.