

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 628**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12716547 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2691771**

54 Título: **Electrodos de medición y referencia recubiertos de aptámeros y métodos que los utilizan para la detección de biomarcadores**

30 Prioridad:

31.03.2011 GB 201105481

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

05.01.2016

73 Titular/es:

**SAPIENT SENSORS LIMITED (100.0%)
7 Copeland Court
Nevilles Cross, Durham DH1 4LF, GB**

72 Inventor/es:

**CASH, STEPHEN LEE;
ROBSON, KEITH;
KINLOCH, IAN ANTHONY y
STOCKLEY, PETER GEORGE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 555 628 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

Electrodos de medición y referencia recubiertos de aptámeros y métodos que los utilizan para la detección de biomarcadores.

Introducción

5 Esta invención se relaciona con la detección de analitos químicos, orgánicos y biológicos. Más específicamente, la invención se relaciona con la detección de biomarcadores y se relaciona con un dispositivo para detectar de forma fiable la presencia de bajas concentraciones de biomarcadores moleculares en muestras de fluido.

10 Un prometedor campo de aplicación para tal detección es en la identificación de enfermedades por medio de moléculas de Biomarcadores. Metodologías existentes para el diagnóstico de enfermedades crónicas (por ejemplo la tuberculosis) frecuentemente se basan en pruebas intrincadas de laboratorio en muestras de sangre, orina o tejido tomadas de un paciente. En el caso de ejemplo de la tuberculosis (TB), el uso de una prueba de "frotis esputo" es común, basándose en la identificación del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando un microscopio, o, alternativamente, una prueba de la tuberculina.

15 Se apreciará que no suele ser posible llevar a cabo este tipo de pruebas intrincadas en las proximidades del paciente, y por lo tanto se requiere una red de laboratorios, equipados con equipos de prueba costosos y personal altamente capacitado. Se requiere una compleja red logística para el transporte de muestras desde los centros de pruebas para pacientes hasta el lugar de la prueba, y suministrar los resultados a los pacientes después de un retraso.

20 Se sabe que las enfermedades crónicas como la tuberculosis son prevalentes en los países en desarrollo, donde son difíciles de proveer las condiciones descritas previamente para pruebas exitosas. Los equipos de prueba podrían ser demasiado costosos para que sea una red efectiva de laboratorios para el tamaño de la población o podría ser la falta de personal calificado para trabajar en los laboratorios. El transporte de las muestras entre los laboratorios y el punto de atención podría ser difícil, e incluso durante la entrega de un resultado de la prueba de vuelta al punto de atención, podría resultar difícil encontrar pacientes infectados después de intervalos de hasta 25 varias semanas, particularmente en una población transitoria.

30 El acceso insuficiente a las pruebas más avanzadas significa que los programas de detección de la tuberculosis en los países con enfermedades endémicas son dependientes de métodos anticuados e inexactos como la microscopía de frotis, cultivo sólido, radiografía de tórax y pruebas cutáneas. En el caso del legado de las pruebas de tuberculosis mencionadas anteriormente, se sabe que la prueba cutánea de la tuberculina tiene la desventaja de ser incapaz de distinguir entre las etapas latentes y activas de tuberculosis. La prueba de frotis de esputo solamente es exacta en la mitad medio a tres cuartos de los casos, lo que requiere un gran número de organismos en la muestra y un operador experto de microscopio capaz de distinguir entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias.

35 Los biomarcadores moleculares ofrecen un nuevo método atractivo de detección de la enfermedad, en comparación con las técnicas conocidas que involucran pruebas de laboratorio centralizado. El campo en rápido avance de la proteómica demuestra que muchas enfermedades se pueden diferenciar por las pruebas de la presencia de biomarcadores moleculares en fluidos corporales tales como plasma sanguíneo, orina o saliva.

40 Un biomarcador relevante para la detección de la tuberculosis es la neopterina, un producto catabólico sintetizado por los macrófagos (células blancas de la sangre) tras la estimulación por la molécula de señalización gamma-interferón. La presencia de neopterina es conocida para indicar una respuesta inmune inflamatoria, y una enfermedad que causa la producción de neopterina es la tuberculosis. Otros marcadores de activación de macrófagos son conocidos, tales como la procalcitonina, proteína C reactiva, molécula 1 de adhesión intercelular soluble, receptor del activador de plasminógeno uroquinasa soluble, y Monocito CD11c66.

45 Otro biomarcador relevante para la detección de la tuberculosis es la trombina, un factor de coagulación que actúa sobre el fibrinógeno para producir fibrina, una proteína fibrosa involucrada en la coagulación de la sangre, que también aparece en niveles aumentados en pacientes que sufren de tuberculosis. Se apreciará que existe un amplio y creciente rango de biomarcadores moleculares útiles para el diagnóstico de enfermedades, y que los dos biomarcadores mencionados anteriormente son ejemplos. Otros ejemplos son la Lisozima y la dinucleótido Nicotinamida adenina (NAD).

50 También se apreciará que la expresión de diferentes biomarcadores puede variar en función de la etapa de la enfermedad. Por ejemplo, los niveles de neopterina se incrementan en el diagnóstico con base en la extensión de la enfermedad, y disminuyen durante y después del tratamiento. Un incremento subsecuente en los niveles de neopterina está asociado con recaídas. Las mediciones longitudinales cuantitativas consistentes son, por lo tanto, de gran uso diagnóstico.

Otros biomarcadores pueden ser identificados en los marcadores microbianos en el esputo, marcadores microbianos en la orina función de células T específicas en tuberculosis, y otros marcadores de activación de macrófagos. Las indicaciones de riesgo de reactivación, y la erradicación de la infección latente de la tuberculosis, también se pueden predecir utilizando por ejemplo el interferón gamma, o neopterina. Los biomarcadores se pueden usar para juzgar la eficacia de la vacuna, por ejemplo monitorizando las células T polifuncionales.

La especificidad de la prueba incrementada y el valor predictivo se pueden lograr mediante la combinación de un conjunto de biomarcadores no específicos relacionados con la tuberculosis mediante la medición de múltiples parámetros resultantes de la proteómica (el estudio a gran escala de las proteínas), la metabolómica (el estudio de huellas químicas que los procesos celulares específicos dejan atrás) y transcriptómica (el estudio de los ARNm utilizado en la transcripción de genes).

Una forma de la identificación de biomarcadores es mediante el uso de moléculas similares al ADN, como se muestra por ejemplo en la WO 2007/001401 (Dupont/Boussard et al.), donde se utilizan oligonucleótidos sobre nanotubos de carbono. Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos (un polímero corto de ácidos nucleicos), ligandos o péptidos que se pueden aislar o creados usando por ejemplo el proceso SELEX contra objetivos tan diversos como pequeñas moléculas orgánicas, toxinas, proteínas bacterianas y virales, células infectadas por virus, células de cáncer y organismos patogénicos. Se han definido las formas, y sitios funcionales de enlace en sus respectivos objetivos con afinidades y especificidades que frecuentemente superan los de los reactivos de anticuerpos mucho más ampliamente desarrollados. Los aptámeros de ácido nucleico son fácilmente aislados por un proceso totalmente in vitro semiautomatizado, eliminando la necesidad de experimentos con animales. Además la caracterización les permite que se minimicen de tal manera que se pueden hacer en la escala de gramo por rutas sintéticas químicas. Se concatenan fácilmente con otras secuencias de ácidos nucleicos que permiten crear especies bifuncionales. La funcionalización química de los aptámeros para permitir inmovilización y detección directa también es trivial. Es posible sintetizar un aptámero funcionalizado para conjugar con uno de los biomarcadores que indican enfermedad mencionados anteriormente, tales como trombina o neopterina.

Con el fin de exponer los aptámeros a una solución que contenga posiblemente moléculas objetivo, necesitan estar enlazados a o "montados en" un sustrato adecuado. Para detectar un evento de enlazamiento, es ventajoso si el sustrato es conductor o semiconductor, y si tiene una gran área de superficie específica. Un sustrato prometedor es nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono son bien conocidos alótropos de carbono con una estructura cilíndrica. El aptámero puede estar unido a los nanotubos utilizando ya sea metodologías covalentes o no covalentes. Por ejemplo, es posible unir una estructura química en forma de "pie" hasta el extremo del biomarcador no específico de la molécula de aptámero usando un compuesto tal como antraceno, que luego hará contacto con la superficie de un nanotubo de carbono, recubriéndolo con una capa de aptámero de biomarcador específico. En particular, cuando los nanotubos de carbono tienen propiedades semiconductoras, cuando un nanotubo de carbono es recubierto con un aptámero y luego expuesto al analito al que el aptámero revestido se enlaza, será detectable por medios electrónicos el gran número de eventos de enlazamiento y el cambio en la conductividad del nanoalambre o nanotubo de carbono recubierto con aptámero, por ejemplo mediante la detección de un cambio en la conductividad, capacitancia, impedancia, o la inductancia, potencialmente bajo corriente alterna de alta frecuencia. Tales eventos de enlazamiento de aptámeros también pueden afectar la conductividad de los nanotubos metálicos.

Tales nanotubos de carbono recubiertos con aptámero tal como se describe en el párrafo anterior se pueden aplicar a través de la compuerta de un Transistor de Efecto de Campo, en efecto, que forma el canal. Un FET de nanotubo de carbono (CNT-FET) con la fuente, drenaje y contacto de compuerta posterior, con el dominio de canal hecho de cadenas de nanotubos de carbono recubiertos con aptámeros, se discute en la Patente de Estados Unidos N° 7.854.826 (So et al./ Korea Research Institute of Chemical Technology).

Aunque tales detectores son prometedores, son propensos a la variación en su precisión y sensibilidad. Esto es debido a la variación individual, la variación en la concentración de electrolitos, oscilación de temperatura, geometría y otros factores.

Se apreciará que las características químicas de los fluidos corporales que contienen biomarcadores de interés variarán; entre individuos diferentes, se encontraron diferentes concentraciones de electrolitos y otras moléculas tales como proteínas y enzimas en fluidos corporales. Sin un método de control para estos efectos espurios, que distinguen la presencia de biomarcadores es probable que sean poco fiables.

Es deseable aumentar la fiabilidad de los sensores de este tipo, y en particular proveer un detector biomarcador que pueda ser utilizado en el difícil contexto descrito previamente para proveer una detección rápida y fiable de la enfermedad de una manera no costosa, y de una manera que no requiera la presencia de personal de laboratorio experimentado.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención, se provee un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 1 y un método como se reivindica en la reivindicación 15.

La invención utiliza un sistema de referencia para reducir la probabilidad de eventos de detección falsa de biomarcadores. Las realizaciones de la invención usan una base o soporte conductor o semiconductor recubierto con aptámero, tal como un conjunto o depósito de nanotubos de carbono, o una estructura similar a una lámina tal como grafeno, o ADN semiconductor u otros "nanocables" para formar una estructura de sensor, y una segunda estructura de sensor que es esencialmente idéntica sino que es "cubierta", es decir, se le impide al aptámero el reconocimiento de las moléculas objetivo, por ejemplo, por estar prerecubierto con o conjugado o enlazado a las moléculas objetivo, o por estar conjugado con una cadena de ADN complementaria, o por ser una versión mutante que difiere en unas pocas bases. Ejemplos de conjugación pueden, entre otros, incluyen el uso de foto-entrecruzamiento estándar de la secuencia de aptámero a su objetivo, o la retención de un oligo complementario de protección en la cadena de aptámero; también se puede utilizar una variante de secuencia de aptámero que impide el enlazamiento. En presencia de moléculas objetivo o biomarcadores de diagnóstico que se enlazan al aptámero, los electrones se transfieren y se presenta un cambio en la conductividad del soporte. Se puede decir que la base semiconductor actúa como el canal de un Transistor de Efecto de Campo o del CNT-FET. Este cambio puede ser detectado por un circuito electrónico adecuado, que puede estar integrado en el dispositivo, conectado al sistema de electrodos. La lectura se toma luego comparando el sensor "en vivo" con el sensor preconjugado (referencia) del sensor. Puesto que los dos sensores de la pareja están en entornos moleculares idénticos, esto es, habitan el mismo espacio de medición, otras variaciones, por ejemplo, que resultan de electrolitos en las muestras de fluido se cancelan.

Los aptámeros son una opción preferida como una forma específica y razonablemente barata de detectar moléculas objetivo, pero se prevén otras moléculas o estructuras receptivas a biomarcadores, incluso anticuerpos o aptámeros de péptidos, por ejemplo, siempre que una señal eléctrica suficiente resulte del proceso de enlazamiento.

Frecuentemente se desea medir simultáneamente varios biomarcadores, puesto que tal conjunto de biomarcadores puede indicar con más precisión la presencia de una condición crónica tal como la tuberculosis; en algunas realizaciones, por lo tanto, el detector tiene varios de tales pares de sensores y puede ser fácilmente utilizado para detectar biomarcadores múltiples simultáneamente y de forma fiable.

Más específicamente, cada uno de los detectores receptivos a biomarcadores también se colocarán junto a, por ejemplo, un detector saturado de biomarcador. Tales detectores de referencia serán idénticos a los detectores de biomarcadores, con la importante diferencia de que los electrodos de referencia usarán aptámeros que ya se han enlazado a su objetivo, por ejemplo por foto-entrecruzamiento, el uso de una variante de secuencia no enlazante o por la retención de una cadena complementaria de base emparejada, de tal manera que estén "cubiertos" para asegurarse de que no reaccionan durante una prueba de diagnóstico. Es decir, el aptámero está preenlazado con la molécula objetivo o especies biológicas. Aparte de esta diferencia, el detector de referencia es analizado para un cambio en la conductividad, capacitancia, etc., de la misma manera como para el detector biomarcador activo. El propósito de esto es que los múltiples detectores de biomarcadores, por ejemplo en número de cinco, cada uno tiene ahora una referencia interna de un evento positivo de detección del analito, sometido a los mismos efectos espurios que afectan a todo el detector. De este modo, se provee una comparación de "control" con el fin de permitir efectos espurios de primer orden debido a la variabilidad entre individuos o condiciones de muestreo a ser eliminadas y por lo tanto calibran la detección de cada biomarcador.

Existen diversos métodos para soportes de recubrimiento con aptámeros. Como una alternativa al caso con un nanotubo de carbono (o grafeno) recubierto con aptámero específico de biomarcador, es posible, primero, para funcionalizar una cadena de ADN - usada puramente como soporte - con aptámero y, luego, para enrollar la cadena de ADN funcionalizada alrededor de un sustrato de nanotubos de carbono (o la cadena pueden enrollarse primero y luego funcionalizarse). El aptámero específico de biomarcador y el aptámero cubierto se pueden unir a los grupos de ADN utilizando la química clic. Otra posibilidad es unir el aptámero a los nanotubos a través de un enlace de estreptavidinbiotina, donde uno de estos elementos está funcionalizado en el aptámero y el otro elemento está unido a los nanotubos a través de un enlace covalente o no covalente. Alternativamente, un nano alambre de ADN metalizado podría estar recubierto directamente con aptámero y aptámero cubierto. Otra alternativa podría utilizar polímero conductor recubierto con el aptámero o aptámero cubierto.

Como se mencionó anteriormente, el enlazamiento de los biomarcadores objetivo a sus aptámeros específicos causará un cambio pequeño pero detectable en las características eléctricas a través de los electrodos. Si es necesario, esta señal puede ser amplificada haciendo de los electrodos terminales de fuente-drenaje de un CNT-FET, por ejemplo. Después de una muestra se ha aplicado a los múltiples detectores específicos de biomarcadores y sus referencias de acompañamiento, los CNT-FET son interrogados para determinar el cambio en sus características eléctricas. Tales mediciones podrían tomar la forma de una prueba de conductividad simple con una fuente DC, o más complicado la determinación de la impedancia en ciertas frecuencias o sobre un rango de frecuencias. La misma prueba se aplicaría a los múltiples detectores de referencia, permitiendo que los efectos de fondo espurios presentes en el detector "vivo" sean retirados de la medición de concentración de biomarcador genuino.

- En un tipo de construcción, la fuente de oro y contactos de drenaje de un CNT-FET están dispuestos como un patrón de grabado al aguafuerte interdigitado sobre un sustrato de silicio, con los nanotubos de carbono recubiertos con aptámero establecidos sobre la parte superior para formar una especie de canal o puente semiconductor. Cuando se utilizan nanotubos de carbono que tienen una mezcla de realizaciones de naturalezas, es preferible que la separación del patrón interdigitado sea mayor que la longitud de un nanotubo individual para prevenir que los electrodos sean puestos en cortocircuito por un nanotubo metálico que actúe como una impureza.
- Una disposición de detección alternativa utiliza un sustrato de polímero, con pares de electrodos de oro dispuestos en un patrón de parrilla y los nanotubos de carbono recubiertos con aptámero establecidos sobre el patrón interdigitado. Muchas variaciones son posibles, como es conocido; en cada caso, se utilizan pares de estructuras de sensor, con circuitos apropiados, para dar un resultado referenciado.
- Para realizar el proceso de medición y obtener las mediciones discutidas anteriormente de forma automática, se proveen los circuitos a interfaz con el conjunto de CNT-FET, incluyendo, por ejemplo interruptores, fuentes de señal, amplificadores, convertidores de análogo a digital y microprocesadores.
- Para asegurar de que hay suficiente fluido biológico de prueba, por ejemplo esputo, orina, sangre, etc., presentes en la cabeza del sensor antes de una medición, se provee un circuito lógico para proveer una capacidad incorporada de auto-prueba. Tras la activación inicial, se registra el cambio de conductividad del electrodo de referencia de cada detector y se compara con un rango conocido, para asegurar que se ha aplicado fluido suficiente al detector, y que las mediciones subsiguientes serán válidas. El circuito realiza una medición de la conductividad en seco en todas las pistas para verificar la integridad del sistema. Después de la aplicación de, por ejemplo, saliva u otro fluido biológico al detector, se verifica el cambio en la conductividad para asegurar que está por encima de un nivel predefinido. La amplificación de los circuitos se utilizará para asegurar que los rangos dinámicos de las señales eléctricas son apropiados, para cada elemento sensor. Para algunos fluidos, el pretratamiento en un regulador adecuado sería seguido por la filtración selectiva, por ejemplo, para eliminar los contaminantes celulares.
- Con el fin de satisfacer la necesidad declarada de un sensor de diagnóstico en el punto de atención, no costoso, rápido, que pueda ser operado por personal mínimamente entrenado, toda la disposición de sustrato de detección y los circuitos discutidos previamente, puede ser montada dentro de un cuerpo moldeado que se parece, por ejemplo, a tarjetas de memoria de cámara digital conocidas. El conjunto de sensores está contenido dentro de una depresión poco profunda para permitir que muestras de fluido corporal se pongan en contacto con el conjunto de CNT-FET revestido con aptámero. Una película de sellado desmontable cubre el área activa del detector para evitar el ingreso de contaminantes. Se prevé que un lado o extremo del moldeado de cuerpo conectará los circuitos de detección a un dispositivo de mano móvil, como un teléfono inteligente, usando uno de los muchos conectores de datos y protocolos disponibles. En otra realización el sensor de moldeo es insertado en una solución como una "barra de inmersión" para medir otros fluidos corporales tales como la orina. Debido al pequeño tamaño del detector, el soporte mecánico provisto por el receptáculo, debe sostener la tarjeta de detección de una manera estable.
- Se apreciará que los resultados generados por el detector se pueden descargar en un teléfono inteligente u otro dispositivo de mano, para la recolección, visualización o análisis. Adicionalmente, los datos pueden ser enviados a través de cualquier equipo de transmisión de radio de productos accesibles y la pila de TCP/IP contenida dentro del teléfono inteligente a un servidor centralizado.
- Breve resumen de los dibujos
- Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo puede ser puesta en efecto, se hará ahora referencia, a manera de ejemplo, a los dibujos acompañantes en los cuales:
- La Figura 1 es una vista lateral de una realización que tiene un cuerpo moldeado que contiene el sustrato, los sensores y la película sellable;
- La Figura 2 es una vista plana de la disposición de una disposición de electrodos de referencia y del sensor;
- La Figura 3 es una vista plana de una realización con cinco pares de electrodos de sensores de referencia que extienden sobre un sustrato;
- La Figura 4 provee vistas esquemáticas de extremo y planas de la manera en que un aptámero de ejemplo se une a un esqueleto de nanotubos de carbono;
- La figura 5 muestra tres realizaciones diferentes de disposición de aptámero-biomarcador en un esqueleto del ADN;
- La Figura 6 muestra las diferentes disposiciones de biomarcador cubierto y descubierto como se aplica en el esqueleto del ADN de los electrodos de referencia y del sensor;
- La Figura 7 muestra una secuencia de pasos que utilizan química clic para formar los CNT funcionalizados;

Figura 8 muestra un sistema de control conectado a los sensores, para procesar adicionalmente los resultados y transmitir la información hacia y desde los medios de procesamiento;

La Figura 9 muestra microscopía de fuerza atómica de nanotubos de carbono de pared sencilla que han sido dispersados usando esperma de arenque de una sola cadena y luego secados sobre un sustrato.

5 La Figura 10a muestra un esquema de los electrodos interdigitados utilizados para medir las propiedades eléctricas de las redes de nanotubos, incluyendo aquellos adecuadamente funcionalizados para detectar el analito objetivo.

La Figura 11 muestra la corriente del electrodo como función del voltaje de la compuerta para redes de nanotubos formados por la deposición de nanotubos envueltos en ADN de esperma de arenque.

10 La Figura 12 muestra las características eléctricas de un dispositivo de nanotubo hecho por la deposición del complejo nanotubo-(GT)₁₀.

La Figura 13 muestra la corriente del dispositivo (eje derecho, línea oscura) y la corriente absoluta del dispositivo (eje izquierdo, línea clara) como una función del voltaje de la compuerta para dispositivos "protegidos" y "sin protección", donde el aptámero es contra la lisozima;

15 La Figura 14 muestra las características del dispositivo una realización con aptámero de trombina (GT)₁₀ desprotegido;

La Figura 15 muestra una característica para una instalación como en la Figura 14 pero con el grupo protector dejado en su lugar;

La Figura 16A muestra los resultados del electrodo de referencia como fue hecho (nanotubos funcionalizados por aptámero de trombina (GT)₁₀ protegida), mientras que la Figura 16b muestra el resultado desprotegido;

20 Figura 17a muestra los resultados para el electrodo de referencia como se hicieron (nanotubos funcionalizados mediante aptámero de trombina (GT)₁₀ protegida) y

La Figura 17b muestra el equivalente desprotegido.

Descripción detallada

25 Un dispositivo 50 de detección de biomarcadores que incorpora la invención está montado dentro de un moldeado 1 de cuerpo como se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. Un sustrato 2 está unido al interior del moldeado 1 de cuerpo, y una pluralidad de contactos o electrodos 3, 4 planares, se aplica al lado superior del sustrato para formar sensores 8, 9. Un canal 6 poco profundo puede estar formado para rodear las áreas de contacto del sustrato, para dirigir fluidos a las áreas de contacto en el inicio de una prueba, y para permitir que los fluidos sean retenidos en las áreas de contacto durante el proceso de detección, en circunstancias donde la cantidad de líquido es pequeña. Una

30 tira 7 de sellado extraíble de polímero se une a la superficie superior del moldeado de cuerpo con un adhesivo débil, para proveer un sello de barrera contra el aire y la humedad con el fin de evitar que las áreas de contacto del sustrato sean expuestas prematuramente a contaminantes o sean degradados por oxidación o hidrólisis.

La disposición de los electrodos sobre el sustrato 2 se muestra con más detalle en la vista plana de la Figura 2. El sustrato 2 puede consistir de silicio, preferiblemente con 300 nm de espesor de revestimiento de dióxido de silicio.

35 Para cada sensor 8, 9, los electrodos 3, 4 son formados depositando y grabando alternativamente para dejar contactos interdigitados paralelos formados a partir de una capa de adhesión de cromo de 20 nm de espesor debajo de una capa de oro de 100 nm de espesor. Típicamente, las pistas lineales están espaciadas 10-50 μm entre sí y están conectadas de forma alternativa a los contactos 30, 31 de electrodos. Estos contactos podrían ser etiquetados como "fuente" y "drenaje", aunque, estrictamente, en la mayoría de las realizaciones, el dispositivo no es realmente un FET. Los electrodos interdigitados se alternan en tal vez veinte o treinta pares (el dibujo es esquemático y muestra solamente unos pocos pares), dando un ancho total de tal vez 300 μm, y una altura comparable (en el dibujo). Los terminales 10, 11 recolectan la corriente de los electrodos 3, 4 interdigitados, respectivamente. Los pares de electrodos de cada sensor pueden ser colocados en estrecha proximidad entre sí, por ejemplo 500-1000 μm.

45 Una estructura 12 de sensor conductor o semiconductor capaz de conjugarse con un biomarcador objetivo de interés está recubierto sobre el primero del par de contactos 3, 4 interdigitados, formando lo que se conoce como el sensor de "medición". La estructura 14 del sensor adicional de naturaleza sustancialmente idéntica, pero ya conjugado con el biomarcador dirigido por el sensor de medición se aplica al segundo del par de contactos 9 interdigitados, formando lo que se conoce como el sensor de referencia. Cuando están en interfaz con el circuito electrónico apropiado que se describirá subsecuentemente, juntos el par de sensores de medición y de referencia forman un par

50 16 de detección para un biomarcador de interés.

La estructura 12 del sensor capaz de conjugarse con el biomarcador objetivo comprende nanotubos de carbono funcionalizados con un aptámero específico creado recubriendo el sustrato 2 y por lo tanto los contactos 3, 4 interdigitados con una capa de nanotubos de carbono. El aptámero puede ser una longitud corta (digamos aproximadamente 40 nucleótidos) de ADN o ARN, o un fragmento peptídico, por ejemplo. En el caso en el que el sustrato 2 sea silicio, se aplica una capa aislante delgada a los electrodos y se forma un "FET" de nanotubos de carbono con cierre posterior que tiene terminales que se pueden marcar fuente y drenaje, un canal formado por los nanotubos de carbono, y una compuerta formada por una capa dopada en el silicio. Si la amplificación por cierre posterior no es necesaria, no tiene que estar presente la compuerta.

En realizaciones donde se utiliza una red de nanotubos semiconductores como la estructura de sensor, el espaciado de los electrodos debería estar diseñado para asegurar que, incluso si una muestra de nanotubos semiconductores contiene impurezas de nanotubos conductores, estadísticamente es poco probable que haya un camino de nanotubos conductores puentando el electrodo, causando un cortocircuito en el sensor. Los CNT pueden ser del orden de 1-10 μm de largo si las pistas están separadas 10-50 μm . Su estructura y función se describen más adelante con más detalle.

Los espacios definidos por los electrodos intercalados en efecto forman un canal muy amplio entre dos electrodos. Las señales recolectadas de los electrodos de cada par intercalado alimentan a los circuitos adecuados (no mostrados). Aquí la señal desde el sensor 9 cubierto se compara con el sensor 8 expuesto o de "medición". Considerando que se puede esperar que el nivel absoluto de la señal se desplace o varíe con las condiciones, la diferencia (o relación, u otra comparación) da una lectura fiable. Puesto que los dos sensores están muy juntos, se ven afectados por igual por su entorno.

Para ciertas aplicaciones, frecuentemente es necesario detectar al mismo tiempo un conjunto de biomarcadores, frecuentemente denominados como una biofirma o "huella digital", por ejemplo de una enfermedad, para mejorar la probabilidad de un evento de detección correcta. La Figura 3 ilustra una vista plana de un detector biomarcador similar al de la Figura 2 pero que tiene una disposición lineal de cinco pares de detección de cada uno con su sensor 8 de medición y 9 de referencia sobre un sustrato 2 común 2, con sus electrodos intercalados que se muestran muy esquemáticamente; se apreciará que un número mayor o menor de pares de detección podría ser desplegado de acuerdo con el conjunto preciso de los biomarcadores de interés, el cual variará con la aplicación deseada del dispositivo. El conjunto lineal de pares de detección aquí coincide con una depresión 6a poco profunda extendida, para asegurar que las muestras de fluido pueden estar contenidas correctamente sobre la disposición de pares de detección.

En general, los biomarcadores son indicativos de, pero no 100% específicos para, por ejemplo, una enfermedad. Sin embargo, mediante la obtención de lecturas cuantitativas de un conjunto adecuado de biomarcadores se puede lograr un buen grado de confianza. Por ejemplo, la TB se pueden identificar usando cuatro biomarcadores: Neopterina, que indica los procesos inflamatorios y de estrés oxidativo en las células; La Procalcitonina, que distingue las enfermedades bacterianas en comparación con las enfermedades virales; Lipoarabinomano (LAM), que tiende a distinguir la TB latente vs. activa, y la proteína C reactiva (CRP), que tiende de nuevo a estar asociada con procesos inflamatorios y estrés oxidativo. Véase Tuberculosis 4, Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice; Robert S Wallis, Madhukar Pai, Dick Menzies, T Mark Doherty, Gerhard Walzl, Mark D Perkins, Alimuddin Zumlat. Published Online May 19, 2010; DOI:10.1016/S0140-6736(10)60359-5: http://www.mossmanassociates.com/TB%20Biomarker%20report%20Lancet_2010.pdf

Un dispositivo tal como el mostrado en la Figura 3 puede presentar un resultado en una sola lectura.

Como alternativa a este sistema de medición individual y referencia múltiple, sistemas de referencia múltiples pueden ser tomados como plantilla en un patrón regular para una medida sencilla y el resultado de referencia.

Se pueden utilizar disposiciones de pistas alternativas para el área de detección cuando se fabrica sobre un sustrato de plástico, con el área de contacto formado a partir de un número de pares de pistas paralelas dispuestas en un patrón de rejilla. En tal realización, los contactos pueden formarse a partir de oro depositado, plata o carbono aplicado por un proceso de impresión de chorro de tinta. Las pistas intercaladas pueden ser rectas o enrollada o enrollada.

Para la manufactura del FET con cierre posterior o cerrado en la parte superior que forma la estructura 12 de sensor semiconductor, el dominio del canal entre los contactos de fuente y drenaje (espaciados aproximadamente 10 μm de separación) debe estar revestido con un material de canal funcionalizado, preferiblemente los CNT, en particular, los CNT SW (de pared sencilla), y preferiblemente predominantemente semiconductores, aunque estos son más costosos. Una manera sencilla de lograr este fin es recubrir los electrodos con una suspensión solvente de los SWCNT.

En una técnica de ejemplo los SWCNT se modifican con β -ciclodextrina (β -CD) que no requiere calentamiento prolongado, filtración, y lavado de los CNT, que pueden causar daños. Los SWCNT se dispersan en una solución DE β -CD con sonicación, típicamente dando como resultado una suspensión de 2 mg/mL. Una alícuota de la

suspensión se aplica entonces al área de contacto en la depresión 6 del sustrato 2. Para asegurarse de que la alineación de los SWCNT 12, 14 funcionalizados a través de los contactos 3, 4 intercalados sea lo más uniforme posible, es posible aplicar un campo eléctrico a través del área de contacto del sustrato 2 a medida que evapora alícuotas, pero el requerimiento principal es que los nanotubos se distribuyan de manera uniforme.

5 Otra técnica de ejemplo para depositar con precisión los nanotubos de carbono entre los electrodos basados en dielectroforesis se da en Suhiro et al. ("Fabrication of a carbon-nanotube-based gas sensor using dielectrophoresis and its application for ammonia detection by impedance spectroscopy", J. Phys D: Appl. Phys. 36 (2003) L109-L114). En este método, los CNT de pared múltiple en suspensión en etanol son sometidos a sonicación. Un conjunto de electrodos de cromo intercalados fabricados sobre un sustrato de vidrio está rodeado por un espaciador de goma de
10 silicona para formar una cámara sellada. La suspensión de nanotubos de carbono se hace circular continuamente sobre los electrodos, los cuales son excitados simultáneamente por un voltaje de 100 kHz, 10 V pk-pk AC, lo que da como resultado los nanotubos de carbono de pared múltiple puentenando las brechas entre los dedos de los electrodos. Se apreciará que se podrían emplear otros métodos de deposición de nanotubos de carbono entre los electrodos.

15 Tras la aplicación de los nanotubos 12, 14 de carbono funcionalizados al área de contacto, se les somete a un tratamiento de "pegilación". La pegilación es conocida por los expertos en la técnica como el proceso por el cual las cadenas de polietilén glicol (PEG) están unidas a las proteínas, aumentando así la masa molecular de las proteínas. Sin embargo, en esta solicitud, el polietilén glicol se deposita directamente sobre la superficie de los nanotubos de carbono, recubriendo las áreas del nanotubo que no se han funcionalizado con un aptámero o una cadena de ADN.
20 La intención de este tratamiento es asegurar que las proteínas no específicas para el aptámero funcionalizado no se pueden enlazar a cualquier parte no funcionalizada del sensor, introduciendo así efectos espurios adicionales en la medición. Esto tiene el efecto de mejorar la sensibilidad de un nanotubo funcionalizado cuando se expone a una muestra de fluido que contiene una diversidad de especies de proteínas. El sustrato 1 y/ o la depresión 6 también pueden ser tratados para pegilar sus superficies para evitar la absorción de especies que puedan interferir con el
25 proceso de medición. Un tratamiento típico de PEG deja una capa entre 2 y 3 nm de espesor sobre la superficie del sensor. El proceso puede llevarse a cabo ya sea en la superficie del sustrato después de la deposición de nanotubos, o en solución antes de que los nanotubos estén recubiertos sobre los contactos.

Se apreciará que los detalles de la fabricación de los electrodos de medición 19 y de referencia 20 de un par 16 de
30 detección son idénticos, con la excepción del recubrimiento de SWCNT aplicado a los contactos. Por lo tanto la fabricación de los electrodos de medición y de referencia podría tener lugar simultáneamente hasta la última etapa de recubrimiento de SWCNT. En este punto, se aplican dos soluciones separadas de los SWCNT, la primera solución a los electrodos del sensor 19 de medición, con el sensor de referencia enmascarado, y la segunda solución al sensor 20 de referencia, con el sensor de medición enmascarado. Las soluciones se diferencian en que los nanotubos de carbono en suspensión en la primera solución aplicada al electrodo 19 de medición son aptámeros
35 funcionalizados capaces de enlazarse a un biomarcador objetivo. Los nanotubos de carbono contenidos en la segunda solución aplicada al electrodo de referencia son funcionalizado con un aptámero que ya está saturado (pre-enlazado, conjugado o cubierto) con el biomarcador objetivo.

En funcionamiento, un dispositivo se prepara con una estructura 14 de sensor cubierto en un área del sustrato con
40 electrodos 4 y una estructura 12 de sensor descubierta o desnuda en la otra área de sustrato, con electrodos 3. El dispositivo está expuesto a una solución que va a ser medida, por inmersión o aplicación de una gota de analito, tal como un fluido. Electrolitos y otros contenidos pueden causar un cambio de conductividad de las estructuras 12, 14 de los sensores, pero esto es el mismo para ambas. Solamente los eventos de enlazamiento causan un cambio diferencial. La señal resultante es analizada por la circuitería adecuada del dispositivo. Se puede ejecutar una prueba durante un tiempo determinado, tal como 30 segundos, tomando una lectura automáticamente al final, con el
45 fin de dar una medida de concentración en el electrolito.

También se podría detectar el analito objetivo (molécula causante) en sistemas de aire o no biológicos si el analito es VX o similar.

Un evento de detección típica consistirá en medir el dopaje tales como agujero o transferencia de electrones que se produce en el evento de enlazamiento entre el aptámero inmovilizado sobre la superficie del nanotubo de carbono, y
50 el biomarcador objetivo. Un gran número de tales eventos de dopaje (por ejemplo, transferencias de electrones) causado por los eventos de enlazamiento modulará el flujo de corriente de la fuente-drenaje en el "CNT-FET", un efecto que puede ser influenciado además por el voltaje aplicado a la compuerta.

El dispositivo también puede actuar como un sensor de promedio de tiempo en la forma de un monitor de radiación; es decir, que permanece en su lugar y mantiene la conjugación a los objetivos disponibles, y solamente despliega
55 una señal si la conjugación promedio de tiempo, que puede estar relacionada con la concentración, está por encima de un cierto valor, o se integra en el tiempo para medir una exposición mayor que un umbral.

Como se mencionó en relación con la Figura 3 y previamente en la descripción, un dispositivo con un conjunto de pares de sensores detectará un conjunto de biomarcadores, con cada biomarcador correspondiente a un par de

detección. Por ejemplo, un detector capaz de detectar cinco biomarcadores consistirá de un sustrato 2 con una fila 26 de cinco pares de detección. Para un dispositivo dirigido cinco biomarcadores, se aplicarían diez recubrimientos de SWCNT separados, la primera serie de cinco recubrimientos que representa los SWCNT “vivos” recubiertos aplicadas a los electrodos de medición, y el segundo conjunto de recubrimientos relacionados con los SWCNT recubiertos de aptámeros cubiertos aplicados al electrodo de referencia.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de detectar moléculas específicas de las bases de nanotubos de carbono, primero necesitan ser "funcionalizado". Una forma de hacer esto es para los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) que van a ser funcionalizados directamente mediante la unión no covalente de aptámeros específicos de biomarcadores a la pared exterior de los nanotubos.

Preferiblemente, los aptámeros son inmovilizados sobre la superficie del nanotubo de carbono usando una sustancia con una alta afinidad por el nanotubo de carbono, por ejemplo antraceno o una cadena de soporte de ADN monocatenario (que actúa como un "pie"). Se dice entonces que el nanotubo de carbono está funcionalizado para el biomarcador dirigido por el aptámero. La muy esquemática Figura 4 provee vistas axiales y planas de un nanotubo 27 de carbono con un aptámero 28 genérico funcionalizado inmovilizado en la pared externa de un nanotubo de carbono usando antraceno 29. Sin embargo, se apreciará que muchos métodos son conocidos en la técnica para la funcionalización de nanotubos, por ejemplo la carboxilación seguida por esterificación, o química clic como se describe más adelante. Cabe señalar que el dibujo es esquemático, y en realidad, un CNT sería mucho más largo de lo que está implícito, mientras que en particular es poco probable que los aptámeros sean esféricos.

Un nanotubo de carbono típico podría ser 1000 nm de largo con un diámetro de 1.25 nm, y que los respectivos diámetros efectivos del aptámero y el antraceno sean 3 nm y 0.4 nm. Bajo estos supuestos, cuatro aptámeros funcionalizados se puede unir a una circunferencia de un SWCNT, y 330 a lo largo de la longitud, lo que conduce a una estimación de un total de 1320 aptámeros funcionalizados por SWCNT.

En un segundo tipo de método de funcionalización de nanotubos de carbono, un ADN monocatenario se modifica por química "clic" para apoyar aptámeros, como se muestra en la Figura 5. Esta cadena se enrolla entonces alrededor de un nanotubo de carbono de pared simple.

La “química clic describe las reacciones entre los grupos funcionales que dan lugar a un enlazamiento estable, presentan una mínima reactividad cruzada térmica con otros grupos funcionales, reacciona a la terminación, están libres de cantidades apreciables de productos secundarios, y proceden bajo condiciones de reacción benignas.

El paradigma de la química clic se puede aplicar a la modificación de ácidos nucleicos, y se sabe que se puede utilizar para oligonucleótidos marcadores con colorantes fluorescentes, azúcares o péptidos; para ciclar ADN; y unir oligonucleótidos al ADN.

En una realización preferida, la unión se compone de un pie de polinucleótidos, preferiblemente alternando secuencias GT de $(GT)_n$, donde el número de GT se repite, n , es de 5 a 50, más preferiblemente $n = 10$. La secuencia GT incluye un grupo funcional alquino colgante sobre el cual un aptámero modificado por azida puede estar unido a través de la química "clic". Más preferiblemente, el aptámero está unido al medio de la estructura en forma de pie formando una unión en T para asegurar un buen contacto con el nanotubo.

Alternativamente, el nanotubo de carbono puede ser funcionalizado directamente con el aptámero mediante química "clic", en ausencia del ADN intermediario enrollado alrededor del nanotubo de carbono.

Preferiblemente, tanto en los casos en que el aptámero se une al “pie” polinucleótido o directamente sobre el CNT, el aptámero es protegido durante la conjugación química mediante una molécula complementaria, tal como una cadena de ADN. Una vez que la conjugación está completa, se retira la molécula protectora. Tal metodología reduce la funcionalización no deseada de la parte de reconocimiento del aptámero durante la química y reduce la probabilidad de adsorción no deseada del aptámero sobre los nanotubos. La secuencia protectora es suficientemente complementaria al aptámero para asegurar enlazamiento suficiente durante la funcionalización de tal manera que el aptámero está protegido pero puede contener secciones no coincidentes con el fin de reducir el punto de fusión del complejo para permitir la extracción fácil. La urea o cambios de pH también pueden ser utilizados durante el proceso de eliminación para reducir la temperatura requerida.

Con el fin de saturar las superficies de los nanotubos para evitar el enlazamiento no específico del objetivo se puede introducir exceso de aptámeros $(GT)_n$.

La Figura 5 muestra una cadena de ADN enrollado alrededor de un SWCNT o MWCNT, u otro medio conductor. Se ilustran tres arreglos alternativos de aptámeros unidos a un esqueleto de ADN con la química "clic". En (a), un aptámero específico de biomarcador se conjuga a cada una de las bases de Adenina, Citosina, Guanina o Timina de una cadena de ADN. En (b) un aptámero se conjuga solamente con la base de Adenina, por ejemplo, dando lugar a una menor densidad de aptámeros en comparación con el esqueleto en (a). En (c) hasta cuatro aptámeros dirigidos a diferentes biomarcadores se han conjugado con el ADN. Se apreciará que los aptámeros conjugados con el

esqueleto pueden ser de la variedad activa (no conjugados con sus biomarcadores objetivo), o puede ya estar conjugados con sus biomarcadores objetivo (cubiertos). De esta manera, se pueden preparar cadenas de ADN adecuadas para enrollar alrededor de los nanotubos de carbono que forman sensores ya sea de medición o de referencia se pueden.

5 Un híbrido de los ADN y nanotubos de carbono funcionalizados se forma enrollando las cadenas de ADN funcionalizadas alrededor de los nanotubos. Se apreciará que, o bien en la realización que concierne a la unión directa de aptámeros a un nanotubo de carbono, por ejemplo a través de carboxilación, o en la realización que describe el enrollado de una cadena de ADN alrededor de un nanotubo de carbono, los aptámeros unidos bien sea directamente al nanotubo o a la cadena de ADN se encuentran en el sensor de medición no conjugado y en el sensor de referencia conjugado con su biomarcador objetivo o de otra forma cubiertos ("descubierto" o "cubierto", respectivamente).

La Figura 6 es un diagrama correspondiente a la figura 5(b) y que muestra un par de estructuras de sensor, de medición y de referencia, con la estructura de referencia preenzalada con biomarcador y la estructura de medición que tiene algún biomarcador enlazado a la misma durante el proceso de medición.

15 Los diagramas muestran aptámeros enlazados a las bases, pero en realidad es probable que sea las bases hidrófobas que se enlazan al CNT con el esqueleto orientado hacia el exterior, de tal manera que los aptámeros se pueden unir al esqueleto.

La Figura 7 muestra una manera de preparar los recubrimientos de ADN de los aptámeros para los CNT. Se provee por un lado, una cadena de ADN (vertical) compuesta principalmente de una secuencia alternante GT, que incluye un alquino-T individual adyacente a una secuencia única corta, y por otro lado el ADN de aptámero deseado (horizontal) con modificación azida en 3', protegida por una cadena de ADN totalmente complementaria con la región apareamiento de bases añadida para alinear en la cadena de ADN de soporte (pie) y una modificación de biotina en 5'. La conjugación clic (segundo panel de la Figura 7) se lleva a cabo en el lugar azida de alquino con la adición de Cu⁺. El ADN se dispersa entonces con los CNT y adecuadamente tratado, por ejemplo, por agitación, haciendo que los CNT se dispersen uniformemente. Luego, la suspensión se incuba con estreptavidina recubierta sobre perlas magnéticas y se calienta brevemente. La estreptavidina se enlaza a la biotina (panel 3) y las perlas pueden entonces ser removidas (panel 4), halando el complemento protector de los aptámeros y haciendo los CNT activos listos para su uso.

Mientras tanto, la otra parte del lote, para los sensores de referencia, mantiene la protección del aptámero. Las soluciones se dispersan entonces sobre los electrodos intercalados. Es preferible llevar a cabo el último paso después del enlazamiento de aptámeros, de tal manera que todos los sitios posibles son accesibles para el enlazamiento. Como se muestra en el diagrama final, el efecto del enlazamiento objetivo (izquierda) puede entonces ser comparado con la referencia o el sensor inactivo (derecha) en condiciones químicas idénticas.

En otra realización, se puede formar el sensor usando las técnicas comúnmente asociados con el área de la electrónica impresa. En este caso, un sustrato puede estar formado de un polímero plástico, por ejemplo tereftalato de polietileno (PET), naftalato de polietileno (PEN), poli-4-vinilfenol (PVP), o PEG. Pistas, de metal o de carbono, se depositan sobre el sustrato de plástico, y los nanotubos de carbono se depositan entre ellas usando el método descrito subsecuentemente.

Haciendo referencia nuevamente a la Figura 2, se entenderá que deben proveerse medios para medir las características eléctricas entre los contactos de la fuente 30 y drenaje 31 intercalados de los electrodos de referencia y de medición. Como se describió anteriormente, el sensor 8 de medición tiene principales terminales 30 y 31 de electrodos y un compuerta, un tanto análogo a un FET, pero el recubrimiento de nanotubos de carbono recubiertos por aptámero se aplica entre los terminales de "fuente" y del "drenaje" para preparar el área de la compuerta del FET. Los terminales del dispositivo se pueden conectar a los medios de estimulación 37 electrónica y de medición 38 para medir las características eléctricas entre los electrodos de la fuente y del drenaje.

Por ejemplo, los medios 37 de estimulación podrían asumir la forma de una fuente de voltaje, y los medios 38 de medición podrían asumir la forma de un amperímetro, lo que permite un establecimiento de la variación de la conductividad entre los electrodos 30, 31 de la fuente y de drenaje.

Se apreciará que otros circuitos electrónicos tales como amplificadores de instrumentación y las fuentes de corriente o de voltaje variable podrían ser utilizados durante el proceso de medición. También se apreciará que los medios de estimulación 37 y medición 38 podrían ser fabricados sobre el mismo sustrato 2 que forma el sustrato para el área de contacto, si se trata de silicio, o alternativamente podría residir en una tarjeta separada en estrecha proximidad con el sustrato de silicio, con los contactos de la fuente 30 y drenaje 31 que están conectados por cable de enlace.

Al cambiar los medios de estimulación y de medición, la variación de otros parámetros pudo ser medida a través de los electrodos de la fuente 30 y de drenaje 31. Por ejemplo, los medios de estimulación podrían asumir la forma de una fuente de alta frecuencia que, o bien podría estimular los contactos del SWCNT con una frecuencia única, o

barrer a través de un amplio rango de frecuencias. Esto permitiría un establecimiento de la impedancia a través de los electrodos de la fuente 30 y de drenaje 31. Del mismo modo, se podrían proveer medios para medir la resistencia, la capacitancia o la inductancia.

5 Al considerar la provisión de circuitos de detección, se entenderá que los circuitos idénticos al utilizado para los electrodos 34 de medición también pueden ser provistos para medir las características del electrodo de referencia simultáneamente.

10 Como se muestra en la Figura 8, las señales que representan la variación en la conductividad, la impedancia, resistencia, capacitancia, o inductancia, por ejemplo, de un par 100 de detección que comprende unos electrodos 101 de medición y electrodos 102 de referencia pueden ser transmitidas a medios 105 de calibración. En el caso donde las señales son analógicas, los medios de toma de decisiones podrían ser una sustracción analógica. Sin embargo, sería posible digitalizar las señales de los sensores de medición y de referencia utilizando un convertidor analógico a digital y realizar la sustracción entre ellos digitalmente. La señal 111 corregida es entonces la salida. Como se mencionó anteriormente, se provee una pluralidad de pares de detección para permitir la detección de un conjunto de biomarcadores. Por lo tanto, será evidente que se necesitará proveer un número proporcional de medios de calibración.

15 Se proveen unos medios 107 de toma de decisiones en los cuales las señales calibradas son entrada. Los medios de toma de decisiones establecen el conjunto de señales calibradas a partir de la pluralidad de pares de detección, y detecta para una condición. Si la condición se cumple, los medios de toma de decisiones indican esto mediante la emisión de una señal lógica. Será evidente que otra información relevante para el proceso de detección podría ser generada, por ejemplo, mediciones brutas de conductividad para cada nanotubo.

20 Se apreciará que los circuitos descritos anteriormente se puede fabricar en una tarjeta de circuito impreso (PCB), y conectado al sustrato sensor usando alambre de enlace o algunos otros medios. En la realización preferida, el sustrato sensor es desechable de un solo uso y fácilmente conectado a, y retirado de, una unidad de medida multiusos que contiene los dispositivos de circuitos de medición y de salida. Esta realización permite a los sustratos de sensores mantenerse en condiciones óptimas de almacenamiento, por ejemplo, ambiente estéril y control de temperatura. Alternativamente, se apreciará que una proporción de los circuitos podría fabricarse directamente sobre el sustrato sensor, y el resto que ocupa una PCB conectada al sustrato. Además, la PCB podría estar conectado mecánica y eléctricamente a un conector, el cual por ejemplo podría incluir un conector USB, o un conector micro USB, aunque se apreciará que podrían ser utilizados muchos otros tipos de conector de datos, incluyendo los conectores inalámbricos.

30 Los experimentos se llevaron a cabo para probar la viabilidad del sistema, y se hicieron mediciones, como se describirá ahora.

Paso 1: Producción del aptámero de ADN-

i) síntesis de ADN

35 utilizando química de protección con DMTr para 5'-OH y un 3'fosfito protegido con β -cianoetilo.

El ADN fue sintetizado utilizando síntesis en fase sólida por etapas en un Sintetizador de ADN/ARN ABI 394 utilizando protección química de DMTr para 5'-OH y un 3'fosfito protegido por β -cianoetilo.

40 La funcionalidad azida se introdujo usando 3'amino CPG que luego se convirtió en 3'azida usando química de azidobutirato NHS éster. Se utilizó una fosforamidita "T" funcionalizada con alquino para incorporar el grupo alquino dentro de la secuencia de ADN

ii) Purificación de oligonucleótidos después de la Escisión y Desprotección usando HPLC.

Los oligonucleótidos se purificaron usando ya sea:

- RPLC usando un gradiente de 100% de acetato de amonio 50 mM pH 6.8 a 100% de acetato de amonio 50 mM en 50% de acetonitrilo, a 55°C.
- 45 • Cromatografía de intercambio iónico utilizando agua a 100% de NaCl 1.2M a 60°C.

iii) Conversión del grupo 3'-amino a -3'azida:

50 Se disolvió azidobutirato NHS éster en MeCN. 3'-amino-ADN disuelto en carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9. Azidobutirato NHS éster se agregó a oligonucleótido disuelto y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Para concentrar se agregaron 2 volúmenes de etanol frío, se incubó a -80°C durante 20 minutos y se granularon (4000 g, 30 minutos). El ADN redisuelto fue desalinizado en agua de 18.2m Ω y fue liofilizado

iv) Química clic

(refiérase a la Figura 7.)

5 El ADN marcado con alquino (en agua) se añadió al ADN marcado con azida para disolverse. La solución de CuBr que contenía TBTA 0.1 M en DMSO/t-butanol 3:1 (v/v) se incubó a 45°C durante 2 horas [1, 2]. La reacción se diluyó con agua, se desalinizó en agua a 18.2mΩ y se liofilizó.

v) Verificación de la síntesis de ADN y Productos Clic

Los ADN sintetizados fueron sometidos a espectrometría de masas de ionización por aspersión en modo negativo para verificar masas correctas.

10 Los productos clic de reacción se marcaron en el fosfato 5' usando γ - [32P]-ATP [3]. Estos fueron analizados en gel de poliacrilamida SDS al 10% desnaturalizante para mostrar la conjugación "clic" exitosa.

Protocolos y Reactivos

www.glenresearch.com

www.linktechnologies.co.uk

Paso 2: Protección de oligómero, eliminación.

15 Las cadenas de andamio o protectoras se sintetizaron con un grupo biotina 5' permitiendo su eliminación postinmovilización del CNT de la pieza en T a través del fragmento en forma de "pie" de ssADN GT mediante breve (2 min) incubación sobre de la respectiva Tm en presencia de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Después de la exposición a un imán el sobrenadante que contenía las cadenas de aptámero libre unido a los CNT a través de los "pies" se utilizó para el recubrimiento de los elementos de electrodo.

20 Paso 3: Construcción del electrodo de referencia.

Se crearon ejemplos de electrodos de referencia por la retención de las cadenas complementarias o andamio unidas por hidrógeno al aptámero, bloqueando así la formación de la conformación activa del soporte aptámero. Alternativamente, las cadenas de aptámero se sintetizaron con un grupo de entrecruzamiento fotoactivo y enlazadas covalentemente a su objetivo en presencia de objetivo en exceso mediante iluminación UV.

25 Se llevó a cabo un experimento inicial con el fin de demostrar la dispersión uniforme de los nanotubos recubiertos de ADN, utilizando la solución de ADN de esperma de arenque congelado. La Figura 9 es una micrografía en fuerza atómica de tal dispersión de nanotubos seca sobre un sustrato de sílice que muestra los nanotubos recubiertos de ADN dispersados y la formación de una red percolada. Las imágenes y los barridos de línea confirman que los nanotubos están bien dispersos y se pueden secar para formar las redes conductoras requeridas para el sensor.

30 Paso 4: Dispersión de nanotubos en (GT)₁₀ en solución reguladora de fosfato (PBS).

Para hacer los nanotubos presentes en aptámeros, se utilizó un ADN sintético, a saber (GT)₁₀, conjugado con una cadena de aptámero cubierta, La solución (GT)₁₀ congelada a una concentración de 3.25 mg/ml se descongeló a temperatura ambiente. 115 microlitros de la solución de ADN se sometieron a sonicación durante 15 minutos.

35 0.19 mg de polvo de nanotubos como se recibió (Nanointegresis, semiconductor) se agregaron a 1 ml de PBS y se sometió a sonicación durante 80 min en total usando sonda ultrasónica usando 40 min a 15W con 0.5 ml adicionales de PBS. La dispersión de nanotubos se diluyó a 0.19 mg en 1.5 ml de PBS y se sometió a sonicación en un baño ultrasónico durante 2 h antes de la mezcla con el ADN.

40 La solución de ADN (115 microlitros) agregada a la dispersión de los CNT y se sometió a sonicación en un baño ultrasónico. Luego se agregó PBS a la dispersión (285 μ l) hasta que la dispersión alcanzó la concentración de nanotubos requerida. En general, una relación de 2:1 (ADN:SWNT p/p) se logró con DNAv:0.2 mg/ml y cCNTs:0.1 mg/ml. Las dispersiones se sometieron a sonicación vigorosamente en agua con hielo causando que la muestra se volviera de color rojo oscuro. Las dispersiones se sometieron a sonicación durante un total de 2 h, con hielo que se agregó al baño sónico cada 20-30 min para evitar que la temperatura se elevara por encima de 8°C. Finalmente, las dispersiones se centrifugaron suavemente a 3300 rpm durante 1 h y luego se filtraron usando un filtro de jeringa de 1

45 micron.

Paso 5: Deposición de la dispersión de nanotubos sobre los electrodos.

Los electrodos fueron producidos usando técnicas litográficas. Los electrodos comprenden de electrodos interdigitados como se muestra en la Figura 10a. En este dibujo, el diagrama de la parte superior es una sección

transversal de la parte del diseño de electrodos interdigitados, el medio es una disposición plana del par de referencia y del sensor. La vista desde arriba es una sección transversal de uno de los electrodos, mientras que el diagrama inferior es una vista plana de un par de electrodos, uno de los cuales se utilizaría como un electrodo de "referencia" y el otro como el electrodo de "medición". Las almohadillas rectangulares marcadas G, S y D se utilizan para conectar los electrodos a los circuitos de medición. Nótese que el etiquetado indicado aquí es para una configuración de transistor con contactos de una fuente, de drenaje y de compuerta. Sin embargo, el mismo diseño de electrodo puede ser usado en una situación sin transistor donde la corriente entre los dos electrodos interdigitados se mide, con o sin una polarización de compuerta.

5 La Figura 10b es una micrografía óptica de los electrodos del sensor interdigitados. Las pistas de oro son de 10 micrones de ancho y separadas por 10 micrones.

Los electrodos desnudos se enjuagaron con metanol, acetona y el IPA fue soplado con N₂ y limpiado en UV-O₃ durante 30 min. Los electrodos fueron aislados en sustratos utilizando lápiz hidrófobo. A continuación, una gota de 2 µm de la dispersión de CNT-ADN se deposita sobre los electrodos.

Resultados 1: Medidas eléctricas del complejo nanotubos-ADN sobre los electrodos

15 Se dispersaron nanotubos semiconductores (NanoIntegresis) con ADN de cadena sencilla utilizando el protocolo descrito con referencia a la Figura 9. Dispersiones de nanotubos de 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.007 mg/ml y 0.001 mg/ml se prepararon y se depositan sobre el electrodos. Se aplicó un voltaje de 2 V a través de los electrodos y el voltaje de la compuerta varió a medida que se medía la corriente del electrodo.

20 Los resultados se muestran en la Figura 11, que tiene la corriente del dispositivo (eje izquierdo) y la corriente absoluta del dispositivo (eje derecho) como una función del voltaje de la compuerta para diversas concentraciones iniciales de dispersión. El valor absoluto de la corriente es en forma de V debido a la naturaleza bipolar de la red de CNT. Las concentraciones iniciales en términos de nanotubos son como indican en el título de los gráficos. Se encontró que una concentración de aproximadamente 0.007 mg/ml de nanotubos dio una cobertura fiable sin un riesgo excesivo de cortocircuitos. Los cortocircuitos surgen de nanotubos metálicos; es difícil y costoso asegurar nanotubos semiconductores puros, por lo que la muestra utilizada contenía aproximadamente 10% de formas metálicas. El cortocircuito también fue impedido teniendo una diferencia suficiente en la separación de los electrodos en comparación con la longitud de los nanotubos utilizados - como se describió anteriormente.

Resultados 2: Medidas eléctricas de complejos (GT)₁₀ de nanotubes en los electrodos.

30 Se dispersaron nanotubos semiconductores (NanoIntegresis) con ADN de cadena sencilla utilizando el protocolo discutido en el Paso 4. Dispersiones de nanotubos de 0.1 mg/ml fueron preparadas y depositadas en los electrodos como se explica en el Ejemplo 4. Se aplicó un voltaje de 2 V a través de los electrodos y el voltaje de la compuerta varió a medida que se medía la corriente del electrodo.

La figura 12 muestra la corriente del dispositivo (eje derecho, línea oscura) y la corriente absoluta del dispositivo (eje izquierdo, línea clara) en función del voltaje de la compuerta.

35 Resultados 3: Medidas eléctricas de complejos de (GT)₁₀ de nanotubes en los electrodos.

40 En este experimento, Se dispersaron nanotubos semiconductores (NanoIntegresis) con la pieza en T de aptámero de lisozima de (GT)₁₀ de cadena sencilla en el uso del protocolo discutido en el Ejemplo 2. Estas muestras son designadas "protegidas" y todavía tienen la cadena protectora conjugada unida al aptámero. Un segundo conjunto de muestras, designadas "sin protección", fueron producidas por el calentamiento de la pieza en T de aptámero de lisozima de (GT)₁₀ de cadena sencilla a 70°C durante 15 minutos antes de su introducción a la dispersión del nanotubo. Las dispersiones se prepararon a una concentración de 0.007 mg/ml y se depositaron 2 microlitros en los electrodos como se describe en el Ejemplo 4.

45 La Figura 13 muestra la corriente del dispositivo (eje derecho, línea oscura) y la corriente absoluta del dispositivo (eje izquierdo, línea clara) en función del voltaje de la compuerta para: IZQUIERDA - el dispositivo "protegido" en el que el aptámero todavía se conjuga con su cadena de protección y DERECHA - el dispositivo "sin protección", donde el aptámero ha tenido eliminada la cadena conjugada. El aptámero utilizado en este caso estaba contra la lisozima.

Se describirán ahora algunos ejemplos de sensores específicos de la trombina.

Ejemplo 1: CNTs/aptámero de trombina (GT)₁₀ desprotegido.

50 Trombina (GT)₁₀ protegida congelada se descongeló a temperatura ambiente. 100 microlitros de esta solución se diluyeron en 900 microlitros de PBS para dar una concentración aproximada de trombina (GT)₁₀ de 1.2 mg/ml. La

solución se incubó a 90°C durante 2 min y se enfrió lentamente a temperatura ambiente para asegurar que todos los oligómeros fueran apareados en bases antes de la dispersión.

5 0Se colocaron 0.6 mg de polvo de nanotubos de Nanointegris en 2 ml de PBS y se sometieron a sonicación utilizando sonda ultrasónica durante 80 minutos a 15W. La dispersión de los CNT se sometió a sonicación en baño ultrasónico durante 30 min antes de la mezcla con el ADN. Se añadió 1 ml de la solución de trombina (GT)₁₀ a la dispersión de nanotubos y se sometieron a sonicación en baño ultrasónico. Se agregó entonces PBS a la dispersión (3 ml) hasta que la dispersión alcanzó la concentración requerida de nanotubos. Este proceso dio como resultado ADN:SWNT p/p de DNAC: 0.2 mg/ml, cCNTs: 0.1 mg/ml.

10 Las dispersiones se sometieron a sonicación vigorosamente en agua con hielo provocando que la muestra se tornara negra. El vial se suspendió centralmente en el baño, a una profundidad de 20-40 mm, con hielo alrededor de los bordes de la bañera que previene el calentamiento de la muestra.

15 Las dispersiones se sometieron a sonicación durante un total de 2 horas, agregando el hielo al baño sónico cada 20-30 min para evitar que la temperatura se elevara por encima de 5°C. Una vez que los nanotubos habían sido funcionalizados por el aptámero de trombina (GT)₁₀, el grupo protector se eliminó mediante calentamiento rápido a 70°C y recolectando el grupo protector usando perlas magnéticas de estreptavidina.

Las dispersiones fueron entonces centrifugadas suavemente a 3300 rpm durante 1 h y luego se filtraron usando un filtro de jeringa Whatman. Las dispersiones se diluyeron entonces a la concentración requerida usando PBS. En este ejemplo se diluyó la dispersión para dar una concentración de 0.007 mg/ml de nanotubos.

20 Los electrodos se limpiaron y aislaron utilizando un lápiz hidrófobo. Se colocó una gota de 2 microlitros de la dispersión sobre el electrodo y se dejó secar. Los dispositivos finales consistieron de una red de nanotubos cubiertos en el aptámero de trombina desprotegido. Este electrodo es el electrodo de "medición".

25 La corriente (ID) entre los electrodos de la fuente y de drenaje, o más bien los electrodos principales, se midieron entonces como una función del voltaje de la compuerta (VD) como se muestra en la Figura 14. El dispositivo muestra un comportamiento semiconductor. El dispositivo es un sensor hecho por los CNT funcionalizados por aptámero de trombina (GT)₁₀ desprotegido. Las mediciones se realizaron después del secado.

La corriente entre los electrodos (I, eje de la izquierda, línea oscura) como una función del voltaje de la compuerta (V). (El eje a mano derecha y la línea clara denotan la corriente absoluta (ABS(I)).)

Ejemplo 2: CNTs/aptámero de trombina (GT)₁₀ protegido

30 El electrodo se hizo como se describe en el Ejemplo 1. Sin embargo, el grupo protector se dejó en su lugar de tal manera que los dispositivos finales consistieron de una red de nanotubos cubiertos en el aptámero de trombina protegido. Este electrodo es el electrodo de "referencia".

35 La Figura 15 muestra la corriente entre los electrodos principales (ID) como una función de del voltaje de la compuerta (VD). Al igual que con el electrodo desprotegido, se observó un comportamiento semiconductor. En este dispositivo, un electrodo hecho por los CNT está funcionalizado por aptámero de trombina (GT)₁₀ protegido. Las mediciones se realizaron después del secado. La corriente entre los electrodos (I, eje de la izquierda, línea oscura) como una función del voltaje de la compuerta (V). (El eje a mano derecha y la línea clara denotan la corriente absoluta (ABS(I)).)

Ejemplo 3: Comparación de la respuesta de los electrodos de referencia y de medición

40 Los electrodos de medición se produjeron como se describe en el Ejemplo 1 y los electrodos de referencia se produjeron como se describe en el Ejemplo 2. Se midieron las características eléctricas de los electrodos (Figura 16). Se introdujo entonces trombina 100 nM a los electrodos, se dejó secar y las propiedades eléctricas se midieron de nuevo (Figura 17). No se observó ningún cambio significativo en el electrodo de referencia después de la introducción de la trombina, mientras que en el electrodo de "medición", la corriente se incrementó por un factor de ~4 a 2 V voltios de drenaje.

45 La figura 16a muestra el electrodo de referencia como fue hecho (nanotubos funcionalizados mediante aptámero de trombina (GT)₁₀ protegido) y la Figura 16b muestra el electrodo de medición como fue hecho (nanotubos funcionalizados por aptámero de trombina (GT)₁₀ desprotegido). Las mediciones se realizaron después del secado. La corriente entre los electrodos (eje mano izquierda, "I", línea oscura) se traza como una función del voltaje de compuerta (V). (El eje a mano derecha y la línea clara denotan la corriente absoluta, ABS (I).)

50 La Figura 17A muestra el electrodo de referencia como fue hecho (nanotubos funcionalizados mediante aptámero de trombina (GT)₁₀ protegido) y la Figura 17b muestra el electrodo de medición (nanotubos funcionalizados mediante aptámero de trombina (GT)₁₀ desprotegido) después de la deposición de la trombina 100 nM y secado subsecuente.

La corriente entre la fuente y el drenaje del electrodo (ID - línea oscura) se traza como una función del voltaje de compuerta (VD). (El eje al lado derecho y la línea clara denotan la corriente absoluta.)

- 5 Aunque se prevé que la invención sea útil para la detección de la tuberculosis, se apreciará que podría ser adaptada para detectar indicativos de biomarcadores de muchas otras condiciones también. Adicionalmente, la técnica se puede utilizar para detectar especies moleculares de origen no biológico, como ejemplificado por, pero no limitado a, agentes de guerra química, narcóticos y explosivos.

Los posibles campos de interés son:

- Medicina humana/veterinaria, en particular las enfermedades infecciosas como la tuberculosis humana/bovina;
- 10 La seguridad nacional, incluyendo riesgos biológicos como el ántrax, el tétanos, gases nerviosos, y explosivos tales como TNT, 2,4-DNT, 2-6-DNT, etc.;
- Aplicación de la ley, en particular fármacos que incluyen cannabinoides, benzoilecgonina;
- Salud y seguridad - detección de gases/vapores nocivos, nafta, hidrocarburos;
- Control de Procesos y de Calidad;
- Productos con valor muy alto, tal como fragancias por ejemplo almizcle (galaxolide);
- 15 Mediciones Generales, instantáneas o continuas o acumulativas:
- Gas, vapor, líquido, aliento, saliva, huellas dactilares;
- Entorno general o personal;
- Mediciones individuales o múltiples.
- Otras aplicaciones posibles son:
- 20 Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de la TB bovina;
- Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de la TB humana en puertos de entrada;
- El uso de una serie de sensores de aptámero en paralelo para detectar una "biofirma" para TB cuantitativamente;
- Biomarcador específico - configuraciones de diagnóstico para la detección de otras enfermedades (por ejemplo, Hepatitis B y C);
- 25 Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de agentes de guerra biológica;
- Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de explosivos;
- Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de fármacos;
- Configuraciones específicas de diagnóstico para la detección de gases nocivos
- Referencias:
- 30 1. Kocalka, P., A.H. El-Sagheer, and T. Brown, Rapid and efficient DNA strand cross-linking by click chemistry. *Chembiochem.*, 2008. 9(8): p. 1280-5;
2. El-Sagheer, A.H. and T. Brown, Click chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.*, 2010. 39: p. 1388-1405;
3. Sambrook, J., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2nd ed 1989, Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para identificar la presencia de una molécula o biomarcador objetivo específica mediante la detección de un cambio en una propiedad eléctrica, el dispositivo incluye un sensor (8) de medición que comprende:
- 5 una estructura (12) de sensor conductora o semiconductor capaz de conjugarse con el biomarcador, dando lugar así a dicho cambio en la propiedad eléctrica, incluyendo el sensor un recubrimiento de aptámero o un recubrimiento de anticuerpo;
- y un sistema (3) de electrodos para la realización de una señal desde el dispositivo;
- 10 en el que el dispositivo incluye un tal sensor (9) adicional, de forma sustancialmente idéntica, pero que tiene su estructura (14) de sensor cubierta de tal manera que no conjuga con el biomarcador, con el fin de actuar como una referencia interna.
2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cubrimiento se efectúa por presaturación de la estructura del sensor con la molécula o biomarcador objetivo, o en el que la estructura del sensor contiene un aptámero de oligonucleótido y el cubrimiento se efectúa por la estructura de sensor que está unida a un oligonucleótido de complemento, o en el que el cubrimiento se lleva a cabo mediante el uso de una versión mutante
- 15 de la estructura del sensor con variaciones de la secuencia, de tal manera que el biomarcador ya no se reconoce.
3. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la estructura (12) de sensor se hace sobre una base de semiconductor recubierta con aptámeros capaz de conjugarse con el biomarcador.
4. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los aptámeros son aptámeros de oligonucleótidos y son preferiblemente estereoespecíficos.
- 20 5. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que en el que la base semiconductor incluye un esqueleto de nanotubos de carbono (CNT), y una cadena de ADN está unida al esqueleto del CNT, con moléculas de conjugación unidas al ADN.
6. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la base semiconductor es un esqueleto de ADN recubierto por, por ejemplo, PVP, Al o Si para formar un "nanocable" para dar mediciones potenciadas de efectos eléctricos.
- 25 7. Un dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el sistema de electrodos incluye un par de electrodos (3) interdigitados entre los que se extiende la estructura de sensor.
8. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 7, en el que los electrodos (3) incluyen oro u otras tiras conductoras con una separación mayor que la longitud promedio de los CNT y que están espaciados
- 30 aproximadamente 10-50 μm .
9. Un dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que incluye además un sustrato (2) sobre el que se forman los sensores y electrodos, siendo el sustrato preferiblemente silicio o un polímero tal como PET, PEN, PVP o PEG.
10. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9 y que tiene dos o más de tales sensores de medición, cada uno para un biomarcador específico diferente, donde se utiliza la relación de las propiedades eléctricas medidas a partir de los electrodos de biomarcadores para identificar un compuesto.
- 35 11. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9 y que tiene una o más referencias y una pluralidad de estructuras de sensor de medición para la medición múltiple del mismo biomarcador.
12. Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que las moléculas de conjugación se asocian con biomarcadores generados por una enfermedad, tal como la Tuberculosis, Hepatitis B o Hepatitis C o surgen de otros procesos biológicos alterados generados como un ejemplo por la exposición a materiales biológicos peligrosos, tales como el gas sarín, VX o Ricina.
- 40 13. Un dispositivo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, y que se incorpora en un moldeado (1) de cuerpo con conexiones eléctricas apropiadas y sellado antes de su uso de una manera hermética con una película de barrera de polímero; que incluye además una interfaz para ser conectado a un dispositivo lector que mide la respuesta del conjunto y da un juicio o diagnóstico, y los circuitos (100-110) conectados al sistema (3, 4) de electrodos y adaptado para comparar las señales de la dos estructuras de sensores para dar una medición de la concentración de las moléculas objetivo en la muestra.
- 45

14. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el dispositivo en el punto de uso comprueba la suficiencia del volumen de muestra objetivo a través de la medición del electrolito contenido antes de que la conjugación (evento de enlazamiento) sea medida.

5 15. Un método de análisis de un fluido de muestra por la presencia de una molécula o biomarcador objetivo, en el que se hace pasar el fluido de muestra sobre un detector que incluye un par de dos estructuras de sensores sustancialmente idénticos adaptado para enlazarse al objetivo, cada estructura de sensor que comprende un sistema de electrodos y un recubrimiento aptámero o un recubrimiento de anticuerpo, en donde una de las estructuras de sensor está protegida para no unirse al objetivo y se utiliza como una referencia para una medición tomada desde el otro; y detectar un cambio en las características eléctricas a través de los electrodos basados en el enlazamiento de la molécula o biomarcador objetivo; en donde se utilizan opcionalmente varios pares de electrodos de medición (no conjugado) y de referencia (conjugados), con cada par funcionalizado con un objetivo diferente, de tal manera que varios identificadores diferentes pueden ser examinados para garantizar la identificación de la molécula objetivo; y en el que las moléculas objetivo pueden ser biomarcadores de la enfermedad o pueden emanar de explosivos, narcóticos u otras moléculas indeseables por ejemplo, agentes de guerra química tales como Sarin.

10

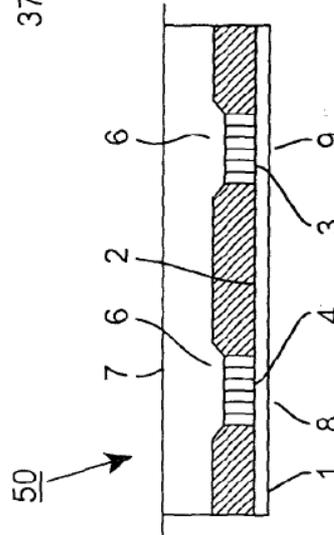
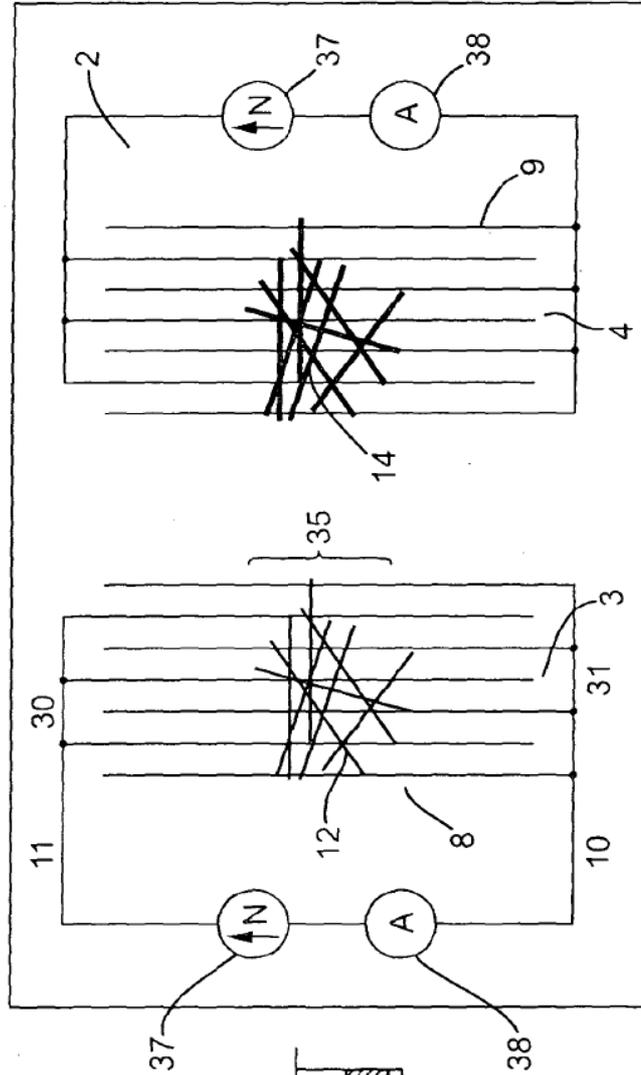


Figura 1

Figura 2

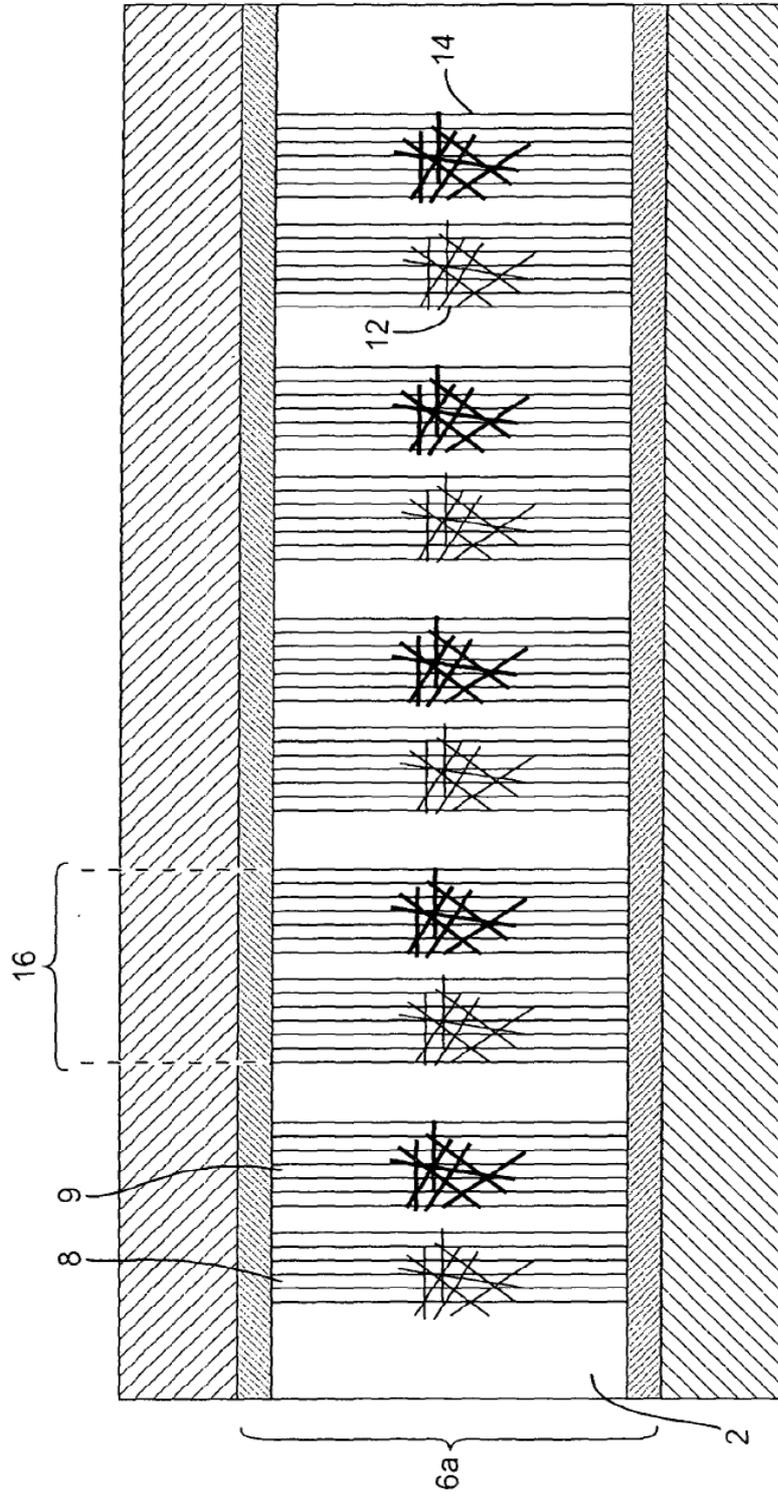


Figura 3

Figura 4

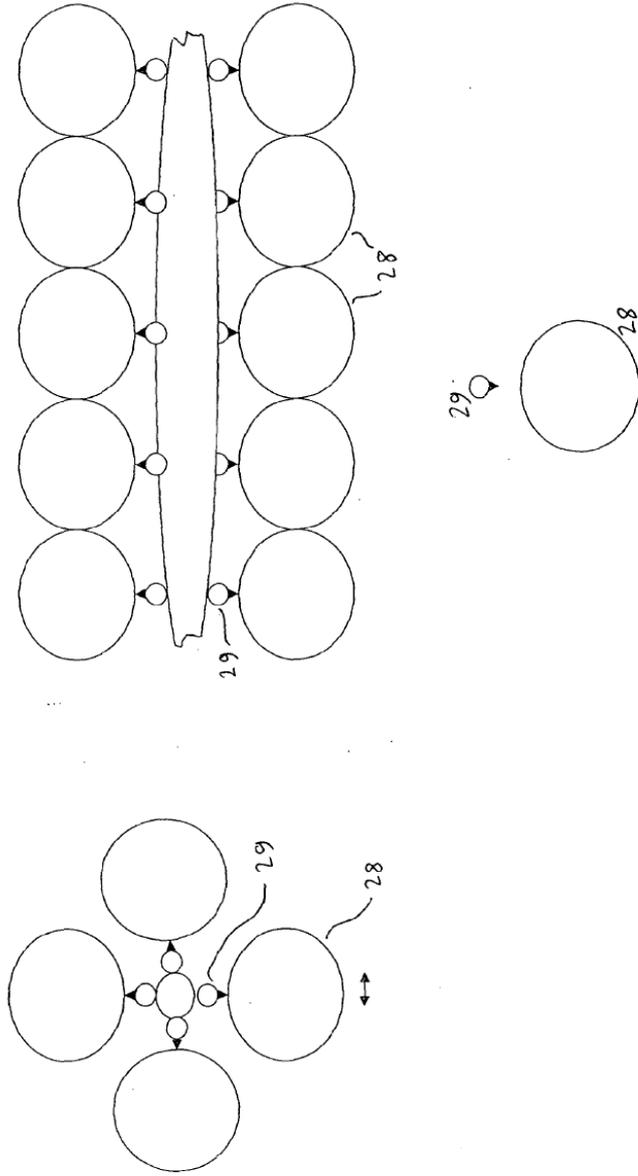


Figura 5

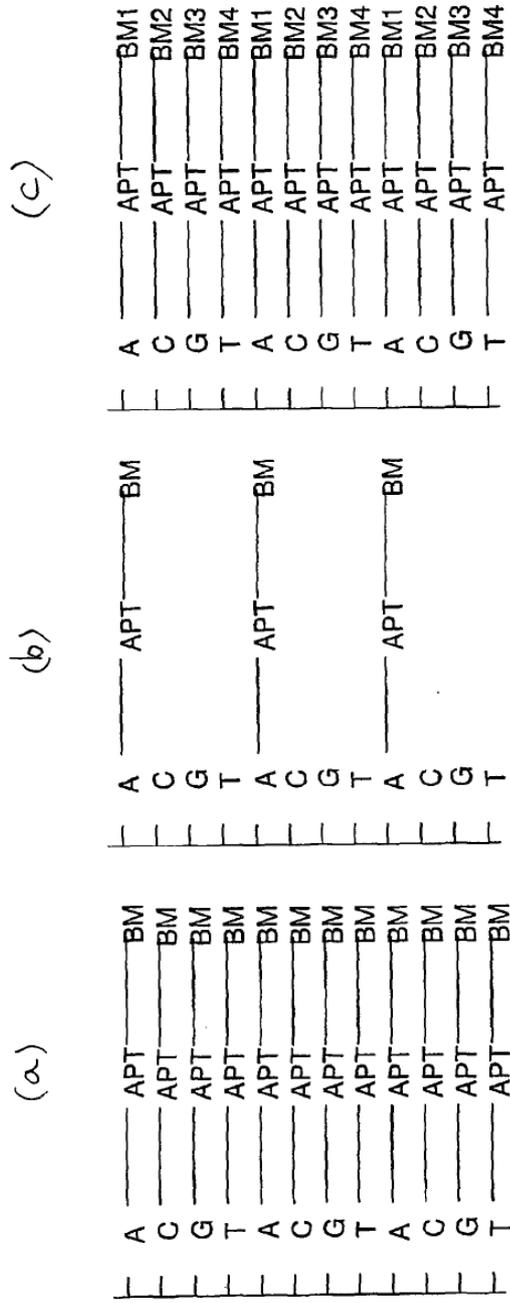
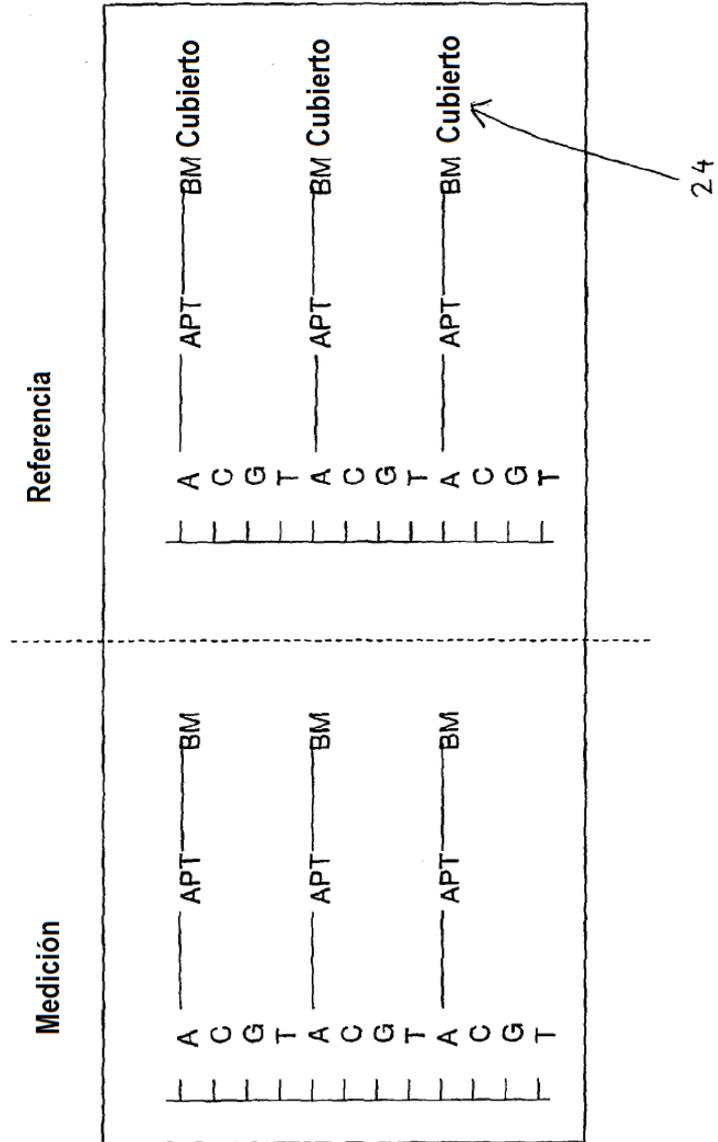


Figura 6



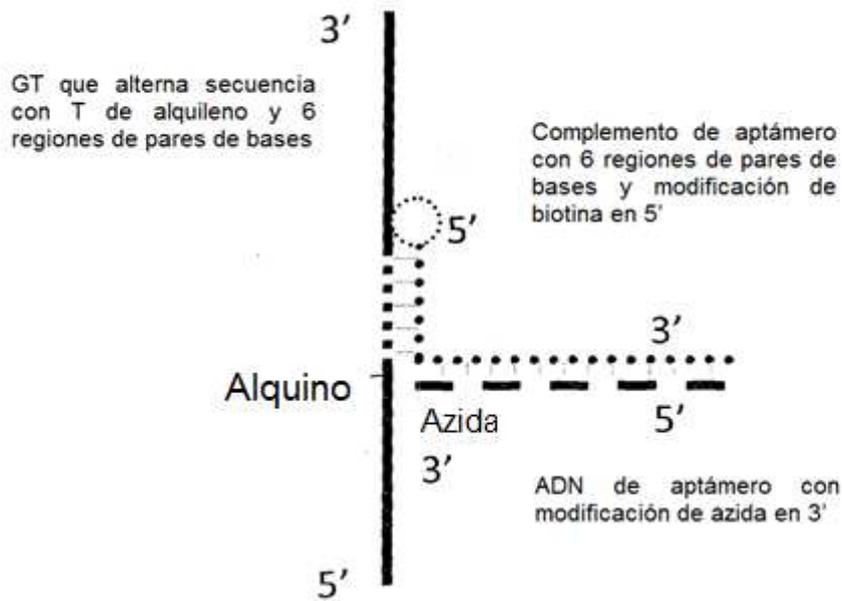


Figura 7(a)

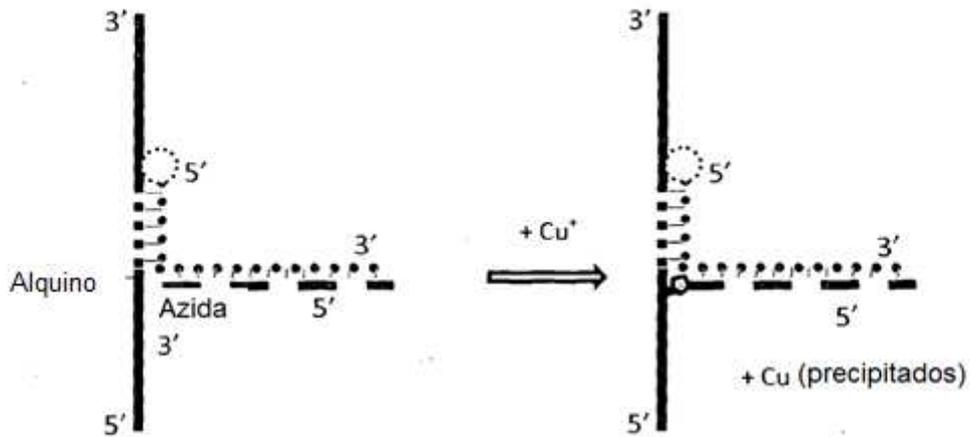


Figura 7(b)

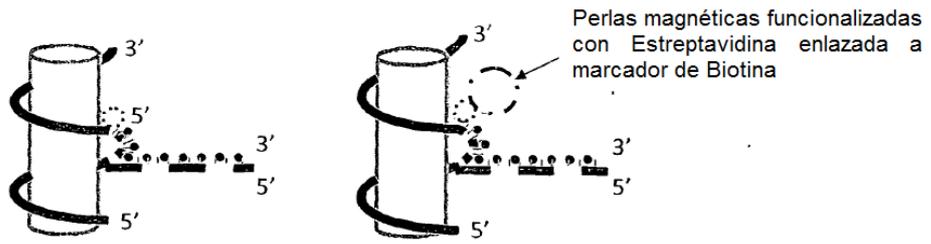


Figura 7(c)

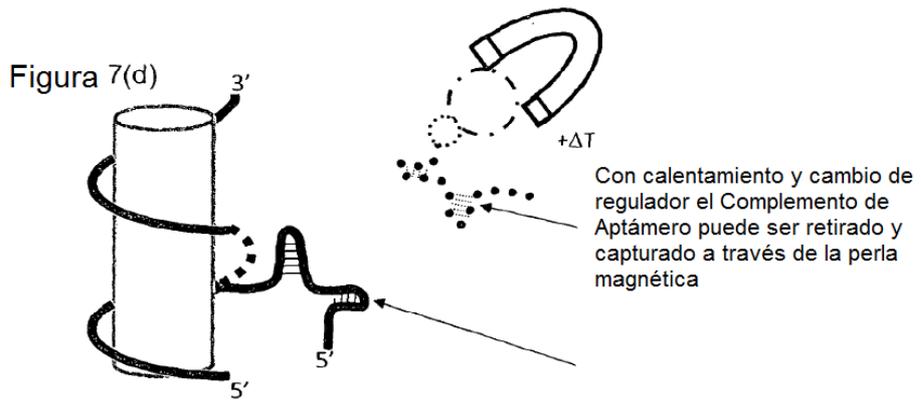
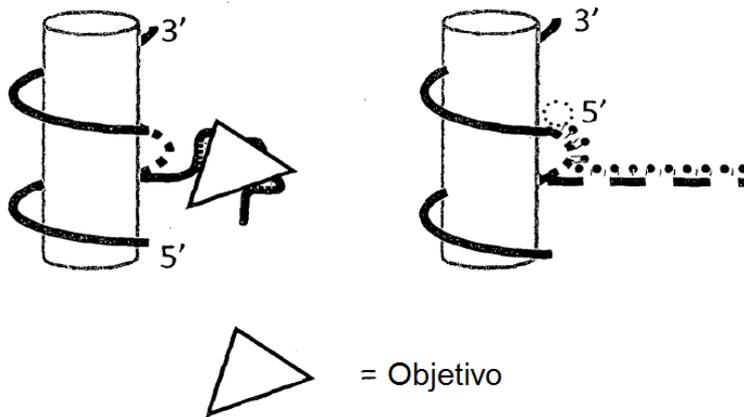


Figura 7(d)

Figura 7(e)



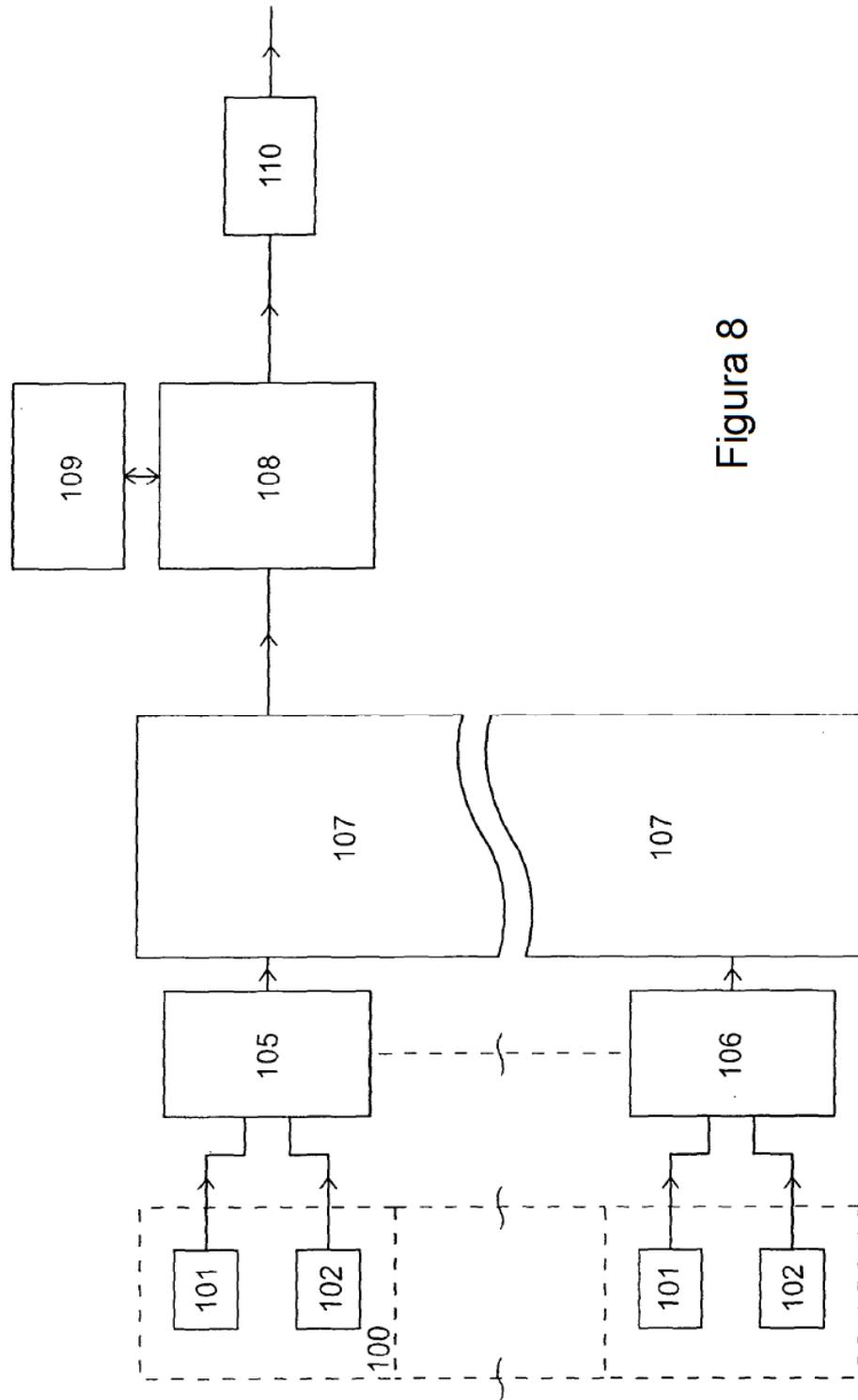


Figura 8

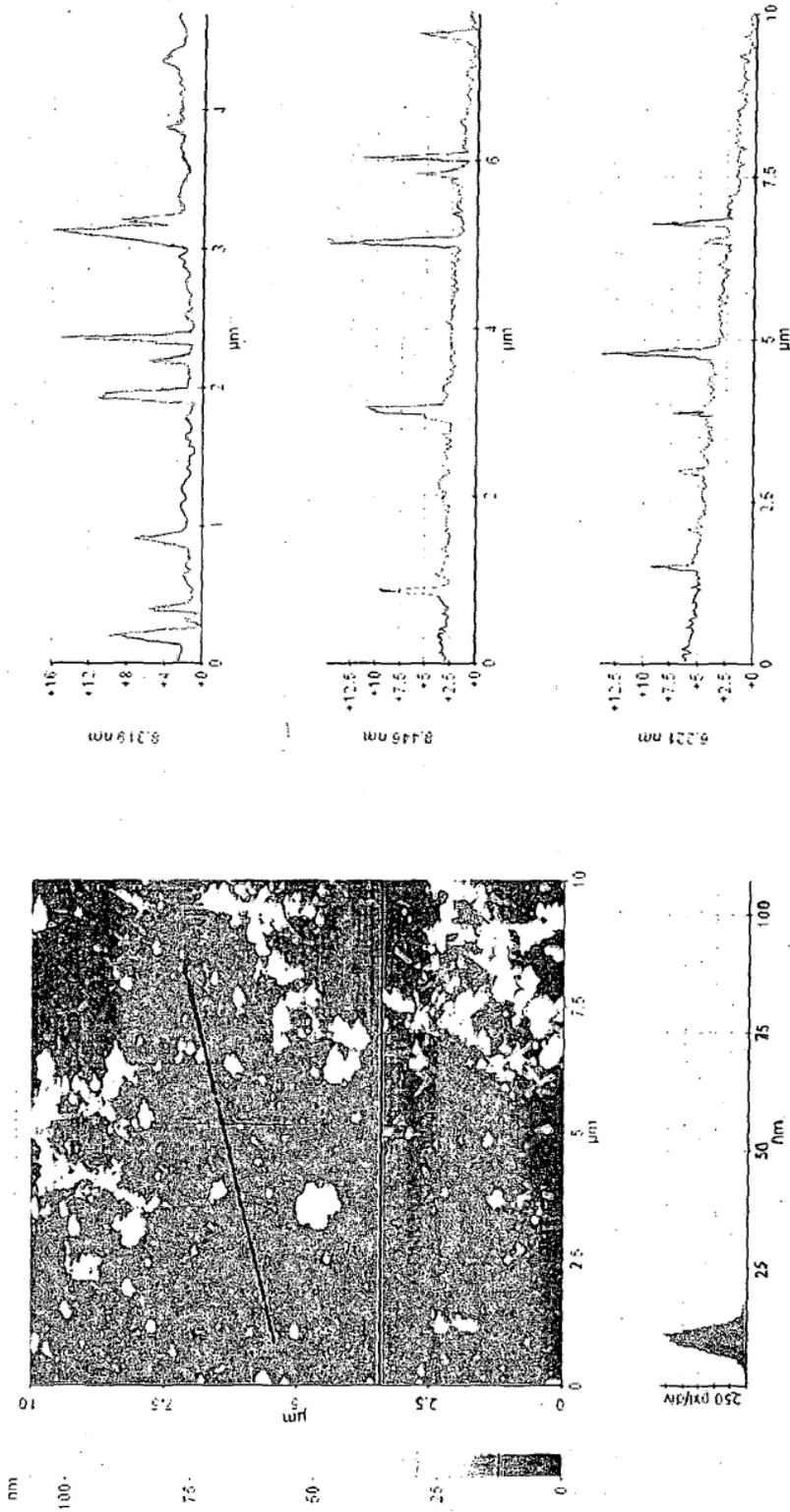


Figure 9

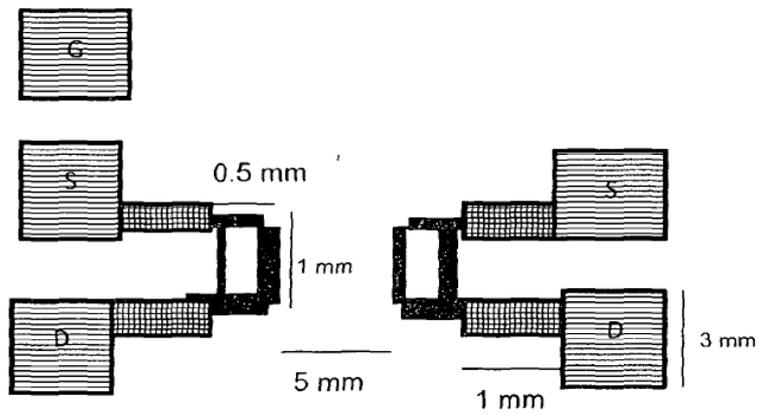
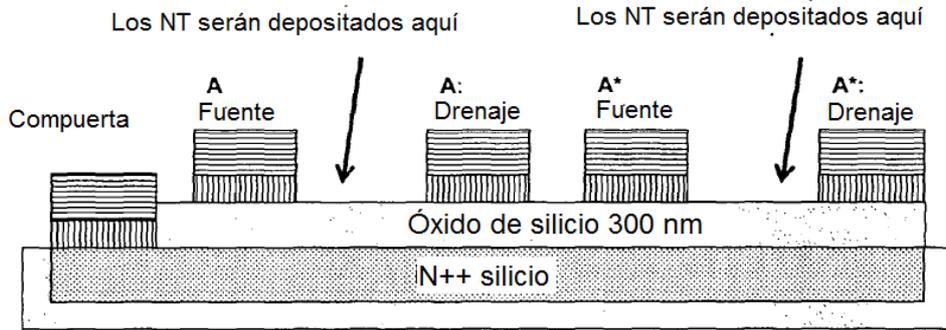


Figura 10a

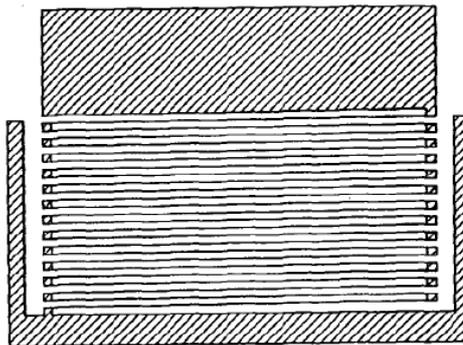


Figura 10b

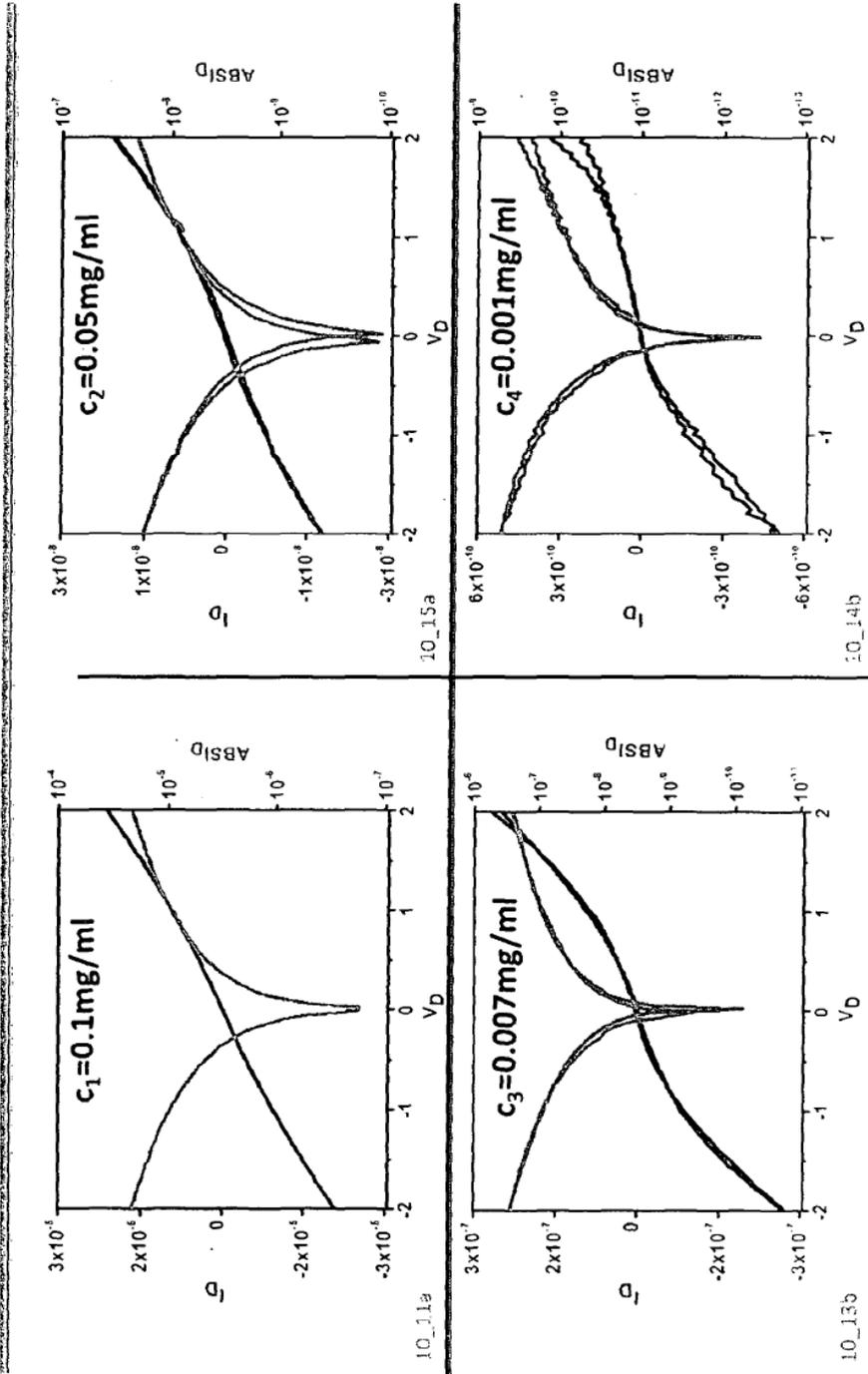


Figure 11

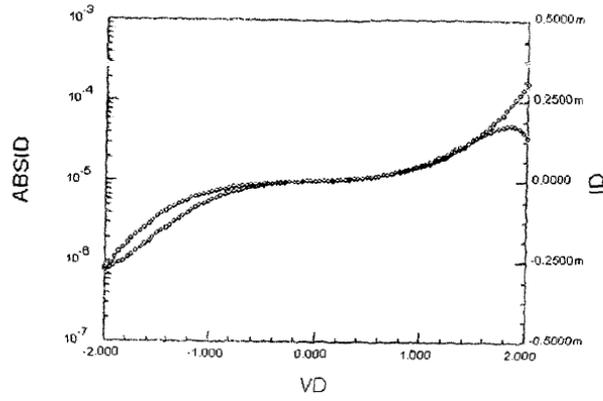


Figura 12

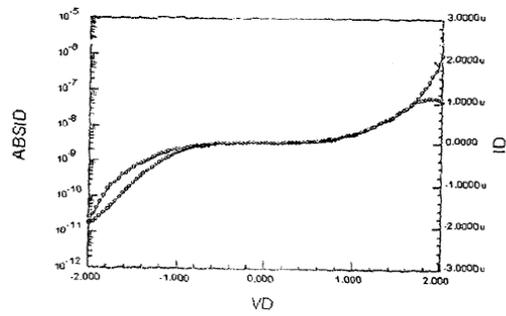
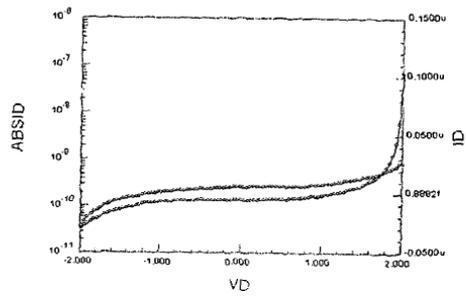


Figura 13



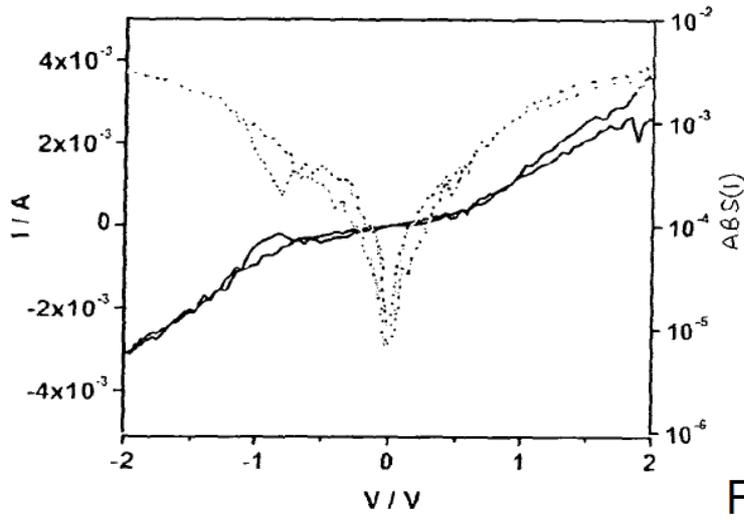


Figura 14

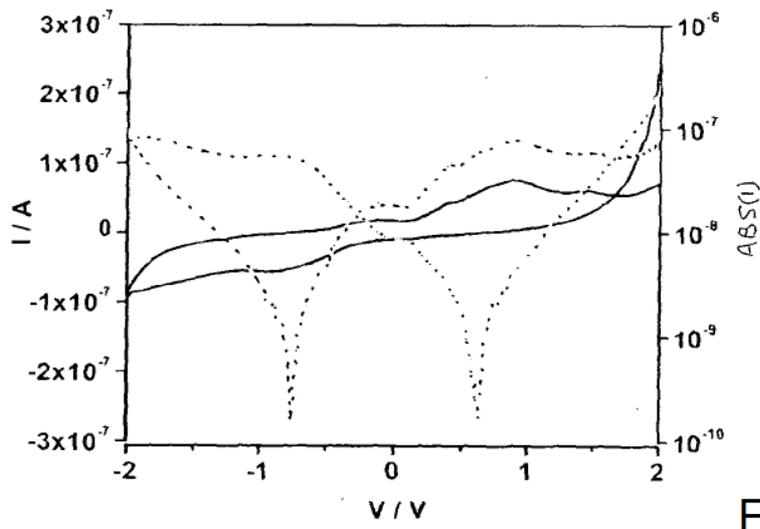


Figura 15

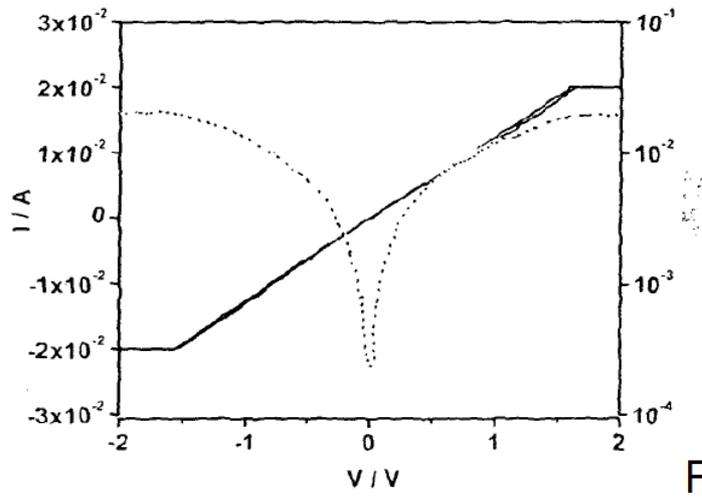


Figura 16a

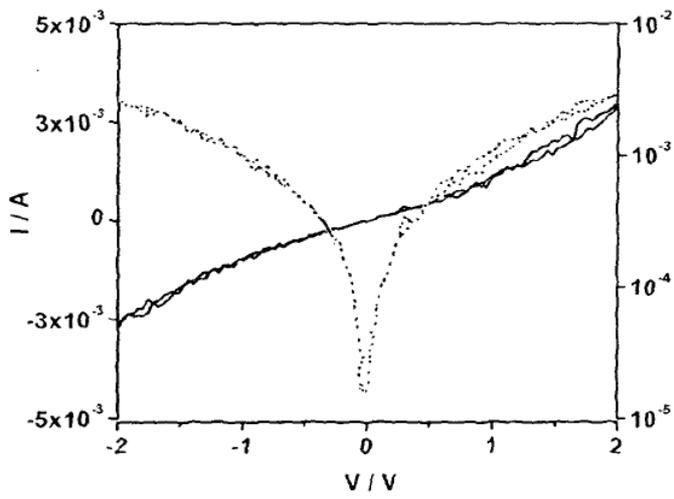


Figura 16b

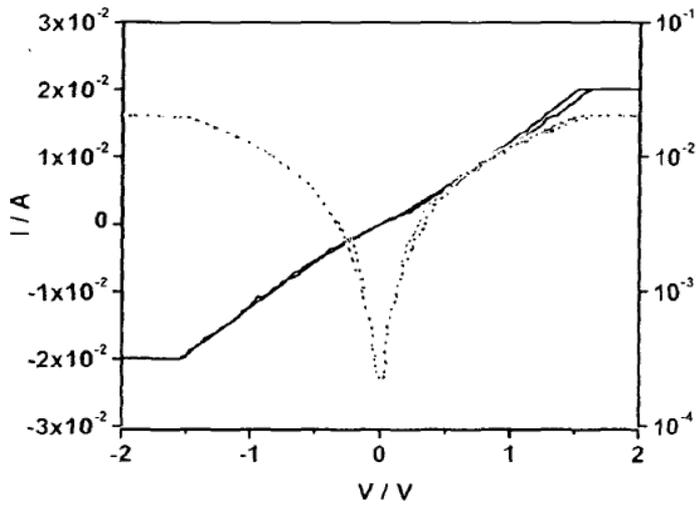


Figura 17a

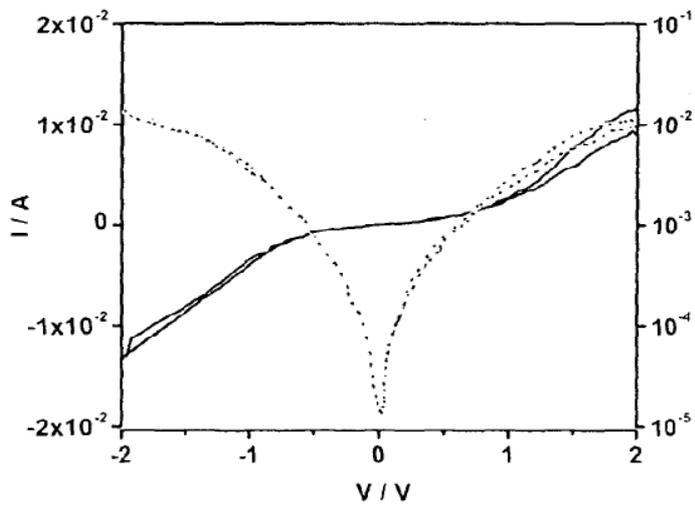


Figura 17b