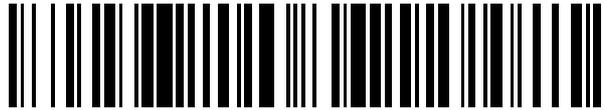


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 666**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2007 E 07804258 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2062051**

54 Título: **Métodos y dispositivos para detectar cambios estructurales en una molécula midiendo la impedancia electroquímica**

30 Prioridad:

16.09.2006 GB 0618253
20.10.2006 GB 0620808

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF LEEDS (100.0%)
Leeds, West Yorkshire LS2 9JT, GB

72 Inventor/es:

KOFERRIGNO, PAUL;
WÄLTI, CHRISTOPH;
EVANS, DAVID;
JOHNSON, STEVENS y
DAVIES, ALEXANDER GILES

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 562 666 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

Métodos y dispositivos para detectar cambios estructurales en una molécula midiendo la impedancia electroquímica

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para monitorizar la unión de entidades a moléculas biológicas.

- 5 La detección o identificación de alto rendimiento y alta sensibilidad de moléculas y otros objetos de la escala nanométrica es un importante concepto no solo para la diagnosis médica sino también para el descubrimiento de nuevos fármacos, para la seguridad, las aplicaciones forenses y otras aplicaciones. Las herramientas más prominentes para la detección o la identificación de dianas biológicas o químicas en una forma altamente paralela son las micromatrices. Desde hace pocos años, se han usado ampliamente micromatrices de ADN en la
- 10 investigación genómica, con la que ha sido posible el análisis del código genético a gran escala. Sin embargo, solo son capaces de detectar o de identificar moléculas de ADN o ARN monocatenarias complementarias. En los casos en los que otras moléculas o complejos de la escala nanométrica, por ejemplo, proteínas, tienen que ser detectadas, se requieren dispositivos más sofisticados, por ejemplo, matrices de proteínas, algunas veces también conocidos en la técnica como micromatrices de proteínas.
- 15 Las micromatrices de proteínas presentan un desafío significativamente más difícil que las matrices de ácidos nucleicos, por ejemplo, debido a la naturaleza compleja del proteoma. Las matrices de proteínas prospectivas encaran diversas dificultades, en particular, la identificación de moléculas sonda específicas, robustas y de alta afinidad que se unen a proteínas naturales; el desarrollo de estrategias de detección sin marcador para la detección de proteínas poco abundantes en soluciones biológicas complejas y el uso de artículos de matriz de tamaño de
- 20 micras o submicras para permitir altas densidades de matriz de las moléculas sonda.
- En la técnica, los métodos para producir micromatrices de proteínas usan típicamente anticuerpos inmovilizados en superficies y detección óptica de interacciones con proteínas marcadas fluorescentemente. Sin embargo, los anticuerpos tienden a perder su especificidad y/o afinidad cuando se unen a las superficies. Además, los anticuerpos se seleccionan lo más a menudo para unirse a proteínas desnaturalizadas, expresadas en procariontes tanto en
- 25 animales como in vitro a partir de bibliotecas de expresión de fagos. También, reconocen predominantemente epítopos que comprenden cadenas laterales de aminoácidos conformacionalmente limitados en secuencias lineales. Estas limitaciones ocultan seriamente la utilidad en las aplicaciones en las que se requiere la detección de proteínas naturales conformacionalmente dinámicas en mezclas bio-moleculares complejas, por ejemplo, de lisados celulares.
- Se han empleado moléculas sonda alternativas, por ejemplo, aptámeros de ARN, en matrices de proteínas y estas también tienen la desventaja de que normalmente han sido seleccionadas para unirse a las proteínas expresadas en
- 30 procariontes y no podrán plegarse correctamente y no serán post-translacionalmente modificadas. Los tintes fluorescentes que se usan para marcar proteínas para la posterior detección de interacciones sonda-matriz son típicamente hidrófobos y van a conducir probablemente a cambios conformacionales en la proteína marcada que puede enmascarar o destruir conformaciones biológicamente relevantes.
- 35 Un número de estrategias de detección sin marcador han sido discutidas en la técnica anterior, incluyendo la resonancia de plasmón de superficie, la espectroscopia de masas y las técnicas basadas en microscopía de fuerza atómica. La fabricación de matrices de alta-densidad basadas en estas estrategias es, sin embargo, problemática y los costes de instrumentación son importantes.
- La solicitud de patente de EE.UU. No. 2005/023155 describe un aparato y métodos para la detección eléctrica de interacciones moleculares entre una molécula sonda y una molécula diana de proteína o péptido, pero sin requerir el uso de indicadores electroquímicos u otros indicadores para obtener señales medibles. La invención descrita es un sistema de detección sin marcador basado en una celda electroquímica y espectroscopia electroquímica de impedancia convencional (EIE). El sistema está basado en una capilaridad de vidrio que imita bastante a una celda electroquímica convencional.
- 40
- 45 La solicitud de patente internacional WO2004/033724 describe un método para formar revestimientos de al menos dos moléculas de revestimiento diferentes en al menos dos electrodos. El método permite la preparación de electrodos a escala nanométrica. Los electrodos descritos en ese documento se revisten específicamente usando oligonucleótidos y están diseñados para la detección de ADN y/o ARN. No se muestran aplicaciones basadas en proteínas o péptidos.
- 50 Navratilova et al (The immunosensors for measurements of 2,4-dihydrochlorophenoxyacetic acid based on electrochemical impedance spectroscopy. Bioelectrochemistry (2004) 62, 11-18) describen un método para evaluar la unión del hapteno del ácido 2,4-dihidroclorofenoxiacético al anticuerpo del ácido anti-2,4-diclorofenoxiacético inmovilizado en un electrodo mediante espectroscopia de impedancia electroquímica.

Compendio de la invención

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se ha usado para la detección de interacciones sin marcador entre ciertas moléculas en la técnica anterior. El modo usual en el que ésta se emplea es mediante la medida de los cambios de impedancia que tienen lugar dependiendo de si las moléculas se unen o no entre sí. Son estas medidas de impedancia las que representan la lectura en dichos sistemas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para detectar la unión de una entidad a una molécula, siendo dicho molécula unida a una superficie, siendo dicha superficie eléctricamente conductora, en donde el método comprende:

- monitorizar la fase de la impedancia electroquímica a dicha superficie como una función de la frecuencia, y
- detectar el cambio como una función de la frecuencia en la fase monitorizada en la impedancia electroquímica a dicha superficie como una función de la frecuencia que indica la unión de dicha entidad a dicha molécula, teniendo dicho cambio una dependencia en la concentración de dicha entidad.

La presente invención está en su más amplio sentido definida por las reivindicaciones añadidas.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las interacciones o los cambios de conformación en moléculas biológicas pueden conducir realmente a un drástico efecto del desplazamiento de fase en el contexto de la espectroscopia de impedancia electroquímica. Específicamente, usando un campo eléctrico alternante en una aplicación del tipo EIE, y luego analizando el efecto de desplazamiento de la fase, pueden ser muy claramente detectados cambios conformacionales o cambios en la asociación entre las moléculas biológicas. Esta es una alternativa drástica respecto a las técnicas de la técnica anterior que se han basado solamente en la medida directa de cambios en la impedancia para su lectura. Las nuevas técnicas tomaron de ahí un número de beneficios técnicos. Uno de los más importantes de estos es que el análisis se produce independientemente del área de la superficie de las sondas particulares o las moléculas biológicas particulares de interés. Por tanto, las diferencias en el área de la superficie del electrodo o las diferencias en los volúmenes de electrodo que surgen debido a tolerancias en la fabricación u otros factores son controlados de forma ventajosa y no confunden el análisis. Además, monitorizando el desplazamiento de la fase como se toma en este documento, se crea un sistema de detección sensible de forma ventajosa.

La invención se basa en estos sorprendentes hallazgos.

La unión que se indica puede ser covalente o puede ser por puentes de hidrógeno o puede ser por cualquier otro tipo de unión o vinculación tales como polimerización u otros tales eventos.

De manera adecuada, la molécula se une a la superficie mediante un enlace químico y de la manera más adecuada, la molécula se une a la superficie fijándose mediante un enlace tiol. De forma alternativa, la unión a la superficie pueda estar en una disposición del tipo sándwich o en capas. Es esta realización, un péptido puede unirse a la superficie vía un enlace tiol. La molécula de interés puede unirse entonces en virtud de su interacción con dicho primer péptido. Es esta realización, la modificación química de la molécula biológica de interés es, de forma ventajosa, evitada ya que el enlace del grupo tiol es mediado por el péptido inicial unido directamente al electrodo y la molécula de interés puede entonces simplemente interaccionar con tal péptido sin necesidad de ninguna modificación química de la misma.

De manera adecuada, la superficie comprende un electrodo. De manera adecuada, dicho electrodo comprende metales. De manera adecuada, dicho metal comprende oro.

La molécula puede comprender un polipéptido. De manera adecuada, la molécula comprende una proteína estructural. De manera adecuada, la molécula comprende un aptámero de péptido. De manera adecuada, la molécula comprende una proteína estructural, comprendiendo la proteína estructural al aptámero de péptido.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método como se describe anteriormente en donde dicha molécula es un polipéptido y en donde dicho polipéptido se une a dicha superficie mediante un enlace tiol.

De manera adecuada, dicha molécula biológica de interés se selecciona del grupo que consiste en aptámeros, aptámeros de péptido, aptámeros de péptido no marcado, aptámeros de péptido sin marcador, proteína estructural no marcada que comprende uno o más aptámeros de péptido.

En la técnica anterior, hay un considerable interés en la producción de moléculas biológicas en matrices para su análisis a alta-densidad. Poniendo en matriz un número de moléculas de interés en un sustrato particular, puede producirse un sistema analítico muy poderoso. La formación de las matrices se realiza típicamente posicionando los compuestos de interés en "píxeles" o puntos y formando con esto un matriz. De hecho, se usan a menudo métodos análogos de impresión para crear las matrices de analitos punteadas. Sin embargo, las limitaciones técnicas impiden que los puntos sean conformados por debajo de ciertos tamaños umbral. Además, con respecto al distanciamiento de los diferentes parches, los problemas surgen al purgar juntos los miembros vecinos de la matriz. Esto también

limita el tamaño global de la matriz ya que son requeridos mayores distanciamientos para prevenir la contaminación cruzada de la muestra.

Los presentes inventores han desarrollado técnicas que permiten la funcionalización de electrodos extremadamente distanciados en el espacio. De hecho, pueden ser funcionalizados de manera diferentes electrodos individuales dentro de un matriz a distanciamientos de solo unos pocos micrómetros de distancia. Las técnicas descritas en este documento se basan en la activación controlada o la des-protección de los electrodos individuales en la matriz. Específicamente, los presentes inventores han mostrado que puede usarse un campo eléctrico para controlar la protección y des-protección (enmascarado/desenmascarado) de los electrodos individuales dentro de la matriz. Además, han mostrado que controlando simultáneamente los campos eléctricos que rodean los electrodos vecinos mediante el uso de otros potencióstatos, que “extienden” los efectos de campos eléctricos particulares localizados usados en la des-protección, puede prevenirse de causar la des-protección indeseable de electrodos vecinos. Así, de forma ventajosa, pueden usarse en una matriz electrodos extremadamente distanciados en el espacio. Además, los propios electrodos pueden ser de forma ventajosa minimizados en tamaño, permitiendo además una densidad mayor de electrodos dentro de las matrices. Así, la presente invención se basa en estas nuevas técnicas para la unión de moléculas biológicas de interés a electrodos en matrices muy pequeñas y muy cercanamente espaciadas.

Debe apreciarse que el término “funcionalización” como se usa en este documento típicamente se refiere a la unión de una molécula biológica de interés a la entidad que se “funcionaliza”. La molécula biológica de interés es, algunas veces, denominada en este documento “molécula sonda”.

Desplazamiento de fase

En electrónica, los diversos parámetros eléctricos se monitorizan típicamente suministrando una corriente constante y midiendo el voltaje o, por el contrario, suministrando un voltaje constante y midiendo la corriente. Típicamente, la corriente constante (DC) no se usa, sino que se usa en vez de ésta la oscilante (corriente alterna o AC). De este modo, la detección se mide normalmente a la misma frecuencia que la corriente de entrada. El ajuste o la sincronización de la detección a la misma frecuencia que la corriente de entrada se denomina “encerramiento”. Esto es importante para la eliminación del ruido o de las señales indeseadas. En un sistema perfecto, el voltaje y la corriente oscilarían o fluctuarían en armonía. Sin embargo, ciertas propiedades eléctricas tales como la capacitancia pueden introducir una diferencia de fase entre la frecuencia de entrada y la frecuencia de salida, mediante lo cual los máximos observados en la medida de la salida ocurren con un cierto tiempo de retraso o tiempo de desfase respecto a los máximos en la entrada. Este es el fenómeno (denominado ‘desfase de fase’ o ‘desplazamiento de fase’) que se explota en la presente invención. Al contrario que la técnica anterior, la invención muestra la monitorización del desfase de fase. La técnica anterior típicamente conduce solo a la medida de la impedancia (resistencia) del sistema. Sin embargo, el enfoque tomado en este documento se focaliza por el contrario en observar el desplazamiento de fase entre la corriente y el voltaje observados en los sistemas de la invención.

Se ha encontrado sorprendentemente que, como se demuestra en este documento, los cambios conformacionales en las moléculas de interés tienen un profundo efecto en la fase. A un nivel mecanístico, se piensa que la adición (por ejemplo, la unión) de moléculas sobre las moléculas fijadas a los electrodos cambia el medioambiente del electrodo a través de la unión a las moléculas unidas a este o altera la naturaleza química de este; entonces esto altera las propiedades electro-químicas del ensamblaje electrodo-disolvente-electrodo externo que es lo que detecta las medidas, es decir, altera sus propiedades dieléctricas. Esto se puede aplicar a características tales como la capacitancia de aquellos electrodos. Más importante, se ha mostrado ahora que esto puede producir un desplazamiento de fase marcado en la lectura eléctrica. Previamente, aquellos efectos no fueron observados o no fueron considerados que tuvieran alguna significancia ya que las técnicas de la técnica anterior estaban basadas solamente en la medida de la impedancia. De hecho, las medidas de impedancia/amplitud hechas en la técnica anterior han sido resultados adecuados que proporcionan las lecturas deseadas. Es sorprendente que estos efectos menores creados por la unión de moléculas individuales a los electrodos produzcan dicho efecto de desplazamiento de fase mencionado. Además, es una ventaja de la invención que dicho efecto de desplazamiento de fase sea independientes del área de la superficie del electrodo implicado.

Es una ventaja de la invención que puedan lograrse diámetros de electrodos más pequeños. En las técnicas de la técnica anterior, se requerían mayores tamaños de muestra en la matriz, por ejemplo, para proporcionar suficiente señal para las técnicas de detección lumínicas. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las medidas del desplazamiento de fase hechas de acuerdo con la presente invención, puede usarse de forma ventajosa un electrodo de tamaño más pequeño. Es una ventaja de la presente invención que las separaciones entre electrodo puedan ser reducidas. Por separación entre electrodos se entiende la distancia entre los electrodos o el hueco entre las superficies más cercanas de los electrodos vecinos o adyacentes. En la técnica anterior, la separación de los diversos parches o electrodos en la matriz tenían que ser bastante grandes para evitar complicaciones y problemas; por ejemplo, el desprendimiento junto con las muestras individuales. Sin embargo, una ventaja es la des-protección controlada eléctricamente o desenmascaramiento de los diferentes electrodos durante la fabricación de la matriz que evita dichos problemas de forma ventajosa por medio de que se permita un distanciamiento entre los electrodos más cercano del que ha sido posible en la técnica anterior.

Preferiblemente, los electrodos de la invención no son mayores de 20 micrómetros en diámetro.

Preferiblemente, el distanciamiento entre electrodos de la invención no es mayor de 15 micrómetros entre electrodos vecinos o adyacentes. Más preferiblemente, el distanciamiento es 20 nanómetros, más preferiblemente el distanciamiento es 10 nanómetros, más preferiblemente el distanciamiento es 5 nanómetros.

5 Una característica descrita en este documento es que las moléculas en la matriz se construyen mediante el uso de una superficie activamente controlada. En otras palabras, el enmascaramiento/des-protección está activamente controlado por la aplicación o supresión de campos eléctricos alrededor de los electrodos individuales que se funcionalizan. Esto contrasta con las técnicas de la técnica anterior en las que se construyen en superficies inertes o inactivas cuyas propiedades no cambian. Por el contrario, la presente invención se basa en la construcción de matrices usando una superficie dinámicamente cambiante, cuyas propiedades son manipuladas mediante el uso de campos eléctricos localizados que son producidos o suprimidos en electrodos individuales de acuerdo con la elección del operador.

10 Como se describe en este documento, se permite el control de calidad en el momento de la fabricación. Por ejemplo, es posible decir la diferencia entre un electrodo “desnudo” y uno que ha sido cargado con la molécula de interés. Por tanto, cualquier fallo en la unión de la molécula de interés puede ser inmediatamente detectado antes de que el aparato se ponga a funcionar. Esto, de forma ventajosa, ayuda a eliminar los lecturas de artificios cuando se usa el aparato de la invención. Un ejemplo de esto puede observarse en la FIG. 1A.

15 Pueden colocarse ADN u otros ácidos nucleicos sobre los electrodos a una separación pequeña. De hecho, se han colocado diferentes especies de ADN en dicha separación pequeña mientras se permitía la hibridación. Sin embargo, una ventaja de la presente invención es que esto ahora se ha hecho posible para las proteínas. Las proteínas son bastante más delicadas que los ácidos nucleicos en términos de su química, y en términos de su capacidad para la unión química a sustratos sólidos. En particular, hay problemas específicos asociados con la puesta en matrices de proteínas a separaciones pequeñas. Uno de estos problemas está en la unión correcta de las proteínas al sustrato sólido. Además, una vez que se une en cercana vecindad, la desnaturalización o la deformación de la proteína pueden cambiar drásticamente su comportamiento y evitar que exhiban su comportamiento biológico apropiado. Sin embargo, una ventaja de la presente invención es que los inventores pueden producir un distanciamiento cercano de los polipéptidos inmovilizados, evitando así problemas de cruce o de interferencia entre aquellas proteínas que han sido probadas en la técnica anterior. Esta ventaja se realiza mediante los métodos de fabricación (por ejemplo, métodos de funcionalización de electrodos con polipéptidos) establecidos en este documento. Esta ventaja además se realiza mediante el uso de proteínas estructurales que limitan y presentan correctamente al polipéptido de interés.

20 Esto es especialmente ventajoso para las realizaciones de la invención que se caracterizan por el uso de aptámeros de péptido. Más particularmente, cuando la proteína es una proteína estructural que comprende un aptámero de péptido, esta actúa para limitar más al péptido de interés dentro de su conformación más biológicamente relevante, incluso cuando se une físicamente a un sustrato sólido, tal como un electrodo.

25 Los ácidos nucleicos se unen típicamente a sustratos sólidos mediante el uso de una cadena de alcanos corta junto con un grupo sulfuro. Sin embargo, la implementación para las proteínas descritas en este documento es diferente. En particular, los inventores tienen la convicción de que es posible proporcionar un grupo sulfuro como parte integral de la molécula de proteína. Esto puede describirse como una alteración que permite la unión, tal como una mutación o adición a la secuencia del polipéptido para introducir uno o más grupos tiol; por ejemplo, la introducción de un resto de cisteína. Esto puede ser explotado entonces como la forma de unión a la superficie del electrodo sólido. En particular, es ventajoso que el grupo sulfuro sea proporcionado en el polipéptido en la forma de un resto de cisteína. Este resto de cisteína puede entonces “donar” un grupo sulfuro para unirse a una superficie del electrodo, tal como una superficie de oro. Es sorprendente que esta aplicación de aptámeros de péptido proporcione ventajas especiales. Esto es porque la unión de un polipéptido a un sustrato sólido se esperaría que tuviera un efecto en la conformación de tal polipéptido. Sin embargo, la química particular usada, y especialmente las realizaciones de la invención que caracterizan las proteínas estructurales inmovilizadas sobre la superficie, mantienen de forma ventajosa excelentes conformaciones del polipéptido incluso durante la unión física al sustrato sólido. Así, en una realización más preferida de la invención, la molécula sonda o molécula biológica de interés comprende una proteína estructural. Más preferiblemente, la molécula sonda o molécula biológica de interés comprende una proteína estructural que comprende un aptámero de péptido. Esto tiene la ventaja de limitar al aptámero de péptido y presentarlo en su conformación más biológicamente relevante, mientras se evita la perturbación de su estructura mediante la unión directa al electrodo; la unión está mediada lo más preferiblemente por uno o más restos presentes en la parte de la estructura de una proteína.

30 Es una ventaja particular de la invención que las matrices puedan ser operadas en un modo “sin marcador”. Esta ventaja surge del uso del desplazamiento de fase medido en la detección EIE para aliviar la necesidad del marcaje de moléculas individuales en el análisis.

35 Pueden ser fácilmente implementadas aplicaciones de selección de alto rendimiento de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, ahora es posible seleccionar inhibidores de interacciones proteína-proteína sin la necesidad de un marcaje de las proteínas individuales implicadas. Claramente, una vez que una proteína está marcada, su estructura molecular se altera, y esto puede perturbar o, de hecho, oculta el correcto comportamiento biológicamente

relevante de dicha proteína. Sin embargo, una fortaleza de la presente invención es que las proteínas individuales que se analizan no tienen que ser modificadas debido al mecanismo de detección del desplazamiento de fase sin marcador. Por eso, es posible analizar la misma interacción proteína-proteína en múltiples contextos o configuraciones moleculares diferentes. Por ejemplo, una proteína de interés puede anclarse a un electrodo en una matriz de acuerdo con la invención. Dos de tales electrodos que llevan la misma proteína pueden entonces exponerse a posibles parejas de unión de dicha proteína. En la muestra controlada, se suministraría una pareja de unión conocida y se esperaría observar la unión. En las muestras de ensayo, pueden aplicarse los compuestos o agentes que pueden ser candidatos para la disrupción o perturbación de la interacción proteína-proteína. En esta configuración, si no se observa la unión en presencia de un compuesto particular pero se observa en su ausencia, entonces dicho compuesto se identifica como un inhibidor candidato de dicha interacción proteína-proteína. De modo similar, la selección puede llevarse a cabo para encontrar parejas de unión particulares de una proteína de interés. En este escenario, la proteína de interés estaría unida a uno o más electrodos en la matriz, y las posibles parejas de unión serían entonces introducidas al sistema. Mediante la medida del desplazamiento de la fase que tiene lugar, se obtiene una indicación de la unión a la proteína de interés. De este modo, pueden ser fácilmente identificados compuestos capaces de una unión a una proteína de interés particular.

Descripción detallada de la invención

Es una ventaja particular de la presente invención que la diana o las dianas para todos los aspectos de la invención puedan seleccionarse a partir, pero sin limitación, de uno o más de proteínas, polipéptidos, anticuerpos, nanopartículas, fármacos, toxinas, gases peligrosos, sustancias químicas peligrosas, explosivos, partículas virales, células, organismos multi-celulares, citoquinas y quimioquinas, gametocitos, orgánulos, lípidos, secuencias de ácidos nucleicos, oligosacáridos, intermedios químicos de rutas metabólicas y macromoléculas. De manera adecuada, la diana comprende, o consiste en, una molécula biológica, de manera más adecuada, una macromolécula biológica, de la manera más adecuada, un polipéptido.

A través de la descripción y reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que las proteínas puedan seleccionarse a partir de uno o más de, pero sin limitación, proteínas naturales, proteínas desnaturalizadas, fragmentos de proteínas y proteínas expresadas en procariotas o eucariotas. De manera adecuada, la proteína tiene un significado normal en la técnica, de la manera más adecuada, 'proteína' se refiere a una molécula polipeptídica. Dicho polipéptido puede comprender modificaciones tales como glicosilación; fosforilación u otras dichas modificaciones según sea establecido por el operador.

A través de la descripción y reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que puedan seleccionarse anticuerpos a partir de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG y IgM.

A través de la descripción y reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que puedan seleccionarse nanopartículas a partir de, pero sin limitación, una o más de nanopartículas aislantes, metálicas o semiconductoras; productos secundarios de nanopartículas de procedimientos de fabricación; y nanopartículas de valor industrial, médico o de investigación.

Los fármacos pueden incluir aquellos, tales como, alcohol, anfetaminas, nitrato de amilo, heroína, quetamina, esteroides anabólicos, LSD, disolventes, cannabis, cocaína (tal como hidrocloreuro de cocaína o 'coca'), tabaco, tranquilizantes, crack (es decir, cocaína sin base), éxtasis y/o gammahidroxibutirato (GHB). De forma alternativa, el término fármacos también puede incluir convencionalmente sustancias medicinales entendidas.

La invención también puede implicar fármacos candidatos, por ejemplo, entidades químicas que pueden analizarse o seleccionarse para una actividad particular o propiedad usando las matrices o métodos de la invención.

A través de la descripción de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que las toxinas puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más toxinas que se originan de animales, plantas o bacterias.

A través de la descripción de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que las partículas virales puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, una o más partículas virales con y sin un genoma.

A través de la descripción de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que las células puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, una o más de células progenitoras pluripotentes, células humanas (por ejemplo, células B, células T, mastocitos, fagocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales), células cancerosas (por ejemplo, las que se originan de cánceres de hígado, óseo cervical, pancreático, colorectal, de próstata, epidérmico, cerebro, mama, pulmón, testicular, renal, de vejiga), organismos unicelulares de origen no humano, algas, hongos, bacterias, células de plantas, huevos de parásitos, plasmidios y micoplasma.

A través de la descripción y de las reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que los organismos multi-celulares puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de helmintos, nematodos, esquistosomas y tripanosomas.

A través de la descripción de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que los orgánulos puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, retículo

endoplásmico, lisosoma, fagosoma, membranas intracelulares, membranas extracelulares, citoesqueleto, membrana nuclear, cromatina, matriz nuclear y cloroplastos.

5 A través de la descripción y de las reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que los lípidos puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de lípidos de señalización, lípidos estructurales, fosfolípidos, glicolípidos y ácidos grasos.

A través de la descripción y de las reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que las secuencias de ácidos nucleicos puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de ADN, cADN, ARN, rARN, mARN, miARN y tARN.

10 A través de la descripción y de las reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que los oligosacáridos puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de oligosacáridos de origen humano, animal, de planta, fúngico o bacteriano.

Un aspecto particular de esta invención es un método para la detección o identificación de proteínas naturales, y/o para la detección de su conformación o su unión o asociación con una o más otra(s) molécula(s).

15 Es una ventaja particular de la presente invención que la molécula sonda o las moléculas sonda para todos los aspectos de la invención puedan seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de una macromolécula biológica, un aptámero, un aptámero de péptido, un reactivo de reconocimiento presentado en el contexto de otra estructura de proteína genéticamente modificada, un aptámero de ADN, un aptámero de ARN, una entidad química, una entidad química con potencial valor terapéutico, un oligosacárido, un péptido, una proteína y un anticuerpo. De manera adecuada, dicha molécula (molécula sonda) comprende una proteína o un polipéptido. Una ventaja de la invención es que se permite la monitorización de la conformación y/o las asociaciones moleculares usando polipéptidos inmovilizados; por ejemplo, monitoreando el desplazamiento de fase (cambio en la fase). Además, una ventaja de la invención es que se permite la unión de polipéptidos directamente a electrodos de pequeña escala y/o poco distanciados mientras que previamente dichas entidades fueron típicamente analizados mediante técnicas basadas en el posicionamiento. De manera adecuada, la molécula (molécula sonda) comprende una proteína estructural; de manera adecuada, dicha proteína estructural comprende un aptámero de péptido. La unión de polipéptidos a sustratos en fase sólida puede perturbar su estructura y/o comportamiento. Mediante el uso de una proteína estructural de forma ventajosa, el péptido de interés se limita a su conformación deseada o a la disposición espacial. Usando un aptámero de péptido dentro de la proteína estructural, se proporciona un sistema más versátil para la presentación de la molécula biológica de interés sobre el soporte sólido y se produce un mayor control sobre la conformación apropiada del aptámero. De manera adecuada, la unión al sustrato/soporte/electrodo es mediante la proteína estructural. Esto tiene la ventaja de que el aptámero del péptido de interés no está directamente implicado en la vinculación química al soporte, aliviando por medio de esto el problema de la disrupción de su estructura mediante dicha vinculación. Esto tiene la ventaja adicional de que el aptámero del péptido de interés no tiene que ser suministrado o unido de forma separada al soporte, pero puede unirse convenientemente mediante una modificación universal de la proteína estructural, llevando consistencia de forma ventajosa a través de los diferentes aptámeros (es decir, mediante la unión vía un procedimiento común usando la proteína estructural para cada diferentes aptámeros de péptido) y proporcionando la ventaja adicional de la simplificación de la funcionalización de los electrodos con diferentes aptámeros—la química de unión no tiene que ser individualmente diseñada para cada diferente aptámero de interés sino que puede ser realizada de forma ventajosa idénticamente para cada uno ya que la unión es, de manera adecuada, vía la proteína estructural común (en vez del aptámero del(de los) péptido(s) individual(es)).

Aptámeros de péptido

45 Los aptámeros de péptido son especies de unión de proteína que han sido modificados genéticamente para unirse a diversas dianas moleculares tales como pequeñas moléculas, proteínas, ácidos nucleicos u organismos y otras dianas de la escala nanométrica, tales como nanopartículas metálicas o semiconductoras. Los aptámeros de péptido ofrecen utilidad para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas así como aplicaciones de seguridad y forenses ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que compiten con el de la biomolécula comúnmente usada, los anticuerpos. Además de su reconocimiento discriminado, los aptámeros de péptido ofrecen ventajas frente a los anticuerpos ya que pueden ser modificados genéticamente completamente in vitro, poseen propiedades de almacenamiento deseables y pueden diseñarse para provocar poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas.

55 Más específicamente, los aptámeros de péptido son proteínas que se diseñan para interferir con otras interacciones de proteínas dentro de las células. Generalmente, consisten en un bucle de péptido variable insertado dentro y unido así a ambos extremos a una estructura, por ejemplo, una estructura de proteína. La limitación estructural impuesta por la estructura, que puede ser debida a (1) la simple restricción de los restos de aminoácidos en cada extremo del péptido insertado, minimizando así la libertad de movimiento por los aminoácidos restantes y sus cadenas laterales y permitiéndoles adoptar una configuración estable respecto a otra, o (2) puede implicar limitaciones conformacionales conducidas por interacciones de la cadena principal o la cadena lateral entre los aminoácidos del resto peptídico y los aminoácidos de la estructura, o (3) una combinación de (1) y (2), aumenta bastante la afinidad de unión del

5 aptámero de péptido a su diana cuando se compara con la afinidad desplegada por el péptido libre, a niveles comparables a los de un anticuerpo. Los aptámeros de péptido son secuencias de péptidos cortas presentadas y limitadas conformacionalmente en una estructura de proteína robusta e inerte seleccionada in vivo con altas y muy específicas afinidades para las dianas seleccionadas. La limitación de la conformacional tri-dimensional del péptido insertado aplicado por la estructura de la proteína aumenta bastante la afinidad del aptámero por la diana respecto a la de una secuencia peptídica no limitada. Se distinguen de los enfoques basados en proteínas o péptidos similares por ser seleccionados in vivo para unirse a dianas a partir de grandes bibliotecas (mayores que 10^5 secuencias peptídicas únicas) usando un enfoque de levadura-2-híbrido.

10 Las proteínas desempeñan una función significativa en la mayor parte de los procesos biológicos. Cada tarea fundamental en la célula está en último término gobernada por interacciones proteína-proteína. Una comprensión completa de la biología de las células y, por tanto, de la base molecular de la enfermedad, requerirá una comprensión global del comportamiento de la proteína, a partir de la dinámica conformacional de la molécula individual proteica a un catálogo de todas las interacciones proteína-proteína en una célula dada bajo las condiciones dadas. Se ha prestado mucha atención al desarrollo de técnicas adecuadas para la detección de proteínas expresadas. A causa del sorprendente número de potenciales isoformas de proteína que pueden expresarse en solo una célula individual, en último término, se requieren sistemas de matrices de alta-densidad donde grandes números de proteínas pueden ser estudiadas en paralelo. La actual dominante plataforma de tecnología detecta la unión de anticuerpos inmovilizados a moléculas de proteínas diana fluorescentemente marcadas. Aunque a menudo sea eficaz, esta metodología carece de un número de limitaciones inherentes.

20 Es una ventaja particular de la presente invención que los inventores presentan un sistema de detección o identificación de proteínas sin marcador electrónico con formato de matriz y basado en aptámeros de péptido. Los aptámeros de péptido se seleccionan in vivo en células eucariotas por su capacidad de reconocer estructuras de proteínas naturales.

25 Un aspecto particular de la presente invención es que la moléculas sonda se inmovilizan sobre una estructura de electrodo o una estructura de matriz de electrodos y así los métodos de la invención típicamente implican el uso de una estructura de electrodo. La estructura de electrodo debería comprender uno o más electrodos. De forma alternativa, la estructura de electrodo podría estar en un formato de matriz (estructura de matriz de electrodo) que comprende uno o más electrodos, que son preferiblemente individualmente tratables. "Tratables individualmente" es una expresión conocida en la técnica y significa que cada electrodo de la matriz o de la estructura de electrodos puede ser conectado eléctricamente a dispositivos externos en sí, es decir, sin necesidad de conectar otros electrodos de la matriz a la vez.

30 Los métodos de fabricación de dichas estructuras de electrodos o estructura de matriz de electrodos son por sí mismos conocidos en la técnica. Preferiblemente, la matriz comprende al menos 10, más preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 50, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1.000, más preferiblemente al menos 10.000 de electrodos individualmente controlables.

35 Aunque a los métodos de la invención sean aplicables para electrodos de cualquier escala, son particularmente beneficiosas las matrices de pequeños electrodos. Así, preferiblemente, los electrodos tienen un diámetro (dimensión mayor) de no más de 50 μm , más preferiblemente no más de 20 μm , más preferiblemente no más de 1 μm , más preferiblemente no más de 500 nm, más preferiblemente no más de 200 nm, más preferiblemente no más de 50 nm. Diámetro significa la dimensión mayor, ya que los electrodos no siempre pueden asumir formas reconocidas geométricamente debido a tolerancias de fabricación u otras consideraciones. Así, para formas de electrodos asimétricos o digitales u otras, 'diámetro' debería interpretarse de acuerdo con el significado de 'anchura' o 'dimensión mayor', de manera adecuada; como la mayor es la dimensión perpendicular frente al plano de protrusión desde el sustrato subyacente (de modo que no tome la longitud como la 'dimensión mayor'—el diámetro es una medida de la anchura).

40 Una ventaja particular de los métodos de la presente invención es el hecho de que puedan ser aplicados a estructuras de electrodos o estructura de matriz de electrodos donde los electrodos están poco distanciados. En particular, la distancia mínima (la separación) entre los electrodos es preferiblemente menos de 100 μm , preferiblemente por debajo de 50 μm , más preferiblemente por debajo de 20 μm , más preferiblemente por debajo de 1 μm , más preferiblemente por debajo de 200 nm y lo más preferiblemente por debajo de 50 nm. Preferiblemente, esta separación se aplica a la distancia mínima entre todos los electrodos vecinos.

45 Una ventaja más particular de los métodos de la presente invención es el hecho de que pueden aplicarse a estructuras de electrodos o estructura de matriz de electrodos con altas densidades de electrodos. En particular, las estructuras de electrodo o estructuras de matriz de electrodos tienen densidades de electrodo de preferiblemente más de $10^4/\text{cm}^2$, más preferiblemente de más de $10^6/\text{cm}^2$, más preferiblemente de más de $10^8/\text{cm}^2$, más preferiblemente de más de $10^{10}/\text{cm}^2$.

50 Los electrodos se forman a partir de materiales eléctricamente conductores. Preferiblemente, estos materiales son metálicos pero pueden, por ejemplo, ser no metálicos tales como materiales de carbono o semiconductores. El oro, la plata, el platino, el cobre o el aluminio y, en particular, el oro, son los preferidos.

Será entendido por el experto en la técnica que todos los electrodos pueden ser fabricados a partir del mismo material, pero no necesariamente todos tienen que ser fabricados a partir del mismo material. Es posible que uno o más electrodos sean fabricados a partir de un material, mientras uno o más electrodos adicionales sean fabricados a partir de diferentes materiales.

- 5 Un aspecto particular de la presente invención es que la molécula sonda puede ser inmovilizada sobre la superficie usando un aptámero de péptido que sea específico a la molécula sonda. Este aptámero de péptido particular es en sí mismo inmovilizado sobre la superficie a través de un agente enlazante apropiado, preferiblemente un agente enlazante tiol, y más preferiblemente el tiol se efectúa a través de un resto cisteína en la estructura del aptámero de péptido.

10 Proteínas estructurales

Tradicionalmente, la proteína tioredoxina A (TrxA) de *E. coli* ha sido empleada como estructura para presentar a los aptámeros de péptido. Sin embargo, muchos aptámeros de péptido basados en TrxA no se expresan establemente en células eucariotas cultivadas, lo que limita su uso. Recientemente, una nueva estructura de proteína basada en un mutante triple de estefina A humana ha sido desarrollado para afrontar estos problemas (Woodman et al., 2005).
 15 Se ha mostrado que esta nueva estructura (STM) es una estructura biológicamente inerte y versátil que puede usarse para presentar una gran rango de diferentes secuencias peptídicas, al tiempo de presentar simplicidad y robustez de la estructura de la molécula lo que permite que la técnica de producción sea genérica para todas las dianas. Para permitir la unión de la estructura STM a una superficie en un orientación bien controlada, así como para permitir la liberación controlada de la estructura en un aspecto más de la presente invención, la estructura STM ha
 20 sido mutada más para introducir un resto individual de cisteína en el extremo amino para permitir la unión de la estructura a los electrodos de metal vía puentes S—Au. Este resto de cisteína es el único de cisteína presente en la estructura y, en tres dimensiones, se localiza en el lado opuesto al inserto del péptido.

Para demostrar las capacidades de los dispositivos de matriz de proteína de los inventores, estos emplearon dos aptámeros de péptido diferentes mostrados mediante STM modificado con cisteína con afinidades para quinasa 2
 25 dependiente de ciclina (CDK2) y CDK4. Ambas CDK2 y CDK4 pertenecen a un grupo de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular; están relacionadas funcionalmente y todavía comparten menos del 50% de identidad de secuencia. Los dos aptámeros de péptido que interaccionan con CDK (denominados STM_{pep2} y STM_{pep9}, donde los subíndices pep2 y pep9 se refieren a dos diferentes secuencias peptídicas) fueron generados mediante la inserción de oligonucleótidos que codifican la secuencia peptídica que interacciona con CDK derivada de los aptámeros de
 30 péptido basados en tioredoxina de Colas et al. (Nature 380, 548-550 (1996)) dentro de los sitios de restricción en el marco de lectura abierto que codifica la estructura de la proteína STM. La unión de CDK a los aptámeros de péptido fue confirmada, in vivo e in vitro, usando selección de levadura-2-híbrida y espectroscopia de transferencia de energía resonante por fluorescencia (FRET), respectivamente.

De manera adecuada, la estructura es una estructura basada en estefina A, tal como STM.

- 35 De manera adecuada, la estructura es una estructura basada en tioredoxina, tal como TrxA.

El aptámero de péptido puede tener una afinidad para la quinasa dependiente de ciclina, especialmente cuando la quinasa dependiente de ciclina se selecciona de CDK2 y CDK4; la estructura unida a los aptámeros de péptido puede seleccionarse a partir de STM_{pep2} y STM_{pep9}. Sin embargo, será entendido por el experto en la técnica que la invención no se restringe al uso de estos dos aptámeros de péptido como moléculas sonda; de hecho los métodos
 40 para la fabricación de dispositivos para detectar interacciones moleculares así como los métodos para la detección y los métodos para la liberación controlada son generalmente aplicables y por tanto pueden usarse junto con un amplio rango de moléculas sonda. Además, la diana no estará limitada a las proteínas, sino que también incluirá otras sustancias tales como, inter alia, fármacos, explosivos, nanopartículas.

Los métodos convencionales para fabricar matrices de proteínas generalmente emplean técnicas de impresión por
 45 puntos, con resoluciones de alrededor de 0,1 mm. Aunque la resolución de estas técnicas de impresión ha mejorado en los últimos años, los tamaños característicos requeridos para matrices de proteínas de alta-densidad están más allá del alcance de dichos sistemas de impresión.

Es una ventaja particular de la presente invención que permite la funcionalización selectiva de electrodos
 50 individuales de una estructura de electrodo o de una estructura de matriz de electrodos con dimensiones más pequeñas que las que pueden lograrse mediante técnicas convencionales con moléculas sonda tales como aptámeros de péptido. La resolución del método descrito en la presente invención solo está limitada por la resolución de la estructura de electrodo o la estructura de matriz de electrodo. Por tanto, para este método particular, el distanciamiento preferido entre los electrodos individuales así como la densidad y el diámetro de los electrodos se describen anteriormente. En particular, se contemplan distanciamientos de 20 nm o menos, 10 nm o menos, o 5 nm
 55 o incluso menos. En algunas realizaciones, dichos pequeños distanciamientos son particularmente aplicables a aplicaciones con ácido nucleico tales como la funcionalización del(de los) electrodo(s) con DNA.

Aquí, la funcionalización selectiva de los micro-electrodos con diferentes aptámeros de moléculas sonda se logra a través del procedimiento de enmascaramiento molecular ilustrado en la FIG. 3. Las estructuras de electrodo o las

estructura de matriz de electrodos, preferiblemente que comprenden múltiples electrodos de Au, individualmente reconocibles, primero se revisten con moléculas de enmascaramiento (agente de enmascaramiento) que da como resultado una capa de enmascaramiento que previene de la unión no específica de moléculas sonda tales como aptámeros de péptido a la estructura del electrodo durante la funcionalización del electrodo. Las moléculas de enmascaramiento están preferiblemente modificadas con tiol para facilitar una inmovilización con orientación controlada y reversible sobre la superficie. Esta modificación con tiol no solo permite la formación espontánea de una monocapa molecular sobre los micro-electrodos de Au a través del puente Au—S sino que también proporciona un medio para eliminar la capa de enmascaramiento de cualquier micro-electrodo individual a través de la división, preferiblemente mediante medios electroquímicos, del puente Au—S.

10 A través de la descripción y las reivindicaciones de esta invención, será entendido por el experto en la técnica que el agente de enmascaramientos puede seleccionarse a partir de, pero sin limitación, uno o más de poli(etilenglicol) (PEG), cadenas de alcano, moléculas de cadenas mixtas de alcano-PEG, PEG modificados, tales como, PEG metil-terminados (mPEG), PEG derivatizados y otras moléculas que inhiben la adsorción de moléculas sonda a la superficie. También se entiende que las moléculas de enmascaramiento pueden tener que ser inmovilizadas, aunque no necesariamente, sobre la superficie en una etapa. Otra posibilidad es unir una capa molecular, preferiblemente formada a partir de moléculas tioladas y unir las preferiblemente a través de puentes formadores de oro-sulfuro, sobre los cuales las moléculas de enmascaramiento pueden unirse en una etapa posterior. Como ejemplo, una capa de moléculas hidroxil-terminadas puede adsorberse sobre los electrodos y en una etapa posterior, pueden unirse a esta capa moléculas mPEG funcionalizadas con silano.

20 La división electroquímica de enlaces oro-tiol es muy conocida en la técnica. La eliminación selectiva de la capa de enmascaramiento de un micro-electrodo individual se logra preferiblemente en una celda electroquímica de tres electrodos (que comprende uno o más electrodos de trabajo, uno o más contraelectrodos y uno o más electrodos de referencia), por ejemplo, aplicando un potencial electroquímico de $-1,4$ V vs Ag/AgCl durante 120 segundos usando un potenciostato (FIG. 3(b)). Sin embargo, pueden usarse también otros tipos de celdas electroquímicas, por ejemplo, celdas electroquímicas de dos electrodos (que comprenden uno o más electrodos de trabajo, y uno o más electrodos de trabajo). Se entiende bien por los expertos en la técnica que los parámetros electroquímicos dependen del medio ambiente (por ejemplo, del tampón) y por tanto el protocolo dado en la presente invención se proporciona solo como ejemplo.

30 Dado el pequeño distanciamiento entre los micro-electrodos, los campos eléctricos generados durante la desorción puede influir en el potencial electroquímico de los micro-electrodos vecinos, obstaculizando potencialmente la capa bloqueante. Para prevenir esto, mientras se permite la escalabilidad para incrementar geometrías de micro-electrodos más pequeñas, puede usarse un segundo potenciostato para mantener el potencial de los micro-electrodos vecinos a, por ejemplo, $-0,2$ V vs Ag/AgCl durante el proceso de desorción. Habiéndose desorbido la capa de enmascaramiento de un conjunto de electrodos particulares, el(los) micro-electrodo(s) desnudo(s) puede(n) ser funcionalizado(s) con la molécula sonda deseada, por ejemplo, un aptámero de péptido modificado con cisteína, mediante la explotación del grupo tiol para formar un puente Au—S, por ejemplo, mediante la incubación del dispositivo en una solución que contiene la molécula sonda toda la noche en un medio ambiente sellado y húmedo (FIG. 3(c)). La formación de los enlaces oro-tioles es muy conocida en la técnica y se entiende por los expertos en la técnica que los métodos descritos en la presente invención no serán limitados a ralentizar la adsorción de moléculas sobre la superficie para funcionalizarlas. En algunas realizaciones se prefiere permitir la adsorción pasiva pero en algunas realizaciones puede preferirse usar la adsorción activa, por ejemplo, mediante la aplicación de un potencial electroquímico a los electrodos o aplicar un campo eléctrico a las moléculas, inter alia. Este procedimiento puede repetirse para funcionalizar otros micro-electrodos con diferentes moléculas sonda (FIG. 3(d)).

45 Se puede necesitar que se introduzca una etapa adicional después de cada tiempo; un conjunto de micro-electrodos de la micro-matriz se funciona con una molécula sonda particular. Porque esta capa de molécula sonda tiene que servir de capa de enmascaramiento en cualesquiera etapas de funcionalización subsecuentes, debe ser posible parar otras moléculas sonda, a las que la micro-matriz se expone durante estas futuras etapas de funcionalización, de la unión a este particular micro-electrodo. Este no es necesariamente el caso para todas las moléculas sonda que pueden usarse con la presente invención y puede ser deseada una etapa de regeneración después de la adsorción de las moléculas sonda después de cada etapa de funcionalización de la molécula sonda. Dicha etapa de regeneración podría comprender, por ejemplo, la exposición de toda la micro-matriz a moléculas de enmascaramiento apropiadas (tales como mPEG-tioles (véase más abajo), preferiblemente usando las mismas condiciones que para la generación de la capa de enmascaramiento inicial).

55 Un modo alternativo de funcionalización de los diferentes micro-electrodos con diferentes moléculas sonda es una variación del método discutido anteriormente. Toda la matriz de micro-electrodos se reviste primero con la primera molécula sonda (PM1) usando la modificación con tiol de la molécula sonda como se describe anteriormente (por ejemplo, aptámeros de péptido modificados con cisteína), y posteriormente PM1 se libera de todos los micro-electrodos los cuales, en el dispositivo final, no deberían funcionalizarse con esta molécula sonda particular, mediante la rotura electroquímica del puente S—Au (véase más arriba). Como anteriormente, dado el pequeño distanciamiento entre los micro-electrodos, los campos eléctricos generados durante esta desorción pueden influir en el potencial electroquímico de micro-electrodos vecinos, perjudicando potencialmente a la capa de la molécula sonda en estos. Para prevenir esto, mientras se permite que la escalabilidad aumente las geometrías de los micro-

electrodos más pequeños, puede usarse un segundo potenciostato para mantener el potencial de los electrodos que no deberían ser desorbidos, por ejemplo, a $-0,2$ V vs Ag/AgCl para el proceso de desorción. En una segunda etapa, toda la micro-matriz se expone a una segunda molécula sonda (PM2) que se adsorbe sobre todos los electrodos que no contienen todavía una capa de otras moléculas sonda de las etapas previas (la moléculas sonda unidas a los micro-electrodos en las etapas previas sirven como capa de enmascaramiento para los electrodos particulares y por tanto previenen de la adsorción de otras moléculas sonda diferentes). Posteriormente, PM2 se libera de todos los electrodos que, en el dispositivo final, no deberían funcionalizarse con PM2, de nuevo mediante rotura electroquímica de los puentes Au—S. Obviamente, se omiten los micro-electrodos funcionalizados en las etapas previas del proceso de desorción electroquímica. Para prevenir cualquier impacto adverso debido a los potenciales de desorción aplicados a los electrodos vecinos, puede usarse un segundo potenciostato para mantener este potencial de micro-electrodos a, por ejemplo, $-0,2$ V vs Ag/AgCl durante el proceso de desorción. Este procedimiento puede repetirse para funcionalizar más los micro-electrodos con diferentes moléculas sonda.

Una etapa de regeneración opcional similar a la etapa opcional discutida anteriormente puede introducirse después de cada vez que la micro-matriz se funcionalice con moléculas sonda.

Es una ventaja particular de la presente invención que estos métodos de funcionalización puedan usarse para dispositivos de matriz con características de micrómetros, así como para dispositivos de matriz con características de nanómetros.

Detección/Lecturas

Una ventaja particular de la presente invención es que permite la detección electrónica sin marcador o la identificación de dianas biológicas o químicas mediante la detección de acontecimientos de (bio)reconocimiento que se dan entre proteínas-diana en solución y moléculas sonda inmovilizadas en las estructuras de electrodo o la estructura de matriz de electrodos que comprenden uno o más electrodos, preferiblemente a una alta-densidad. De manera adecuada, los métodos de la invención comprenden una detección sin marcador. De la manera más adecuada, la detección está basada en detectar un cambio de fase de la impedancia electroquímica como una función de la frecuencia. De manera adecuada, las medidas de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) $|Z(\omega)|$ y $\varphi(\omega)$ se determinan como una función de la frecuencia entre 0,1 Hz y 500 kHz.

La detección electrónica, sin marcador y en chip de las interacciones diana de la molécula sonda está basada en monitorizar los cambios locales en la impedancia de la capa doble electroquímica que forma anteriormente la superficie de un electrodo de metal cuando se sumerge en un electrolito. Cualquier perturbación de esta doble-capa, por ejemplo, por la unión de proteínas al electrodo, altera las propiedades eléctricas de la doble-capa. Por ejemplo, la impedancia eléctrica compleja $Z(\omega)$ que se determina a partir de la respuesta del sistema, es decir, la corriente electroquímica $I(\omega)$, bajo la aplicación de un potencial electroquímico ac φ de la frecuencia ω al electrodo, es una medida del grado al cual la transferencia de carga y del electrodo es impedida por las proteínas inmovilizadas en la superficie. Por lo tanto, $Z(\omega)$ depende de la densidad, espesor y estructura interna de la capa de proteína y cualquier alteración de esta capa, por ejemplo, la unión de una diana molecular, resulta potencialmente en un cambio medible de $Z(\omega)$. Los cambios en $Z(\omega)$ manifiestan por sí mismos como cambios de la impedancia absoluta $|Z(\omega)|$ y su fase $\varphi(\omega)$, es decir, la diferencia de fase entre φ y $I(\omega)$. Los inventores observan que aunque las escalas de $|Z(\omega)|$ con la superficie del electrodo, $\varphi(\omega)$ es independiente del área del electrodo y cambia en φ , $\Delta\varphi(\omega)$, proporcionan por lo tanto una medida fiable y reproducible de los cambios en las propiedades proteína-capa.

Una ventaja más ofrecida por la presente invención es que el método de detección de moléculas dianas es escalable. Generalmente, con espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) convencional la resistencia y/o la capacitancia es medida. Sin embargo, dicha medida tiene la desventaja de que la cantidad medida es proporcional al área de la superficie del electrodo. Un aspecto particular de la presente invención es que, inter alia, la fase de la impedancia electroquímica es independiente del área de la superficie y por tanto un cambio de fase debido a, por ejemplo, un acontecimiento de unión que ocurre entre la sonda y la molécula diana, es independiente del área de la superficie.

En otra realización de la presente invención, los inventores proporcionan un método como se describe anteriormente en este documento el cual comprende la medida de un desplazamiento de fase de la impedancia compleja mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) para detectar acontecimientos de unión que aparecen entre una molécula sonda y su diana respectiva.

En especímenes biológicamente más relevantes, las proteínas de interés solo se presentan en muy baja abundancia y en mezclas biológicas complejas. Es una ventaja particular de la presente invención que las proteínas en dichas soluciones pueden detectarse o identificarse, incluso si solo están presentes a muy bajas concentraciones.

Otra realización de la presente invención es que los electrodos de la estructura de electrodo o de la estructura de matriz de electrodos pueden ser funcionalizados con moléculas sonda que sean capaces de detectar cambios en bio-moléculas en muestras biológicas a partir de células u organismos que hayan sido tratados con un fármaco dado. Esto es particularmente útil para asegurar en ambos la posible eficacia o toxicidad de un fármaco y también

para determinar si un fármaco está trabajando en un paciente particular mediante la producción de una signatura típica de respuesta.

Otra realización de la presente invención es que las moléculas sonda son inmovilizadas sobre una superficie y en un aspecto particular de la presente invención, los inventores proporcionan un método para unir las moléculas sonda, reversiblemente a la superficie, lo que permite la liberación controlada de la moléculas sonda desde la superficie. El método está basado en el uso de una molécula sonda de liberación controlada, que es una molécula sonda a la que se ha modificado con un resto enlazante que se une reversiblemente a una superficie. La modificación con el resto enlazante de la molécula sonda puede lograrse tanto mediante la integración del resto enlazante directamente dentro de la molécula sonda como mediante su adición a la molécula sonda vía un enlazante. Se entiende bien por los expertos en la técnica que la molécula sonda de liberación controlada puede consistir en más de una parte y que no tiene que estar necesariamente unida al electrodo en una etapa, pero que puede igualmente estar bien ensamblada de sus partes individuales directamente sobre el electrodo. Sin embargo, el método preferido es ensamblar la molécula sonda de liberación controlada, es decir, modificarla con un resto enlazante, primero, y después inmovilizarla sobre la superficie en una etapa posterior.

En una realización particular de la presente invención la molécula sonda de liberación controlada se modifica con un tiol y preferiblemente el tiol está afectado a través de un resto cisteína.

El puente S—Au con el que la molécula sonda de liberación controlada está unida a los electrodos de la matriz está electroquímicamente activo del mismo modo que los puentes tiol-Au de las moléculas de enmascaramiento usadas en el proceso de funcionalización selectiva. Esto ofrece la única ventaja de que estos puentes pueden dividirse en los electrodos seleccionados solo y por tanto las moléculas sonda son liberadas de nuevo al electrolito circundante (por ejemplo, un tampón para proteínas). Esto puede hacerse obviamente después de la unión a la diana (por ejemplo, a partir de un lisado celular) y, por tanto, la sonda más la diana pueden ser liberadas, permitiendo la posterior identificación de la diana, por ejemplo, por espectrometría de masas.

En una realización particular de la presente invención, los inventores describen un método para investigaciones altamente paralelas de las diferencias entre dos o más tipos de células, por ejemplo, entre células sanas y cancerígenas. Una matriz de aptámero de péptido con múltiples electrodos funcionalizados individualmente controlables con diferentes aptámeros de péptido puede ser fabricada y la respuesta del lisado de una célula cancerígena ser comparada con la respuesta de una segunda matriz idéntica a la exposición al lisado de una célula sana. Las proteínas sobre los electrodos de las matrices donde la respuesta es diferente (en un modo positivo o negativo) pueden ser liberadas fuera del electrodo y las proteínas liberadas incluyendo las dianas unidas pueden recogerse y analizarse. Las actuales tecnologías no ofrecen esta opción y el análisis de dichos sistemas puede probar que son de gran importancia en la diagnosis, el descubrimiento de nuevos biomarcadores o dianas de fármacos de marcadores de tratamientos experimentales con eficacia clínica y en el desarrollo de fármacos, por ejemplo.

Un aspecto particular de la presente invención es un método para la liberación controlada de moléculas dianas mediante medios eléctricos. Se sabe que muchas moléculas biológicas alteran su conformación bastante drásticamente cuando se exponen a campos eléctricos AC o DC. Por ejemplo, las moléculas de ADN inmovilizadas en superficies cambian de una conformación enrollada aleatoria a una conformación elongada cuando se aplican campos eléctricos de varios cientos de kV/m a frecuencias de alrededor de 300 kHz.

Se describe un método para liberar la molécula diana capturada fuera de una molécula sonda inmovilizada sobre una superficie del electrodo. Se entiende bien por los expertos en la técnica que este electrodo no está limitado a ser un solo electrodo aislado, sino que puede ser, por ejemplo, también un conjunto de electrodos o ser parte de una micro-matriz. Las realizaciones descritas de aquí en adelante en este documento de la invención se describen a modo de ejemplo usando aptámeros de péptido como moléculas sonda. Sin embargo, se entiende bien por los expertos en la técnica que la invención no se restringe a aptámeros de péptido y que puede usarse junto con otras moléculas sonda también. Cuando se aplica un campo eléctrico a un aptámero de péptido, el campo eléctrico causa un cambio conformacional en la estructura. Este cambio conformacional de la estructura a su vez altera la conformación del inserto de péptido del aptámero de péptido, ya que la conformación tri-dimensional del inserto de péptido está parcialmente gobernado por la limitación aplicada por la estructura. La afinidad de la unión diana-sonda cambia drásticamente bajo un cambio conformacional de la estructura y así el inserto de péptido y la molécula diana se libera.

Es una ventaja particular de la presente invención que los inventores proporcionan un método electrónico, no destructivo para una liberación controlada que comprende un dispositivo con formato de matriz y aptámeros de péptido.

Los inventores describen un método para identificar a pacientes o especímenes patológicos donde un fármaco particular se une a una molécula diana que está ausente en una muestra normal del mismo paciente o de otro control apropiado. Las estructuras de electrodo o la estructura de matriz de electrodos se funcionalizan con pequeños compuestos químicos que son fármacos candidatos y la respuesta de los pacientes o de los especímenes patológicos se compara con el control apropiado. Los complejos diana unidos a fármacos candidatos en los

- electrodos donde la respuesta al espécimen y el control es diferente (en un modo positivo o negativo) pueden ser liberados fuera del electrodo. Por tanto, pueden usarse moléculas de fármaco candidato de liberación controlada inmovilizadas sobre las estructuras de electrodo o la estructura de matriz de electrodos para identificar a pacientes o especímenes patológicos donde un fármaco particular se une a una molécula diana que está ausente en una muestra normal del mismo paciente o de otro control apropiado. Esto permitiría la identificación de bio-moléculas cuya función está siendo afectada por el tratamiento farmacológico, revolucionando potencialmente los esfuerzos de la química medicinal y de la optimización de fármacos.
- En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras “comprenden” y “contienen” y las variaciones de estas palabras, por ejemplo, “que comprenden” y “comprende”, significan “incluyendo pero no limitado”, y no se pretende (y no se hace) que excluya a otros restos, aditivos, componentes, números enteros o etapas.
- En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra “inmovilizar” y las variaciones de la palabra, por ejemplo, “inmovilizando”, significa “unir un resto a una superficie usando un enlazante específico”.
- En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca al plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la memoria descriptiva tiene que entenderse como que contempla la pluralidad así como la singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.
- Las características, números enteros, tipologías, compuestos, restos químicos o grupos descritos con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención tienen que entenderse que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en este documento a menos que sea incompatible con este.
- En algunas realizaciones preferiblemente la estructura no es STM.
- En algunas realizaciones preferiblemente la estructura no es TrxA.
- En todavía un aspecto más de la invención, los inventores proporcionan un dispositivo de matriz para la detección o identificación de una proteína o múltiples proteínas a partir de una muestra individual. Los inventores demuestran un nuevo enfoque para una matriz de proteínas electrónica y de alta-densidad capaz de detectar proteínas en mezclas biológicas complejas a concentraciones muy bajas. La matriz de proteínas de los inventores emplea aptámeros de péptido como moléculas sonda, seleccionadas in vivo con afinidades específicas altas y muy altas para proteínas expresadas en eucariotas. La transducción electrónica de acontecimientos de bioreconocimiento se logra mediante la monitorización de los cambios en las características de impedancia complejas de una película de proteínas unida a una matriz de electrodos microfabricados y los inventores usan esta estrategia para sondear las interacciones entre las proteínas sonda inmovilizadas en la superficie y las proteínas diana en solución. Además, los inventores demuestran esta técnica usando una estructura de matriz con características de tamaños de un orden de magnitud más pequeño que la disponible con matrices de proteínas convencionales y que pueden ser selectivamente funcionalizadas con diferentes secuencias peptídicas usando un nuevo proceso de enmascaramiento molecular. El uso de aptámeros de péptido robustos y seleccionados in vivo y la naturaleza electrónica de la detección sin marcador, acoplado a la escalabilidad de la funcionalización del electrodo y la fabricación, proporciona el potencial para la detección creciente de áreas pequeñas y mayores sensibilidades.
- Será entendido por el experto en la técnica que los métodos que se describen en este documento para matrices de proteínas son aplicables a otros métodos o dispositivos para la detección o identificación de dianas biológicas o químicas usando moléculas sonda inmovilizadas sobre una superficie. Por tanto, los métodos y dispositivos de esta invención no se limitaran a la detección o la identificación de proteínas usando una matriz de proteína pero serán también adecuados para la detección o la identificación de dianas usando moléculas sonda alternativa.
- La descripción de forma ventajosa proporciona métodos de detección de polipéptidos compatibles con formatos de matriz de alta densidad ofreciendo una mayor especificidad, eficiencia y precisión. Dichos métodos de forma ventajosa abarcan la detección del marcador libre.
- Otra realización relaciona un método de detección de dianas biológicas o químicas o la identificación que comprende el uso de una o más moléculas sonda inmovilizadas sobre una estructura de electrodo que comprende uno o más electrodos.
- La muestra que se analiza puede ser una mezcla compleja tal como una mezcla biológica. La muestra puede seleccionarse a partir de un lisado celular, sangre, suero, orina, esputos, secreción del pezón y saliva.
- Una ventaja es que la invención puede detectar la diana incluso cuando tiene una abundancia de menos de 100 mg/ml, o menos de 100 µg/ml, o menos de 10 µg/ml, o menos de 1 µg/ml, o menos de 100 ng/ml, o menos de 10 ng/ml, o menos de 1 ng/ml, o menos de 100 pg/ml, o menos de 10 pg/ml, o menos de 1 pg/ml.
- La estructura del electrodo puede ser un formato de estructura de matriz de una matriz de electrodos. De manera adecuada, la estructura de matriz de electrodos comprende uno o más electrodos individualmente controlables.

De manera adecuada, la matriz tiene una densidad de electrodos de más de $10^4/\text{cm}^2$, de manera adecuada, más de $10^6/\text{cm}^2$, de manera adecuada, más de $10^8/\text{cm}^2$, de manera adecuada, más de $10^{10}/\text{cm}^2$.

De manera adecuada, el dispositivo de matriz de electrodos consiste en diez electrodos de Au individualmente controlables.

- 5 De manera adecuada, el electrodo o los electrodos se sumergen en un electrolito y la detección está basada en los cambios en el medio ambiente de la(s) interfase(s) entre electrodo/electrolito o electrodos/electrolito.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de electrodos individuales de funcionalización selectiva de una estructura de electrodo o estructura de matriz de electrodos con diferentes moléculas sondas en donde la molécula sonda se selecciona entre uno o más de un aptámero de péptido, un reactivo de reconocimiento presentado en el contexto de otra estructura de proteína genéticamente modificada, un aptámero de ADN, un aptámero de ARN, una entidad química, una entidad química con potencial valor terapéutico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un anticuerpo. De manera adecuada, la selectividad se produce mediante el enmascaramiento molecular. De manera adecuada, el agente de enmascaramiento molecular se une reversiblemente a los electrodos de la estructura de 20 electrodos o la estructura de matriz de electrodos. De manera adecuada, el agente de enmascaramiento molecular es una molécula tiolada o un complejo tiolado. De manera adecuada, el agente de enmascaramiento molecular es o contiene poli(etilen-glicol) (PEG). De manera adecuada, el PEG es un PEG derivatizado. De manera adecuada, el PEG es un PEG tiolado. De manera adecuada, el PEG tiene una terminación de metilo. De manera adecuada, el PEG es un poli(etilen-glicol)6-tiol con una terminación de metilo. De manera adecuada, el agente de enmascaramiento molecular es o contiene una cadena de alcano. De manera adecuada, la cadena de alcano está tiolada. De manera adecuada, el agente de enmascaramiento puede ser un complejo compuesto de dos o más moléculas; en esta realización, de manera adecuada, una de las moléculas del complejo es una molécula tiolada y la otra u otras se unen a esta; en esta realización, de manera adecuada, la molécula tiolada del complejo se une a la primera superficie y las otras se unen posteriormente a la molécula tiolada unida a la superficie.

El enmascaramiento molecular puede liberarse del electrodo mediante la aplicación de una señal electrónica al electrodo, por ejemplo, mediante la división electroquímica de un enlace tiol. Mediante esto, un electrodo vecino al electrodo que se une al agente de enmascaramiento molecular que se libera se protege mediante un potencial constante a un nivel donde la reacción inducida por la liberación no pase. Típicamente, un potencial electroquímico de entre $-0,9\text{ V}$ y $-1,5\text{ V}$ vs Ag/AgCl se aplica para lograr esto.

El electrodo puede ser cualquier material conductor, tal como carbón o un metal. El metal del electrodo de metal(es) es, de manera adecuada, seleccionado a partir de oro, plata, platino, paladio, titanio, níquel y cobre.

Puede usarse un sonda redox tal como la sonda redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$. El electrolito puede consistir en un tampón y en una sonda redox.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de detección de dianas o identificación que comprende la medida de un desplazamiento de fase de la impedancia electroquímica y el uso de un aptámero de péptido seleccionado in vivo.

La invención será a continuación descrita mediante ejemplos con referencia a los dibujos que acompañan. Con estos ejemplos se pretende ser ilustrativos y no pretender limitar la invención como se define en las reivindicaciones añadidas.

Breve descripción de las figuras

40 La FIG. 1(a) es un diagrama esquemático del complejo STM_{pep9} -CDK2 inmovilizado sobre una superficie de oro vía la conjugación entre el resto de cisteína (grupo S) y el Au;

La FIG. 1(b) muestra el incremento en tiempo real en masa después de la inmovilización de STM_{pep9} y STM en dos guías de onda funcionalizadas independientes de maleimida y después la posterior exposición al CDK2 recombinante;

45 La FIG. 1(c) ilustra los datos de EIE $\phi(\omega)$ para una superficie de Au funcionalizada con STM_{pep9} y después la exposición al CDK2 recombinante;

La FIG. 1(d) es igual que la FIG. 1(c) pero después de la exposición de STM al CDK2 recombinante; y

La FIG. 1(e) ilustra el cambio en $\phi(\omega)$ de STM_{pep9} y la capa de STM formada en dos electrodos de Au independientes después de la exposición al CDK2 recombinante.

50 La FIG. 2(a) ilustra los datos de EIE $\phi(\omega)$ para una superficie de Au funcionalizada con STM_{pep9} y después de la exposición al lisado de levadura que expresa CDK2;

La FIG. 2(b) es igual que la FIG. 2(a) pero después de la exposición de STM_{pep9} a un lisado de CDK sin levadura; y

La FIG. 2(c) ilustra el $\Delta\phi(\omega)$ de STM_{pep9} formado en electrodos independientes después de la exposición a un lisado de levadura que expresa CDK2 y un lisado sin CDK2 y el $\Delta\phi(\omega)$ de la capa de STM después de la exposición al lisado de levadura que expresa CDK2.

5 La FIG. 2(d) muestra la dependencia de la concentración del desplazamiento de fase a 70 Hz. Línea ajustada a $y=3,9340 \log x+6,684$.

La FIG. 3 es un conjunto de diagramas esquemáticos que muestran el uso de un enmascaramiento molecular para la funcionalización selectiva de una matriz de micro-electrodos:

FIG. 3(a) de todos los electrodos son inicialmente protegidos de la funcionalización mediante una monocapa de mPEG que inhibe a las proteínas;

10 FIG. 3(b) el enmascaramiento molecular puede ser liberado mediante medios electroquímicos;

FIG. 3(c) la micro-superficie de Au desnuda del electrodo se funcionaliza posteriormente con la proteína requerida;

FIG. 3(d) mediante la repetición de este ciclo es posible funcionalizar independientemente múltiples electrodos dentro de un dispositivo individual; y

15 FIG. 3(e) la formación de un complejo proteína-proteína, que aparece después de la exposición a una solución del complejo biológico, resulta en un desplazamiento medible en $\phi(\omega)$ (electrodo central).

La FIG. 4(a) es un voltamograma cíclico de un micro-electrodo individual protegido con la capa que inhibe el mPEG, después de la desorción electroquímica de la monocapa de mPEG y después de la funcionalización con el aptámero de péptido STM_{pep2} ;

20 La FIG. 4(b) es un análisis FRET de STM_{pep2} , STM_{pep9} y STM bajo la exposición al lisado libre de CDK2, CDK4 y CDK;

FIG. 4(c) $\Delta\phi(\omega)$ de la impedancia del complejo para micro-electrodos funcionalizados con mPEG-, STM_{pep2} y STM_{pep9} después de la exposición a un lisado que contiene CDK2;

La FIG. 4(d) es igual que la FIG. 4(c) pero después de la exposición al lisado celular que contiene CDK4.

La FIG. 5 muestra un diagrama.

25 Ejemplo 1

Dos diferentes aptámeros de péptido fueron empleados expuestos mediante STM modificada con cisteína con afinidades para quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2) y CDK4. Ambas CDK2 y CDK4 pertenecen a un grupo de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular; están funcionalmente relacionadas, comparten todavía menos del 50% de identidad de secuencia. Los dos aptámeros de péptido que interaccionan con CDK (denominados STM_{pep2} y STM_{pep9} , donde los subíndices pep2 y pep9 se refieren a dos secuencias peptídicas diferentes) fueron generados mediante la inserción de oligonucleótidos que codifican la secuencia peptídica que interacciona con CDK derivada de los aptámeros de péptido basados en tioredoxina de Colas et al. dentro de los sitios de restricción en el marco de lectura abierto que codifica la estructura de la proteína STM. La unión de CDK a los aptámeros de péptido fue confirmada, in vivo e in vitro, usando selección de levadura-2-híbrida y espectroscopia de transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), respectivamente.

Aunque la región del inserto de péptido se predice que está lejos de la superficie cuando la estructura STM se une al electrodo vía el resto cisteína, los inventores confirmaron que no hay un impacto adverso en el comportamiento del aptámero del péptido causado mediante las interacciones superficie-proteína.

30 La unión y funcionalidad del STM_{pep9} inmovilizado en la superficie fueron inicialmente caracterizadas usando interferometría de polarización dual (DPI). Brevemente, la DPI es un método para caracterizar películas moleculares delgadas, basado en la detección de modelos de interferencia que resultan de la propagación de luz láser coherente junto con dos guías de onda ópticas independientes. La interacción de la onda evanescente con una capa molecular unida directamente sobre una de las guías de onda influye en la propagación a través de la guía de onda que resulta en un desplazamiento en el modelo de interferencias observado. Mediante la detección de estos cambios en dos diferentes polarizaciones ópticas, pueden detectarse cambios de espesor en sub-Ångstrom en las capas así como cambios de masa de sub-pg/mm².

45 Los experimentos se realizaron usando un Farfield Analight Bio200. Todos los experimentos y muestras fueron preparados en PBS, pH 7. La inmovilización de la proteína modificada con cisteína sobre la superficie de la guía de onda de oxinitruro de silicio fue lograda usando un contra-enlazante de maleimida homobifuncional para la conjugación entre los grupos cisteína y sulfhidrilo en una superficie de la guía de onda tiol-funcionalizada.

50

Después de la inmovilización, la capa de STM_{pep9} fue expuesta a 150 μ l de CDK2 purificado recombinante (30 μ g/ml en PBS) expresado en *E. coli*. Para confirmar la unión específica entre el STM_{pep9} y el CDK2, una segunda guía de onda funcionalizada con proteína STM modificada con cisteína pero sin ningún inserto de aptámero de péptido fue expuesta simultáneamente al CDK2 recombinante.

5 La FIG. 1 (b) muestra el incremento en tiempo real en masa que resulta de la inmovilización del STM_{pep9} y STM sobre las dos ondas de guía funcionalizadas con maleimida y después de una posterior exposición a CDK2. Mientras que la masa de material inmovilizado es similar para ambos STM_{pep9} y STM, solo la guía de onda funcionalizada con STM_{pep9} mostró un incremento significativo en la masa bajo la exposición a CDK2. Estos resultados demuestran que los aptámeros, basados en STM del péptido modificado con un grupo cisteína e inmovilizados sobre la superficie usando esta modificación de cisteína, son todavía funcionales y que pueden usarse en un medio ambiente del tipo matriz.

15 Las medidas en los mismos aptámeros del sistema péptido-CDK2 fueron llevadas a cabo en un dispositivo tipo chip usando espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). Las medidas de EIE, donde $|Z(\omega)|$ y $(\phi(\omega))$ son determinados como una función de la frecuencia entre 0,1 Hz y 500 kHz, se realizaron usando una celda electroquímica de tres electrodos personalizada (electrodo de Pt común, electrodo de trabajo de Au y electrodo de referencia de Ag/AgCl) y un bipotenciostato/espectrómetro de impedancia de Princeton Applied Research VSP en un electrodo común a la configuración de tierra. El electrolito consistió en tampón fosfato 100 mM, pH 7,7, que contiene la sonda redox de $K_3Fe(CN)_6^{4-/3-}$, 10 mM. Todos los potenciales electroquímicos se miden contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Los electrodos de trabajo de oro fueron funcionalizados con aptámeros de péptido (aquí tanto STM_{pep9} como STM) mediante la exposición del electrodo a 35 μ l de proteína en un tampón PBS, pH 7, durante 18 horas a temperatura ambiente. Los dispositivos fueron expuestos posteriormente a 45 μ l de una solución que contiene aproximadamente 200 ng/ μ l de CDK2 recombinante y purificado expresado en *E. coli*. Después de la exposición, los dispositivos fueron aclarados con agua desionizada (18,2 Ω cm, Millipore) para eliminar cualquier exceso de CDK2.

25 Las FIG. 1(c) y (d) muestran la fase medida de la impedancia del complejo, ϕ , para STM_{pep9} y STM, respectivamente, tanto antes como después de exponer el sistema a CDK2 recombinante. Un desplazamiento en ϕ se observa bajo la unión de CDK2 a STM_{pep9} , mientras que no se detectó ningún cambio en el caso del STM. Este desplazamiento es más obvio cuando se representa la diferencia de fase, $\Delta\phi$, antes y después de la exposición a CDK2 (FIG. 1(e)). Mientras no se observa ningún cambio en ϕ para STM, un máximo pronunciado se mide para STM_{pep9} . Estos resultados demuestran que un cambio de fase proporciona un medio útil para detectar la unión de las dianas a las moléculas sondas.

Ejemplo 2

35 Para evaluar la adecuación de la estrategia de detección de los inventores para la detección de proteínas en especímenes biológicamente relevantes, en los que las proteínas de interés están presentes solo a muy baja abundancia y en mezclas de complejos, los inventores prepararon electrodos de Au funcionalizados con STM_{pep9} y STM. Estos fueron entonces expuestos a 35 μ l de una solución que contiene una mezcla de productos celulares, incluyendo CDK2, generado mediante lisis (disolución) de células de levadura que expresan CDK2. El uso de un lisado no solo permite a los inventores confirmar la especificidad del aptámero STM_{pep9} para unirse de CDK2, sino que también permite a los inventores evaluar su dispositivo de detección usando una muestra del complejo biológico que imita muy de cerca a aquellas usadas en la diagnosis médica típica. Después de la exposición al lisado de levadura, los dispositivos se lavaron extensivamente para eliminar cualquier material unido no específicamente.

45 Las fases ϕ de las impedancias del complejo medidas para los diferentes dispositivos se muestran en la FIG. 2. Aunque se observe un desplazamiento distinto en $\phi(\omega)$ entre 1 y 103 Hz para el STM_{pep9} expuesto al lisado de CDK2 (FIG. 2(a)), la fase para STM expuesta al lisado no cambia a través del intervalo de frecuencia investigado. De nuevo, este desplazamiento de fase puede observarse más claramente en la FIG. 2(c) que representa el cambio absoluto en la fase después de la exposición de los electrodos funcionalizados con STM_{pep9} y STM al lisado de levadura que expresa CDK2. La magnitud del $\Delta\phi$ para el lisado de STM_{pep9} -CDK2 alcanza un máximo de aproximadamente 12° a una frecuencia de impulso de 300 Hz. Dado que STM_{pep9} y STM difieren solo en presencia (ausencia) del inserto del aptámero de péptido, la varianza drástica en las características de impedancia después de la exposición al CDK2 debe relacionarse con una interacción con STM9 a través de la región del aptámero (es decir, el inserto del péptido). Para confirmar que esta interacción se relaciona con la formación del complejo CDK2- STM_{pep9} , más que con la unión con otras especies contenidas dentro del lisado, los inventores expusieron una serie de electrodos funcionalizados con STM_{pep9} a un lisado generado a partir de células de levadura idénticas, pero que carecen de la expresión de CDK2 (FIG. 2(b)). La ausencia de un desplazamiento en la fase, después de la exposición a este lisado de CDK2 sin levadura (véase la FIG. 2(c)), confirma la afinidad del STM_{pep9} a CDK2, de acuerdo con los datos de DPI. Las proteínas cebo, tales como CDK2, se expresan típicamente alrededor de 10^2 - 10^4 moléculas por célula, dando una concentración máxima estimada de CDK2 en el lisado de levadura de 15 ng/ml (440 pM), que está en el intervalo clínicamente relevante. La baja concentración de la proteína diana y las muestras altamente contaminadas son típicas de muchos especímenes biológicos y estos resultados demuestran la capacidad del sensor de los inventores de detectar sin ambigüedad la unión diana-aptámero a partir de tales muestras.

Ejemplo 3

Fueron fabricados dispositivos de matriz de electrodo que consistían en diez micro-electrodos de Au individualmente controlables separados por 15 μm , sobre sustratos de sílice <100> n-dopados terminados con un óxido térmico de 500 nm usando un proceso de resistencia a la bi-capa. Los electrodos tenían una achura de 20 μm . Después de la fabricación, cada dispositivo fue montado en un paquete de cabecera y los cables fueron unidos para proporcionar la conexión eléctrica a cada micro-electrodo. Para demostrar la adecuación de la técnica de los inventores para la detección de formatos de matriz, los inventores funcionalizaron diferentes electrodos muy cercanos de la matriz con dos diferentes aptámeros de péptido, STM_{pep9} y STM_{pep2} .

La funcionalización selectiva de los micro-electrodos fue lograda a través de un procedimiento de enmascaramiento molecular ilustrado en la FIG. 3. Después de la fabricación de las matrices de electrodo, los dispositivos fueron sumergidos en una solución etanólica de poli(etilen-glicol)6-tiol metil-terminado 10 mM (mPEG, Polipure, Noruega) durante 96 horas (FIG. 3(a)). Esta capa de mPEG previene la unión no específica de proteínas durante la funcionalización del electrodo. La modificación con el tiol del mPEG no solo permite la formación espontánea de una monocapa molecular sobre el micro-electrodo de Au a través del puente Au—S sino que también proporciona un medio para la eliminación de la capa de enmascaramiento de un electrodo individual solo a través de la división reductora del puente de Au—S. La calidad de las capas de mPEG resultantes fueron verificadas usando medidas del ángulo de contacto en agua y espectroscopia de foto-electrón de rayos X, y la eficacia de la inhibición de la proteína fue confirmada mediante espectroscopia fluorescente. Después de la formación de la capa mPEG, los chips fueron enjuagados durante 1 hora en agua desionizada para eliminar el etanol residual y formar una capa de agua alrededor del PEG, lo que se piensa que es crucial para inhibir la unión de la proteína.

La eliminación reductora selectiva del enmascaramiento molecular de mPEG a partir de un electrodo individual fue realizada mediante la aplicación de un potencial electroquímico de $-1,4\text{ V}$ vs Ag/AgCl durante 120 segundos usando un bipotenciostato y condiciones de tampón idénticas a las usadas en las medidas EIE (FIG. 3(b)). Debido al pequeño distanciamiento entre los micro-electrodos, los campos eléctricos generados durante la desorción pueden influir en el potencial electroquímico de los electrodos vecinos, interrumpiendo potencialmente a la capa bloqueante. Para prevenir esto, mientras se permite que la escalabilidad incremente geometrías de micro-electrodo pequeñas, un segundo potenciostato se usó para mantener el potencial de los electrodos vecinos a $-0,2\text{ V}$ vs Ag/AgCl durante el proceso de desorción. La eficacia de la desorción se monitoriza con voltametría cíclica (véase la FIG. 4 (a)). Después de la desorción, la separación del máximo en los voltamogramas se ve que decrece desde 425 mV a 100 mV, típico de una superficie de Au con esta sonda redox. Habiendo desorbido el enmascaramiento molecular mPEG, el micro-electrodo de Au desnudo puede ser funcionalizado con la proteína deseada mediante la incubación del dispositivo en 35 μl de solución de proteína toda la noche en un medio ambiente sellado y húmedo (FIG. 3(c)). La adsorción de la proteína y la eficacia de las monocapas mPEG para la deposición del enmascaramiento sobre los micro-electrodos protegidos se confirman usando voltametría cíclica y EIE. Este procedimiento ha sido repetido para funcionalizar un segundo electrodo con diferentes proteínas (FIG. 3(d)).

El análisis FRET confirmó que tanto STM_{pep9} como STM_{pep2} muestran una afinidad para CDK2, mientras que solo STM_{pep9} mostró una afinidad para CDK4 (véase la FIG. 4(b)). Los inventores explotan esta diferencia en la funcionalidad para demostrar la capacidad del sensor de discriminar entre los acontecimientos de unión que aparecen en micro-electrodos diferentemente funcionalizados, fabricados en un dispositivo individual y, por tanto, en los electrodos individuales funcionalizados de los inventores de las matrices con los dos diferentes aptámeros de péptido, STM_{pep9} y STM_{pep2} . Para demostrar las capacidades del dispositivo de matriz de los inventores, dos dispositivos idénticos nominalmente y separados fueron fabricados y funcionalizados y expuestos al lisado que expresa CDK2 y CDK4 (que contiene menos de 15 ng/ml de CDK), respectivamente. Los resultados de EIE de este estudio se muestran en la FIG. 4(c) y (d). Se observan desplazamientos en $\phi(\omega)$ para ambos micro-electrodos funcionalizados con STM_{pep9} y el STM_{pep2} después de la exposición al lisado de levadura que expresa CDK2. Por el contrario, bajo la exposición al lisado de levadura que expresa CDK4, solo fu observado un desplazamiento en ϕ de similar magnitud para los micro-electrodos funcionalizados con STM_{pep9} .

Estos resultados demuestran que los inventores pueden funcionalizar con éxito electrodos individuales y distanciados en μm dentro de una matriz con proteínas individuales y que el método de detección electrónico y sin marcador de los inventores puede detectar con éxito proteínas a muy bajas concentraciones. Además, los claros desplazamientos en ϕ indican la formación de complejos CDK2/CDK4- STM_{pep9} y CDK2- STM_{pep2} , de acuerdo con el análisis FRET. La carencia de respuesta después de la exposición de micro-electrodos funcionalizados con STM_{pep2} a CDK4 indica la alta selectividad del proceso de funcionalización. En todos los casos, ϕ permaneció constante para aquellos micro-electrodos que permanecieron cubiertos con mPEG, confirmando la eficacia de la capa que inhibe al mPEG.

Ejemplo 4

Para determinar la dependencia de la concentración del desplazamiento de fase, $\Delta\phi(c)$, fueron funcionalizados electrodos de oro con STM_{pep9} y fueron expuestos a 50 μl de tampón fosfato que contenía diversas concentraciones de CDK2 purificado y baculoviral entre 25 pM y 100 nM. Los electrodos fueron aclarados posteriormente en tampón fosfato para eliminar cualquier exceso de CDK2 antes de que $\phi(\omega)$ fuera medido. Los resultados se muestran en la

FIG. 2(d) a partir de donde un límite de sensibilidad de esta configuración de alrededor de 50 pM ($\approx 1,5$ ng/ml de CDK2) puede determinarse, lo que está en el intervalo clínico relevante. El desplazamiento de fase es lineal en una concentración a escala logarítmica sobre al menos órdenes de magnitud. La línea oscura en la FIG. 2(d) representa un ajuste lineal a los datos.

5 Ejemplo 5

Una disposición ejemplar que los inventores han demostrado con características ventajosamente pequeñas comprende 10 electrodos de metal, divididos en dos grupos de cinco. Cada electrodo tiene una anchura de 20 micras con una separación entre los electrodos adyacentes, tanto en las direcciones x como en el plano, de 15 micras. Los electrodos tienen forma de puntos (véase la FIG. 5, que muestra parte de la matriz de 10 electrodos) y no están alrededor, de modo que el 'diámetro' significa la mayor dimensión perpendicular al plano de protrusión. Los electrodos se extienden sobre la superficie del sustrato para provocar el contacto eléctrico desde el exterior.

En otra realización, los electrodos pueden colocarse verticalmente a través de la superficie para producir una matriz 2D de píxeles en el plano de la superficie.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la unión de una entidad a una molécula, estando dicha molécula unida a una superficie, siendo dicha superficie eléctricamente conductora, en donde el método comprende:
- monitorizar la fase de la impedancia electroquímica a dicha superficie como una función de la frecuencia, y
- 5 detectar el cambio como una función de la frecuencia en la fase monitorizada en la impedancia electroquímica a dicha superficie como una función de la frecuencia que indica la unión de dicha entidad a dicha molécula, teniendo dicho cambio una dependencia con la concentración de dicha entidad.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase se monitoriza como una función de la frecuencia entre 0,1 Hz y 500 kHz.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la superficie comprende un electrodo.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho electrodo comprende metales.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula comprende un polipéptido.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho método comprende además:
- 15 (a) proporcionar una matriz que comprenda al menos dos electrodos, en donde dichos electrodos tienen uno o más de:
- (i) un diámetro de 100 μm o menos, y
- (ii) un distanciamiento de 100 μm o menos; y
- 20 (b) unir dicho polipéptido a al menos un electrodo de dicha matriz mediante la cual se forma dicha superficie.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha matriz comprende al menos 10 electrodos individualmente controlables.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en donde dichos electrodos tienen uno o más de:
- (i) un diámetro de 20 μm o menos, y
- 25 (ii) un distanciamiento de 15 μm o menos.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 8, en donde dichos electrodos tienen ambos (i) e (ii).
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde dicho polipéptido comprende una proteína estructural.
- 30 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde el polipéptido comprende un aptámero de péptido.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde dicho polipéptido se une a dicho electrodo mediante un enlace tiol.
- 35 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula comprende ADN u otro ácido nucleico.

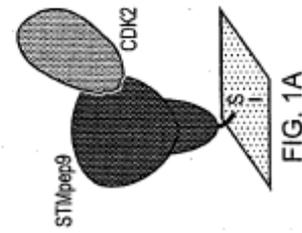


FIG. 1A

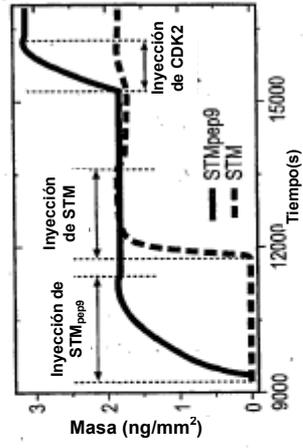


FIG. 1B

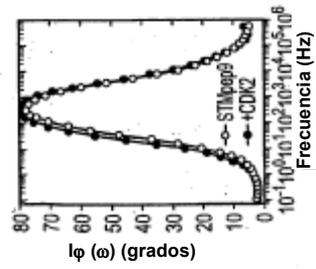


FIG. 1C

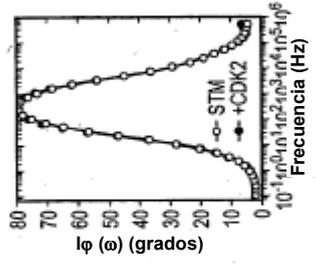


FIG. 1D

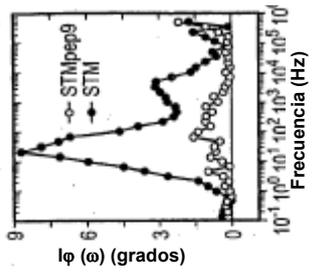
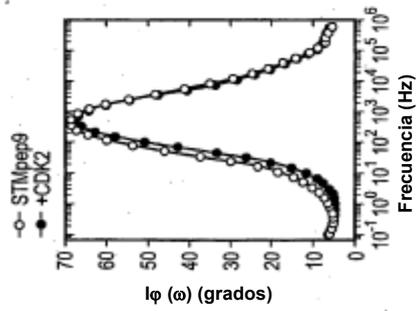
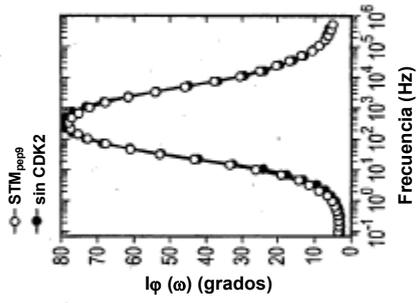
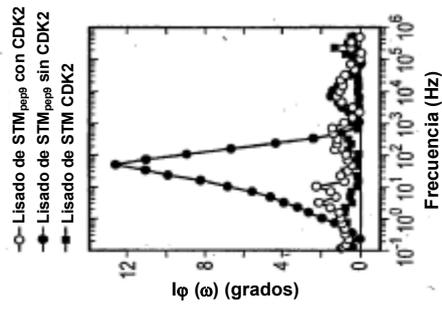


FIG. 1E



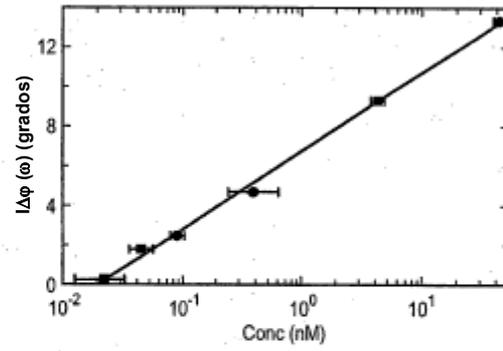


FIG. 2D

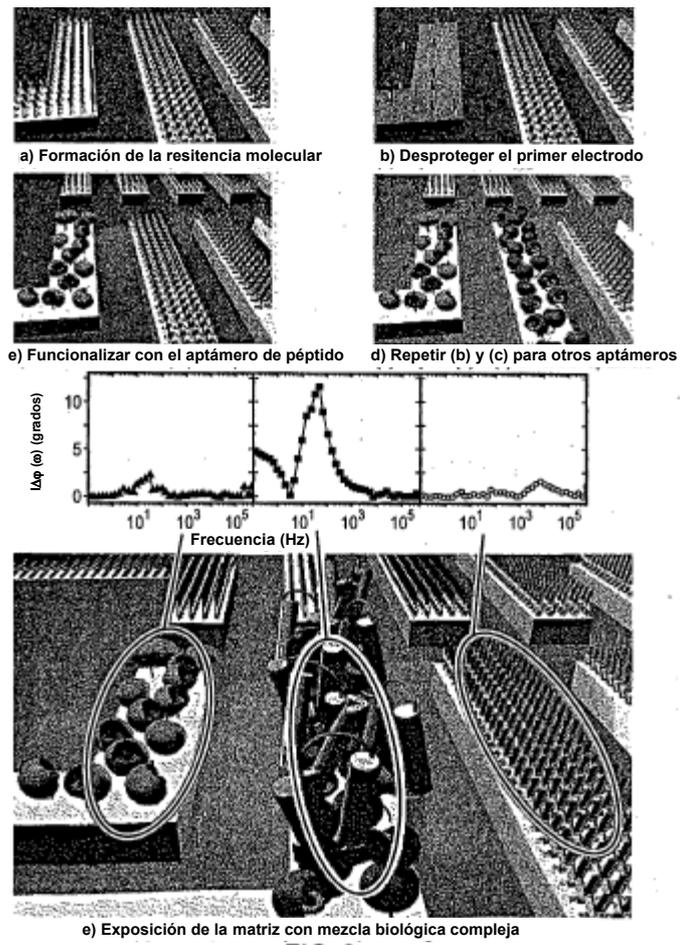


FIG. 3

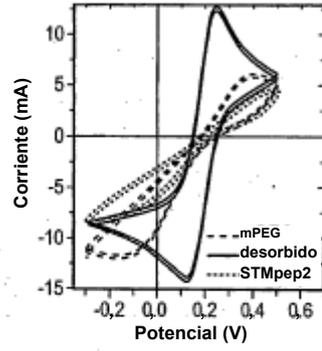


FIG. 4A

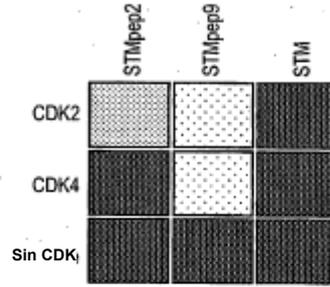


FIG. 4B

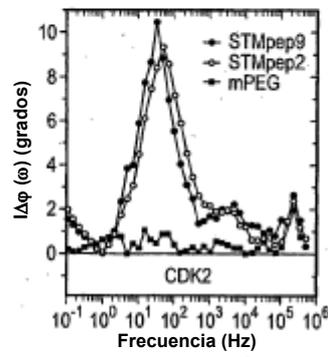


FIG. 4C

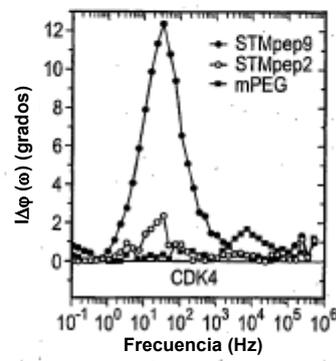


FIG. 4D

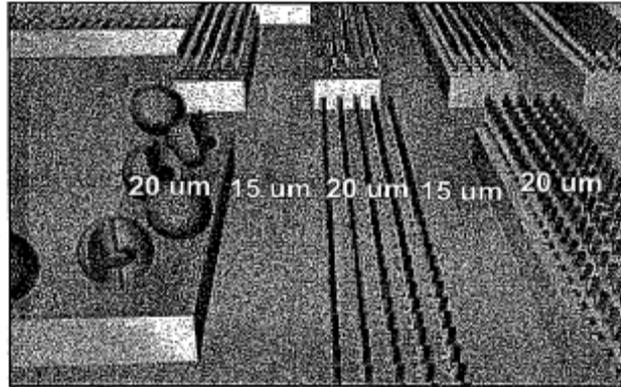


FIG. 5