(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 593 683**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/548 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2002** **E 10011093 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2295971**

(54) Título: **Sondas conjugadas y detección óptica de analitos**

(30) Prioridad:

09.03.2001 US 274177 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2016

(73) Titular/es:

TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

LIU, ZHIPING y
LI, ZHENG

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 593 683 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

Sondas conjugadas y detección óptica de analitos

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a sondas conjugadas y a la detección óptica de analitos**.** Más específicamente, la presente invención se refiere a sondas conjugadas que se usan para formar una matriz para un sensor o sistema que usa detección óptica de analitos.

Antecedentes de la invención

Las biomoléculas y otros analitos se pueden detectar usando matrices o micromatrices de sondas selectivas o específicas que se unen a analitos diana. Se han desarrollado esquemas en tecnología de matrices de biosensores para disponer puntos de sondas sobre sustratos o biocircuitos. Las matrices se usan para detectar y descubrir secuencias génicas, para seleccionar y analizar moléculas candidatas a fármacos, para investigar acciones toxicológicas o farmacológicas y para otros usos. Las dianas se pueden unir a sondas de una matriz mediante diversas interacciones, incluyendo apareamiento o hibridación de bases de ácidos nucleicos, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ligando, interacciones enzima-sustrato, interacciones receptor-ligando y otras reacciones químicas.

Los biosensores permiten el análisis simultáneo de un gran número de interacciones entre biomoléculas, tales como proteínas o ácidos nucleicos en un formato de micromatriz. Representan una potente herramienta en el uso de la gran cantidad de información de secuencias generada en el Proyecto del Genoma Humano, así como de la secuenciación de genomas de otros organismos.

La señal de la especie de analito generalmente es pequeña y las señales de fondo que aparecen de varias fuentes hacen que la proporción señal-ruido de la medición sea relativamente baja. La señal baja se traduce en una proporción señal-ruido baja y una detección mala de analitos. Una solución es potencial la señal procedente de los analitos para incrementar la proporción señal-ruido inherente de la detección. Aumentar la proporción señal-ruido disminuye el límite de detección de analitos, lo que posibilita observar los analitos a una concentración más baja, de modo que se abren nuevas puertas a las aplicaciones a biomoléculas.

El documento WO98/20019 A se refiere a superficies funcionalizadas que comprenden perlas inmovilizadas.

Vo- Dinh y col., (1999) Anal. Chem. 71, 358- 363 se refiere a la preparación de biosensores basados en microplacas CCD.

Vo- Dinh (1998) Sensors and Actuators B51, nº 1/2/3 se refiere a la preparación de biosensores basados en microplacas CMOS.

El documento WO 00/43552 A se refiere a dispositivos biosensores multifuncionales y multiespectrales.

El documento US 5 789 555 A se refiere a un método de marcaje inmovilizado.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una matriz para detectar analitos con un sensor de imágenes, comprendiendo la matriz:

- un sensor óptico de imagen digital semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS) que comprende como su capar superior una capa de pasivación transparente; y
- una pluralidad de sondas conjugadas unidas covalentemente a dicha capa de pasivación transparente;

en la que al menos un conjugado de la pluralidad de conjugados comprende un resto de sonda de unión a diana acoplado covalentemente con un polímero.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de analitos, comprendiendo el método poner en contacto un fluido que contiene analitos diana con una matriz de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra una realización de un alojamiento de sensor de luz baja unido a una realización de una estación de lectura.
La Fig. 2 ilustra una vista lateral de una realización de un alojamiento de sensor de luz baja.
La Fig. 3 ilustra una realización de un sistema biosensor con sensor de imagen óptica extraíble.

La Fig. 4 ilustra una realización de la detección de señales puntuales mediante sondas en matriz usando un sensor de imágenes CMOS.

Descripción detallada de la invención

Una “matriz” o “micromatriz” es una matriz lineal o bidimensional o una matriz de regiones pequeñas, teniendo cada una un área definida, formadas sobre la superficie de un soporte sólido. Las regiones pequeñas pueden estar o no solapadas. La densidad de las regiones pequeñas en una micromatriz se determina mediante el número total de moléculas diana, tales como polinucleótidos, a detectar sobre la superficie de un único soporte de fase sólida. Aunque dos o más regiones pueden formar una matriz, la densidad típica de las regiones pequeñas es de al menos aproximadamente 50/cm^2, a menudo de al menos aproximadamente 100/cm^2, más a menudo de al menos aproximadamente 500/cm^2, y en ocasiones de al menos aproximadamente 1,000%m^2. Como se usa en el presente documento, una micromatriz de ADN es una matriz de cebadores oligonucleotídicos colocados sobre un circuito u otras superficies usadas para amplificar o clonar polinucleótidos diana. Dado que la posición de cada grupo concreto de cebadores en la matriz se conoce, las identidades de los polinucleótidos diana se pueden determinar en base a su unión a una posición concreta en la micromatriz.

El término “marcador” o “especie marcadora” se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia del polinucleótido diana en una muestra de ensayo. Marcadores adecuados incluyen radioisótopos, cromóforos nucleotídicos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, nanopartículas tales como cuantos, y restos bioluminiscentes. Como tal, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Como se usa el presente documento, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o de fluido aislado de un individuo que incluye, entre otros, por ejemplo, sangre, plasma, suero, líquido espinal, líquido linfático, secciones externas de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células (incluidas, entre otras, las células sanguíneas), tumores, órganos y también muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro.

La expresión “fuentes biológicas”, como se usa en el presente documento, se refiere a las fuentes de las que derivan los polinucleótidos diana. La fuente puede ser de cualquier forma de “muestra” como se ha descrito anteriormente, incluyendo, entre otras, células, tejidos o líquidos. “Fuentes biológicas diferentes” puede hacer referencia a diferentes células/tejidos/órganos del mismo individuo o células/tejidos/órganos de diferentes individuos de la misma especie o células/tejidos/órganos de diferentes especies.

Un “polinucleótido” es una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término hace referencia únicamente a la estructura primaria de la molécula. Por tanto, este término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN y ARN, tales como las formas A, B, H y Z del ADA y formas triples. También Incluye tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo marcadores conocidos en la técnica, mutilación, “capuchones”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo y modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquéllas con enlaces sin carga (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos etc.), los que contienen restos pendientes tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo, por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina etc.), aquéllos con intercalantes (p. ej., acridina, psoraleno etc.), aquéllos que contienen quelantes (p. ej., metales, metales radioactivos etc.), aquéllos que contienen alquilantes, aquéllos que contienen enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido.

Como se usa en el presente documento, las expresiones biológicas “parejas de unión” o “ligando/antiligando” o “complejo ligando/antiligando” hace referencia a moléculas que reconocen específicamente (p. ej., se unen) otras moléculas para formar un complejo de unión tal como anticuerpo-antígeno, lectina-hidrato de carbono, ácido nucleico-ácido nucleico, biotina-avidina etc. Las parejas de unión biológica no tienen que limitarse a pares de moléculas sencillas. Por tanto, por ejemplo, un ligando sencillo se puede unir mediante la acción coordinada de dos o más "antiligandos".

Como se usa en el presente documento, los términos “ligando” o “analito” o “marcador” se refieren cualquier molécula que se esté detectando. Se detecta mediante su interacción con un antiligando que se une, específica o inespecíficamente, al ligando o mediante las propiedades características del ligando, tales como las propiedades dieléctricas. Generalmente, el ligando se define como cualquier molécula para la cual existe otra molécula (es decir, un antiligando que se une específica o inespecíficamente a dicho ligando debido al reconocimiento de alguna porción de dicho ligando. El antiligando, por ejemplo, se puede unir a un anticuerpo y el ligando a una molécula tal como un antígeno, que se une específicamente al anticuerpo. En caso de que el antígeno esté unido a una superficie y el anticuerpo sea la molécula a detectar, para los fines del presente documento el anticuerpo se convierte en el ligando y el antígeno es el antiligando. El ligando puede también consistir en células, membranas celulares, orgánulos y análogos sintéticos de los mismos.

Los ligandos a usar para la práctica de la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos (que forma un complejo anticuerpo/epítopo), antígenos, ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARN, GADN, HADN, ADNc, ARNm, ARNt, etc., naturales o sintéticos), lectinas, azúcares (p. ej., que forman un complejo lectinas/azúcar), glucoproteínas, receptores y su ligando afín (p. ej., factores de crecimiento y sus receptores asociados, citocinas y sus receptores asociados, receptores de señalización etc.), moléculas pequeñas tales como candidatos a fármacos (productos naturales o análogos sintéticos desarrollados y almacenados en bibliotecas combinatorias), metabolitos, drogas y sus subproductos metabólicos, cofactores tales como vitaminas y otros compuestos naturales y sintéticos, oxígeno y otros gases encontrados en los líquidos fisiológicos, células, constituyentes celulares de membranas celulares y estructuras asociadas, otros productos naturales encontrados en fuentes animales y vegetales, otros productos parcial o completamente sintéticos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “acontecimiento de unión” se refiere a una interacción o asociación entre al menos dos estructuras moleculares, tales como un ligando y un antiligando. La interacción se puede producir cuando las dos estructuras moleculares están en contacto físico directo o indirecto o cuando las dos estructuras están separadas físicamente pero acopladas electromagnéticamente entre ellas. Ejemplos de acontecimientos de unión de interés incluyen, entre otros, ligando/receptor, antígeno/anticuerpo, enzima/sustrato, ADN/ADN, ADN/ARN, ARN/ARN, híbridos, apareamientos erróneos en ácidos nucleicos, ácidos nucleicos complementarios y ácidos nucleicos/proteínas. Como alternativa, la expresión “acontecimiento de unión” se refiere a una única molécula o estructura molecular descrita en el presente documento, tal como un ligando o un c0omplejo ligando/antiligando”, que está unido a la vía se señal. En este caso, la vía de señal es la segunda estructura molecular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “complejo ligando/antiligando” se refiere al ligando unido al antiligando. La unión puede ser específica o inespecífica y los enlaces son típicamente enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, unión inmunológica, fuerzas de Van der Waals, fuerzas iónicas u otros tipos de unión.

Como se usa en el presente documento, el término "acoplamiento”, con respecto a las moléculas y restos moleculares, hace referencia a la unión o asociación de moléculas, sea específica o no, como resultado de la reacción química o como el resultado de interacciones físicas directas o indirectas, interacciones de van der Waals, fuerzas de London o interacciones débiles, o como el resultado de interacción magnética, electrostática o electromagnética.

Sondas conjugadas

En general, las sondas de una matriz capturan y se unen al analito diana que se va a detectar. Los restos de captura o de unión a diana incluyen ácidos nucleicos, polinucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos peptídicos moléculas pequeñas y una amplia variedad de biomoléculas. Los restos de sondas de unión a diana incluyen un dominio de unión a epítopo de un anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención abarca un número mayor de analitos dentro cada punto o mancha de la matriz. El mayor número de analitos por mancha se consigue mediante composiciones de sondas conjugadas que pueden capturar números aumentados de restos de analitos. Las sondas conjugadas que incluyen, por ejemplo, conjugados de polisacáridos, se usan para unir números potenciados de restos de analitos a los puntos manchas de la micromatriz.

En una realización, los conjugados se forman a partir de un polímero unido a una sustancia química o biomoléculas, donde la sustancia química o las biomoléculas incluyen una sonda o sondas, formando de este modo sondas conjugadas. La sustancia química o las biomoléculas que contienen la sonda o sondas están acopladas al polímero mediante enlaces covalentes o mediante interacciones químicas no covalentes tales como interacciones iónicas o fuerzas de unión débiles. El polímero puede ser un polímero lineal o ramificado, tal como un polisacárido lineal o ramificado u oligonucleótido, por ejemplo.

El polímero puede ser un sólido, gel o composición amorfa en forma de capas, perlas, discos o mezclas de los mismos y puede ser homogéneo o heterogéneo, lineal o ramificado, ramificado en cadena lateral, en peine ramificado o estrella o dendrimérico. Las ramificaciones de los polímeros pueden ser ramificaciones de cadena larga o ramificaciones de cadena corta. Los polímeros se fabrican mediante procedimientos sintéticos o se pueden obtener como productos naturales aislados de fuentes naturales. Ejemplos del polímero incluyen hidratos de carbono, sacáridos, homopolisacáridos, heteropolisacáridos, agarosa, amilosa, amilopectina, glucógeno, dextrano, celulosa, quitina, quitosán, peptidoglucano y glucosaminoglucano. En algunas realizaciones, el polímero es un dextrano altamente ramificado. En otras realizaciones, el polímero es un dextrano hidratado o agarosa, tal como un hidrogel, o es un gel de poliacrilamida. Otros ejemplos de polímeros usados para preparar los conjugados incluyen oligonucleótidos, péptidos, ácidos nucleicos peptídicos, proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos. En realizaciones adicionales, el polímero puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

Otros ejemplos de polímeros útiles para preparar conjugados incluyen polímeros que contienen diol, tales como polímeros que tienen grupos gem-diol o vecinales-diol. Otro ejemplos es un polímero que tiene un grupo hidroxilo al

lado de un grupo éster, tal como un enlace fosfodiéster en un ARN.

Otros ejemplos de polímeros son polinucleótidos sintéticos o naturales tales como poli(T), poli (A) o poli(U).

Otro ejemplo es un polímero que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo. Pueden usarse mezclas de cualquiera de estas especies poliméricas en una realización de la presente invención.

Las sondas conjugadas se preparan acoplando la sustancia química o biomolécula al polímero. Ejemplos de procedimientos generales para preparar conjugados se revisan en Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques (Academic Press 1996). En algunas realizaciones, las sondas conjugadas se preparan mediante una reacción de conjugación de un grupo funcional o reactivo sobre la sustancia química o biomolécula con el polímero, que se acopla a la sustancia química o biomolécula al polímero. Los grupos funcionales o reactivos sobre la sustancia química o biomolécula incluyen, por ejemplo, aldehídos, hidroxilos, aminas o grupos amino, carboxilatos, grupos sulfhidrilo y mezclas de los mismos.

Las sondas conjugadas se preparan acoplando o haciendo reaccionar una sustancia química o biomolécula con el polímero, en la que el polímero puede derivatizarse para contener una pluralidad de sitios de unión a los grupos funcionales o reactivos de la sustancia química o biomolécula, directa o indirectamente mediante grupos ligadores. El polímero derivatizado tiene grupos reactivos que se pueden usar para unirse a sustancias químicas o biomoléculas. Los grupos reactivos del polímero derivatizado pueden ser aldehídos, hidroxilos, aminas o grupos amino, carboxilatos, grupos sulfhidrilo, isotiocianatos, ésteres de N-hidroxisuccinimida, cetonas, glioxales, epóxidos, oxiranos, imidoésteres, carbodiimidazoles, alquilfosfatos, anhídridos, maleimidas, aziridinas, acriloílos, fluorofenilos, diazoacetilos, N-acilimidazoles, carbonatos de succinimidilo, grupos carboximetilo, isocianatos, grupos hidrazina, acrilazidas y mezclas de los mismos.

El polímero puede tener un grupo amina reactivo, tal como el grupo amino en quitosano. En otras realizaciones, el polímero tiene grupos funcionales, tales como grupos sulfatos, carboxilatos o fosfato. Ejemplos de polímeros que contienen sulfato incluyen condroitinsulfato, dermatansulfato, heparinasulfato y queratinasulfato. Ejemplos de polímeros que contienen carboxilato son polisacáridos que contienen grupos que derivan de ácido siálico, ácido aldónico, ácido urónico, ácido oxoaldónico y ácido ascórbico.

Ejemplos de polímeros que contienen fosfato incluyen ácidos nucleicos tales como ADN o ARN. Estos polímeros pueden estar conjugados con una sustancia química o biomolécula para fabricar una sonda conjugada usando ligadores bifuncionales tales como ligadores homofuncionales, heterofuncionales o multifuncionales. Por ejemplo, la sonda conjugada puede ser un polímero polinucleotídico conjugado a otro polinucleótidos. En un ejemplo, el ARN se oxida para proporcionar grupos aldehídos para unirse a sustancias químicas o biomoléculas para fabricar un conjugado.

Una variedad de sustancias químicas o biomoléculas se pueden acoplar al polímero, para proporcionar sondas conjugadas capaces de unirse a varias dianas. En otras palabras, una única cadena polimétrica se puede acoplar a diversas sustancias químicas o biomoléculas para proporcionar una sonda conjugada. Mezclas de sondas conjugadas se pueden usar en una realización de la presente invención.

En una realización para preparar una sonda conjugada, los grupos amino en cada uno de polímero y al sustancia química o biomolécula se unen usando ditiobis (propionato de succinimidilo), tartarato de disuccinimidilo o glutamato de disuccinimidilo. En otras realizaciones, un grupo sulfhidrilo de la sustancia química o biomolécula se une con un grupo amino del polímero usando propionato de N-succinimidl-2-(2-piridiltio) o éster de m-malemidobenzoil-N-hidroxisuccinimida. En otra realización, un grupo sulfhidrilo de la sustancia química o biomolécula se une con un grupo aldehído del polímero usando 4-(N-maleimidometil) ciclohexano- 1- carboxil- hidrazida o 3- (2-piridilditio) propionil hidrazida. En una realización adicional, un grupo sulfhidrilo de la sustancia química o biomolécula se une con un grupo carboxilato del polímero usando 4- (p- azidosalicilamido) butilamina.

Grupos amino en cada uno del polímero y la sustancia química o biomolécula pueden unirse en otras realizaciones. Usando reticuladores heterobifuncionales, N- 5- azido-2- nitrobenzoiloxisuccinimida o N- hidroxisulfosuccinimidil-4-azidobenzoato.

En una realización, la conjugación se realiza haciendo reaccionar los grupos hidroxilo del polímero con un agente de carbonilación tal como N,N'-carbonildiimidazol para formar un carbamato de imidazolilo intermedio que, a su vez, puede reaccionar con N-nucleófilos tales como aminas, restos que contienen amino tales como péptidos y proteínas, dando un enlace N-alquilcarbamato.

En una realización, la conjugación la conjugación se realiza haciendo reaccionar los grupos hidroxilo del polímero con N,N'- disuccinimidilcarbonato, seguido de la reacción con un resto que contiene amino, tal como, por ejemplo, un grupo amino sobre un oligonucleótido. El grupo amino puede ser un grupo amino terminal o proximal a un extremo del oligonucleótido.

La conjugación se puede realizar haciendo reaccionar el polímero con ácido 3-malemidopropiónico, seguido por la reacción del producto, un polímero derivatizado, con un grupo amino en un oligonucleótido.

En otra realización, la conjugación se realiza haciendo reaccionar el polímero con grupos hidroxilos con grupos terminales en haluro de alquilo de la sustancia química o biomolécula para dar enlaces éter en la sonda conjugada.

Los polímeros que contienen con grupos hidroxilos en átomos de carbono adyacentes, por ejemplo sacáridos o glucoproteínas se pueden hace reaccionar con peryodato sódico para producir grupos funcionales aldehído sobre el polímero que se puede usar para conjugar sustancias químicas o biomoléculas para preparar sondas conjugadas. La posterior reacción de los grupos funcionales aldehído sobre el polímero con una sustancia química o biomolécula que contiene amina produce un enlace de base de Schiff entre el polímero y la molécula. El enlace de base de Schiff se puede hacer reaccionar con agentes reductores tales como borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico para producir un enlace amina secundaria o terciaria entre el polímero y la sustancia química o biomolécula

En otras realizaciones, las sondas conjugadas se preparar usando reticuladores fotorreactivos. Por ejemplo, los grupos amino en cada uno del polímero y la sustancia química o biomolécula se pueden acoplar a un reticulador fotorreactivo, formando de este modo un conjugado en el que el polímero está acoplado a la sustancia química o biomolécula a través de un grupo de unión. En un ejemplo, un grupo amino del polímero se puede acoplar a ácido N-hidroxisuccinimidil-2-azidosalicílico y un grupo amino de la sustancia química o biomolécula puede acoplarse mediante fotolisis para formar un conjugado en el que el polímero está acoplado a la sustancia química o biomolécula a través de un grupo de unión.

En otro ejemplo, el grupo sulfhidrilo de de la sustancia química o biomolécula se puede acoplar a 1- (p-azidosalicilamido)-4- (yodoacetamido) butano, y un grupo amino del polímero se puede acoplar mediante fotolisis para formar un conjugado en el que el polímero está acoplado a la sustancia química o biomolécula a través de un grupo de unión.

En otro ejemplo, el grupo aldehído del polímero se puede acoplar a p-azidobenzoilhidrazida y un grupo amino de la sustancia química o biomolécula polímero se puede acoplar mediante fotolisis para formar un conjugado en el que el polímero está acoplado a la sustancia química o biomolécula a través de un grupo de unión.

En algunas realizaciones, se utiliza la interacción avidina biotina para la reacción de conjugación. Los grupos reactivos tales como amino, carboxilato, sulfhidrilo, y carbohidratos se pueden biotinilar. Los grupos biotina se pueden usar para unirse a avidina o estreptavidina, que puede llevar una marca.

El acoplamiento de las sondas conjugadas a la superficie del sensor para preparar una matriz se puede realizar de varias formas. Por ejemplo, la superficie se puede derivatizar con un epóxido, que puede reaccionar con grupos OH o NH_2- reactivos en las sondas conjugadas. En otro ejemplo, la superficie del sensor se trata con poli(lisina), y las sondas conjugadas o biomoléculas se dispersan sobre la superficie. Se puede utilizar opcionalmente radiación UV para reticular las sondas conjugadas o biomoléculas al sustrato, tal como un porta de vidrio, o una capa de pasivación en un dispositivo electrónico. Las sondas conjugadas o los oligonucleótidos se pueden acoplar a la superficie de un sensor que se ha derivatizado con grupos aldehído, amina, o isotiocianida. El mecanismo de formación de la matriz puede ser manchado, impresión con chorro de tinta, o síntesis directa en el chip.

Además, las sondas se pueden aplicar a un soporte sólido utilizando un sistema robotizado, tal como el fabricado por Genetic MicroSystems (Woburn, MA), GeneMachines (San Carlos, CA) o Cartesian Technologies (Irvine, CA), o Packard Bioscience (Billerica, MA).

La química típica implicada en la unión de un ligando a la capa de la matriz de detección dependerá generalmente de la naturaleza del ligando y de cualquier antiligando con el que se una, así como de sus funciones en el ensayo. Un listado de los posibles tipos de interacciones que pueden tener lugar sobre la superficie incluyen, pero sin limitación: interacciones proteína/proteína, interacciones ADN/proteína, interacciones ARN/proteína, hibridación de ácido nucleico, incluyendo análisis de emparejamiento incorrecto de pares de bases, interacciones ARN/ARN, interacciones de ARNt, sistemas enzima/sustrato, interacciones antígeno/anticuerpo, interacciones molécula pequeña/proteína, interacciones fármaco/receptor, interacciones membrana/receptor, cambios conformacionales en ligandos en fase sólida, interacciones proteína/sacárido, e interacciones lípido/proteína.

La química real de la superficie se puede describir en una realización como una unión primaria y una unión secundaria. Pueden existir también regiones adicionales de unión molecular. La unión primaria se refiere a la unión de un antiligando a la superficie de detección, que se puede realizar mediante la ayuda de una molécula enlazadora.

En una realización, la invención proporciona un soporte sólido preparado que comprende grupos independientes inmovilizados o no inmovilizados de sondas de oligonucleótido. Las sondas se pueden seleccionar o diseñar mediante el uso, por ejemplo, de un programa de selección de sondas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional tal como Probe3 del Massachusetts Institute of Technology.

El soporte en fase sólida puede proporcionar áreas de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 micrómetros cuadrados, sobre la que se pueden inmovilizar aproximadamente 100.000 grupos de sondas en áreas discretas de acuerdo con un modelo predeterminado. El soporte sólido preparado puede tener un registro asociado escrito o electrónico de la secuencia de la sonda o pares de sonda en cualquier localización dada del soporte y, de este modo, también puede identificarse la localización en el soporte de una diana amplificada.

El número de sondas dentro de cada grupo que corresponde a una región particular de una secuencia de referencia se puede determinar y estar limitado por las necesidades de la reacción de amplificación posteriormente planificada en la micromatriz. Así, por ejemplo, el número de sondas que se considera necesario para llevar a cabo una amplificación por PCR en un sitio específico de la micromatriz, considerando especialmente el volumen de reacción y el número esperado de moléculas de polinucleótido de la diana del molde, y el número propuesto de ciclos de la PCR, ayudará a determinar exactamente cuántas copias de la sonda de oligonucleótido aplicar como grupo en cada ubicación del soporte para garantizar reacciones con éxito. A veces, la cantidad de sondas (es decir, números de moléculas sonda o concentración de sonda) será aproximadamente la misma en cada localización de un soporte sólido dado (por ejemplo, en un formato de micromatriz de ADN que tenga desde 1000, hasta 10,000, hasta aproximadamente 100.000 grupos de sondas a amplificar o detectar en aproximadamente 100.000 regiones del polinucleótido diana).

Se entenderá que cualquier sonda que contenga ácido nucleico puede contener deleciones, adiciones y/o sustituciones de menor importancia en las bases del ácido nucleico.

Las sondas de oligonucleótido incluyen las bases heterocíclicas naturales encontrabas habitualmente en los ácidos nucleicos (uracilo, citosina, timina, adenina y guanina), así como bases modificada y análogos de base. Cualquier base modificada y análogos de base compatible con la hibridación de la sonda con una secuencia diana es útil en la práctica de la invención.

La parte de azúcar o glucósido de la sonda de polinucleótido puede comprender desoxirribosa, ribosa y/o formas modificadas de dichos azúcares, tales como, por ejemplo, 2'-O-alquil ribosa. En una realización preferida, el resto azúcar es 2'-desoxirribosa; sin embargo, se puede usar cualquier resto azúcar que sea compatible con la capacidad de la sonda para hibridarse con una secuencia diana.

En una realización, las unidades de nucleósido de la sonda están unidas por una estructura básica de fosfodiéster, tal como es sabido en la técnica. En realizaciones adicionales, las uniones entre nucleótidos pueden incluir cualquier enlace que sea compatible con la hibridación específica de la sonda, incluyendo pero sin limitación, fosfotioato, metilfosfonato, sulfamato (*por ejemplo*, patente de los Estados Unidos con nº 5.470.967) y poliamida (*es decir,* ácidos peptidonucleicos). Los ácidos peptidonucleicos se han descrito en Nielsen y col. (1991) Science 254: 1497-1500, patente de los Estados Unidos con nº 5.714.331, y Nielsen (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10:71-75.

En determinadas realizaciones, la sonda puede ser una molécula quimérica; *es decir,* puede comprender más de un tipo de subunidad de base o azúcar, y/o los enlaces pueden ser de más de un tipo dentro de la misma sonda.

La sonda puede comprender un resto para facilitar la hibridación con su secuencia diana, como es conocido en la materia, por ejemplo, intercaladores y/o moléculas de unión al surco menor.

Las variaciones en las bases, azúcares y estructura básica entre nucleótidos, así como la presencia de cualquier grupo colgante en la sonda, serán compatibles con la capacidad de la sonda para unirse, de forma específica de la secuencia, con su secuencia diana. Es posible un número importante de modificaciones estructurales, tanto conocidas como en desarrollo, dentro de estos límites. Además, los métodos sintéticos para preparar las diferentes bases heterocíclicas, azúcares, nucleósidos y nucleótidos que constituyen la sonda, y la preparación de oligonucleótidos con una secuencia específica predeterminada, están bien desarrollados y son conocidos en la técnica. Un método para la síntesis de oligonucleótidos incorpora las enseñanzas de la patente de los Estados Unidos con nº 5.419.966.

Las sondas de oligonucleótidos se pueden diseñar con cualquier resto o secuencias adicionales especiales que ayudarán y facilitarán una PCR particular o posteriores manipulaciones, por ejemplo aislamiento de los polinucleótidos amplificados diana. Por ejemplo, una sonda puede incluir secuencias adicionales a las que son complementarias de la secuencia diana. Dichas secuencias se encuentran normalmente secuencia arriba (*es decir,* en dirección 5') de las secuencias complementarias de la diana en la sonda. Por ejemplo, las secuencias que comprenden uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (denominadas "enlazadores" o "adaptadores"), cuando están presentes en una sonda secuencia arriba de las secuencias complementarias de la diana, facilitan la clonación y la posterior manipulación de un producto de amplificación. Otras secuencias útiles para su inclusión en una sonda incluyen las que son complementarias de una sonda se secuenciación y las que especifican un promotor de la ARN polimerasa de bacteriófago tales como, por ejemplo, la ARN polimerasa T3, la ARN polimerasa T7, y/o la ARN polimerasa SP6.

En un aspecto de la invención, las sondas de micromatriz se definen por un método de apilamiento para cubrir la totalidad de una región de interés en el polinucleótido diana. Por ejemplo, un primer grupo de sondas está diseñado de forma que la secuencia de cada sonda en lo anterior se corresponde con la parte más próxima a 5 de la región de interés; un segundo grupo de sondas tiene una secuencia que se ha "desplazado" del primer grupo en un nucleótido en dirección al extremo 3' de la región; y el tercer grupo de sondas tiene una secuencia que se ha "desplazado" del segundo grupo en un nucleótido en dirección al extremo 3' de la región, y etc. En teoría, entonces, el número de grupos de sondas es igual al número de nucleótidos en la región de interés. Por supuesto, dentro de cada grupo de sondas que corresponde a una parte particular de la región, existe como mínimo cuatro conjuntos de sondas con extremos 3' diferentes tal como se ha descrito anteriormente. Cuando se van a detectar múltiple polinucleótidos diana de acuerdo con la presente invención, cada grupo de sonda correspondiente a un polinucleótido diana particular reside en un área discreta de la micromatriz.

Sistema biosensor de imágenes digitales

En un aspecto de la presente invención, la detección de analitos con un Sistema biosensor se potencia mediante el uso de imágenes digitales, o tecnología de detección con "visión máquina" que se puede usar para leer la señal del analito unido a la matriz con menos fondo y con la correspondiente mayor relación señal a ruido. En una realización, el sistema biosensor utiliza tecnología de detección de imágenes digitales que incluye un sensor de imágenes digitales en una tarjeta secundaria, una matriz de sondas conjugadas, una carcasa de baja intensidad de luz para el sensor que puede proporcionar enfriamiento térmico al sensor, y métodos para integrar las señales de analito.

En una realización, la señal óptica procedente de una matriz que comprende especies de captura tales como sondas conjugadas se detecta mediante un sensor de imágenes digitales. El sensor de imágenes digitales incluye una matriz de elementos fotosensores. Las sondas conjugadas se pueden dispersar en una matriz del sensor de imágenes digitales y pueden estar unidas bien de forma covalente o de forma no covalente a la superficie del sensor de imágenes digitales. En una realización alternativa, la matriz se mancha sobre un porta de vidrio que se puede colocar adyacente al sensor de imágenes digitales. En dichas realizaciones, se ubica opcionalmente un acoplador de fibra óptica entre el porta de vidrio y el sensor.

La región localizada de cada mancha de sonda discreta en la matriz puede ser más grande que la de un elemento fotosensor individual del sensor de imágenes digitales. De forma típica, no existe una correspondencia unívoca entre las manchas de la sonda y los fotosensores individuales. Alternativamente, las manchas de la sonda pueden tener aproximadamente el mismo tamaño que un elemento fotosensor individual.

El sensor de imágenes digitales es un sensor de imágenes metal complementario-óxido-semiconductor (CMOS). Cada sensor en un sensor de imágenes CMOS incluye una célula fotodiodo que está unida a su propio convertidor analógico-digital, amplificador y registro. La capa superior de un sensor de imágenes CMOS es una capa de pasivación, que puede ser dióxido de silicio prácticamente trasparente a la luz, y sirve como barrera de fluidos para proteger la circuitería del semiconductor de la disolución de analito a suministrar a la matriz. La capa de pasivación también puede ser un material conductor trasparente.

En un aspecto, la presente invención se refiere a la mejora de una señal procedente de especias detectadas mediante la detección de una señal en el sensor de imágenes digitales, donde se forma directamente una matriz sobre el sensor de imágenes digitales. En una realización, la detección óptica de la emisión de quimioluminiscencia del analito se lleva a cabo mediante una matriz formada sobre una capa de pasivación fina situada en la parte superior del sensor imágenes digitales. En esta realización, la señal queda ventajosamente potenciada por la proximidad entre la matriz y los elementos fotosensores del sensor de imágenes digitales.

En otro aspecto de la presente invención, el dispositivo o sistema sensor proporciona una relación señal a ruido aumentada de las mediciones de la señal luminosa de la matriz de analitos reduciendo la radiación de fondo que incide sobre el detector sensor de imágenes. Tal como se ilustra en la realización de la Fig. 1, se proporciona un cerramiento **100** de baja intensidad de luz para contener el sensor de imágenes ópticas y la matriz. El cerramiento **100** tiene una carcasa superior **160** y una carcasa inferior **180.** La carcasa inferior **180** soporta una tarjeta de circuito impreso del sensor de imágenes ópticas, elementos de refrigeración opcionales para el sensor, y aloja mecánicamente la carcasa superior **160.** En la realización de la Fig. 1, la tarjeta de circuito impreso del sensor de imágenes ópticas está incluido en el interior de un segundo cerramiento **150.** El circuito impreso y el segundo cerramiento están unidos al conector de borde **360.** La carcasa superior **160,** cuando se aloja en la carcasa inferior **180,** proporciona una región **300** de baja intensidad de luz definida por una barrera **200** que rodea de forma estanca la matriz **120.** El fluido entra en contacto con la matriz en la región de baja intensidad de luz definida por la barrera **200.**

En otra realización ilustrada en la Figura 2, se proporciona una abertura **240** para entrada de fluidos en la carcasa inferior **180.** En funcionamiento, el fluido se introduce en la matriz **120** inyectando un líquido que contiene las moléculas diana a través de la abertura **240** para entrada de fluidos. El fluido se combina en la región **300** de baja intensidad de luz. De manera opcional, una estructura capilar o canal de fluido **104** se forma en el interior del cerramiento **100** para suministrar el analito desde la abertura **240** para entrada de fluidos hasta la matriz **120.** La

abertura **240** para entrada de fluidos incluye de manera opcional un septo **244** a través del cual se introduce el fluido, siendo el septo una barrera tanto para los fluidos como para la luz.

En algunas realizaciones alternativas por ejemplo cuando se utiliza detección por fluorescencia, no se necesita que haya un fluido presente en la región **300** de baja intensidad de luz. En dichas realizaciones, se puede inyectar un fluido en la abertura **240** para entrada de fluidos para proporcionar enfriamiento al sensor de imágenes.

En la realización de la Fig. 2, se proporciona un lente opcional en la carcasa superior **160** adyacente a la región **300** de baja intensidad de luz. Un material de sellado **268** tal como un elastómero espumado o arandela también se puede proporcionar para ayudar al cierre estanco de la región **300** de baja intensidad de luz**.**

El cerramiento **100** está conectado a la estación de lectura **400** de forma que la matriz está nivelada sustancialmente por gravedad. De manera opcional, el cerramiento puede estar conectado a la estación de lectura y operado en cualquier orientación gravitacional. En estas realizaciones opcionales, la abertura para entrada de fluido y el cerramiento pueden encapsular el fluido de analito mediante tensión superficial y efecto de capilaridad en cualquier orientación, siempre que se puedan leer las señales de la matriz de analito.

Tal como se ilustra en las realizaciones de las Figs. 1 y 2, la tarjeta de circuito impreso **380** que soporta el sensor de imágenes ópticas **140** está conectada eléctricamente a la estación de lectura **400** mediante un conector de borde eléctrico **360.** El sensor de imágenes ópticas **140** puede estar sujeto, y parcialmente encapsulado, con una resina epoxi **248** para proporcionarle estabilidad y protección. De manera opcional, la carcasa inferior **180** proporciona abertura(s) para acceder a los circuitos electrónicos del sensor de imágenes ópticas **140.**

En una realización, se proporciona un sistema biosensor que integra la señal del analito para aumentar la relación señal a ruido en la detección de los analitos. La integración se puede llevar a cabo aumentando el tiempo de recogida de imágenes del detector de la luz procedente de la matriz. Para integrar la señal de analito, se proporciona un método de transferencia de datos que utiliza un sensor de imágenes CMOS. Un sensor de imágenes CMOS típico es un dispositivo rápido de marcos temporales que se puede utilizar en aplicaciones de cámaras de video. En una realización, el sensor de imágenes CMOS se opera en un régimen muy lento con el fin de integrar la señal de la matriz que incide en el sensor. En esta realización, la señal integrada se almacena en la memoria, se repite la integración, y se observa la velocidad de cambio en la señal de analito con el tiempo. El tiempo de recogida de imagines del sensor de imágenes CMOS se puede controlar, por ejemplo, para integrar la detección del analito eliminando todos los registros existentes en el chip a tiempo cero, y recogiendo a continuación la señal de radiación del analito durante un periodo de tiempo fijado. En algunas realizaciones, los elementos fotosensores individuales del sensor de imágenes realizan la integración simultáneamente para diferentes periodos. La integración de la señal del analito aumenta su relación señal a ruido y mejora la detección de los analitos, permitiendo detectar una menor concentración de analito.

En una realización, la señal de analito se potencia reduciendo el ruido "térmico” inherente al sensor de imágenes CMOS enfriando el sensor incluido en el cerramiento de baja intensidad de luz. El sensor se puede enfriar mediante un elemento termoeléctrico, por expansión de boquilla o enfriamiento por con métodos de refrigeración, o por inmersión en fluidos de enfriamiento. Se ha observado una reducción del ruido a aproximadamente la mitad enfriando el sensor a 7° C, y enfriar el sensor a 4° C reduce el ruido en aproximadamente diez veces con respecto a la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, se inyecta un fluido, que puede contener o no moléculas de muestra, en el cerramiento de baja intensidad de luz para proporcionar refrigeración al sensor.

Señal de la matriz de analito

La detección óptica del analito unido a una sonda conjugada incluye la detección mediante métodos de fluorescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, colorimetría, absorbancia y punto cuántico. Las especies de etiquetas o moléculas indicadoras están unidas al polímero, o a la sonda de las sondas conjugadas, o a los analitos en la mezcla diana. Los ejemplos de especies de etiquetas o moléculas indicadoras incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, quimioluminóforos, moléculas bioluminiscentes, enzimas, anticuerpos y partículas tales como partículas magnéticas y puntos cuánticos. Las moléculas de colorante fluorescente unidas a un oligonucleótido corto derivatizado con amina se pueden utilizar como especies marcadoras, donde el grupo amina está acoplado al polímero del conjugado. Las moléculas indicadoras utilizadas para la detección incluyen radioetiquetas, colorantes fluorescentes tales como Cy3, Cy5, Alexa Fluor 488, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, rosa bengala, cloruro de dansilo, bromuro de etidio, aminonaftalenos, pirenos y porfirinas, sistemas quimioluminiscentes tales como luminol, dioxetanos, ésteres de fenil acridinio, y sales de rutenio, cromóforos y sondas colorimétricas tales como oro coloidal, colorantes azo, colorantes de quinolina, y colorantes de cianina.

Se ha descrito una variedad de esquemas para la detección de analitos en M. Schena y R. W. Davis, DNA Microarrays: A Practical Approach (M. Schena ed., Oxford University Press 1999).

Los ejemplos de especie de etiqueta utilizadas incluyen agonistas y antagonistas, toxinas epítopos, hormonas, anticuerpos, péptidos, enzimas, oligonucleótidos, ácidos peptidonucleicos, lectinas, hidratos de carbono, proteínas y fármacos. Por ejemplo, las enzimas usadas en ensayos ELISA se pueden utilizar para la detección mediante fluorescencia. Otro ejemplo es la avidina o estreptavidina marcada de forma fluorescente.

En algunas realizaciones, se utiliza más de un tipo de especie de etiqueta para proporcionar más de un método de detección para un analito particular. El polímero de la sonda conjugada se puede acoplar a una pluralidad de especies de etiqueta fluorescentes y quimioluminiscentes, por ejemplo. Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, la sonda conjugada puede unirse a más de una diana. De este modo, en algunas realizaciones, un polímero de la sonda conjugada se puede acoplar a una pluralidad de moléculas de unión a diana y a una pluralidad de especies de etiqueta diferentes.

Para la detección por fluorescencia, se puede proporcionar la luz de excitación de la mancha de la matriz mediante un panel LED adyacente a la matriz, o alternativamente adyacente al cerramiento del sensor CMOS. En el método de fluorescencia, se puede utilizar un filtro de banda estrecha adyacente a la matriz, entre los puntos de la matriz y el fotodiodo para eliminar la señal de excitación de la lectura de las señales procedentes de la matriz, y seleccionar la luz emitida para su detección.

En otro método, se puede leer la señal de analito para proporcionar información del ensayo mediante la detección óptica de la quimioluminiscencia. La quimioluminiscencia procede de la luz generada en una reacción química, que se puede detectar mediante un detector de banda ancha sin un filtro, tal como un sensor de imágenes digitales CMOS. La luz procedente del punto de la matriz se detecta directamente, y la señal del fondo procede principalmente de la luz ambiental y de la “corriente térmica”. Los analitos se pueden derivatizar con etiquetas quimioluminiscentes. Se puede usar fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, para la detección mediante quimioluminiscencia. La eficacia de la detección puede depender, en parte, de la eficacia de la unión de las etiquetas, de manera selectiva o específica, a las dianas. La etiqueta puede ser bien biotina o digoxigenina que se pueden reconocer mediante un sistema de detección enzimático, seguido por una reacción quimioluminiscente que convierte la energía liberada en la escisión de un enlace químico a fotones de una longitud de onda determinada. En la detección de la quimioluminiscencia también se pueden utilizar moléculas que estabilizan la luz generada en la escisión del enlace o la reacción química, denominadas también potenciadores de la quimioluminiscencia.

La relación del número de moléculas señal o moléculas de colorante y el número de moléculas sonda que se acoplan con la sonda conjugada, o con el polímero, puede variarse sustancialmente. En algunas realizaciones, la relación de moléculas señal y moléculas sonda es de al menos 3, 4 o 5. Con frecuencia, la relación de moléculas señal y moléculas sonda es de al menos 6, 7, 8 o 9. En ocasiones la relación de moléculas señal y moléculas sonda es de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100. Pueden usarse diversas combinaciones de moléculas señal y sondas para formar las sondas conjugadas.

En algunas realizaciones de la presente invención, la señal de matriz puede detectarse por un sensor de imágenes digitales. En otras realizaciones, puede conseguirse detección con un dispositivo de carga acoplada (CCD), fotomultiplicador (PMT) o fotodiodo de avalancha. La medición del analito puede también realizarse, por ejemplo, en diversos esquemas de matrices por detección de conductancia eléctrica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la aplicación de sondas conjugadas en campos industriales, ambientales, biomédicos y biotecnológicos. Las sondas conjugadas de la presente invención pueden usarse en aplicaciones analíticas o de diagnóstico, y para detectar analitos en fase de solución, gas o sólida. Las sondas conjugadas pueden incorporarse y usarse en un biosensor, para detectar partículas orgánicas, inorgánicas o ambientales en un analito, o en una solución acuosa, fase no acuosa o fase gaseosa.

La detección de un polinucleótido diana amplificado o marcado puede realizarse por métodos usados para secuencias marcadas incluyendo, por ejemplo, detección de marcadores que se han incorporado en las cadenas de ADN de nueva síntesis o amplificadas. Por lo tanto, por ejemplo, pueden detectarse directamente marcadores fluorescentes o radiomarcadores. Otras técnicas de marcaje pueden requerir que se detecte un marcador tal como biotina o digoxigenina que se incorpore en el ADN durante la síntesis de cadenas mediante un anticuerpo u otra molécula de unión (por ejemplo, estreptavidina) que está marcada o que puede unirse a una molécula marcadora en sí misma, por ejemplo, una molécula marcada puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-estreptavidina o anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una molécula fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas Red y rodamina) o conjugarse con una molécula enzimáticamente activable. Sea cual sea el marcador en las moléculas de nueva síntesis, y si el marcador está directamente en el ADN o conjugado con una molécula que se une al ADN (o se une a una molécula que se une al ADN), los marcadores (por ejemplo, fluorescente, enzimático, quimioluminiscente o colorimétrico) puede detectarse por una diversidad de técnicas incluyendo un explorador de láser, una cámara CCD o una película de rayos X, dependiendo del marcador, u otro medio apropiado para detectar un marcador particular.

Puede detectarse un polinucleótido diana usando nucleótidos marcados (por ejemplo, marcador de dNTP-fluorescente para marcaje directo; dNTP-biotina o dNTP-digoxigenina para marcaje indirecto) incorporados en ADN amplificado durante la amplificación por PCR. Para el ADN marcado indirectamente, la detección se lleva a cabo por fluorescencia u otra estreptavidina conjugada con enzima o anticuerpos anti-digoxigenina. El método de PCR típicamente emplea detección de los polinucleótidos detectando marcador incorporado en los complementos de nuevas síntesis para las dianas polinucleotídicas. Para este fin, puede usarse cualquier marcador que pueda incorporarse en ADN a medida que se sintetiza, por ejemplo, fluoro-dNTP, biotina-dNTP o digoxigenina-dNTP, como se ha descrito anteriormente. La amplificación por PCR realizada usando uno o más cebadores universales en solución proporciona la opción de detectar las dianas amplificados en localizaciones en el soporte sólido detectando los cebadores universales. Por lo tanto, cuando se use más de un cebador universal, pueden detectarse diferencialmente cadenas diana de diferentes fuentes en el soporte sólido.

Los ejemplos adicionales de marcadores fluorescentes adecuados incluyen fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína, Texas red, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, 4' -6-diamino-2-fenilinodol (DAPI), y los colorantes de cianina Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. Con frecuencia, los marcadores fluorescentes son fluoresceína (5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida éster) o rodamina (5,6-tetrametil rodamina). En ocasiones los marcadores fluorescentes para codificación multicolor combinatoria son FITC y los colorantes de cianina Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. La absorción y emisión máximas, respectivamente, para estos fluorescentes son: FITC (490 nm; 520 nm), Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3.5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm: 672 nm), Cy5.5 (682 nm; 703 nm) y Cy7 (755 nm; 778 nm), permitiendo de este modo su detección simultánea.

En ocasiones se usan nucleótidos marcados para marcadores de detección ya que pueden incorporarse directamente durante la síntesis. Los ejemplos de marcadores de detección que pueden incorporarse en ADN o ARN amplificado incluyen análogos de nucleótidos tales como BrdUrd (Hoy y Schimke, Mutation Research 290:217-230 (1993)), BrUTP (Wansick *et al.*, J. Cell Biology 122:283-293 (1993)) y nucleótidos modificados con biotina (Langer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:6633 (1981)) o con haptenos adecuados tales como digoxigenina (Kerkhof, Anal. Biochem. 205:359-364 (1992)). Son nucleótidos marcados con fluorescencia fluoresceína-isotiocianato-dUTP, Cianina-3-dUTP y Cianina-5-dUTP (Yu *et al.*, Nucleic Acids Res.., 22:3226-3232 (1994)). Un marcador de detección análogo de nucleótido útil para ADN es BrdU (BUDR trifosfato, Sigma), y un marcador de detección análogo de nucleótido útil para ARN es biotina-16-uridina-5'-trifosfato (biotina-16-dUTP, Boehringer Mannheim). La fluoresceína, Cy3 y Cy5 pueden unirse a dUTP para marcaje directo. Cy3.5 y Cy7 están disponibles como conjugados de avidina o anti-digoxigenina para detección secundaria de sondas marcadas con biotina o digoxigenina.

En una realización, la invención se usa para detectar la unión de una estructura molecular con la ruta de señal. En esta realización, se propaga una señal a través de la ruta de señal. A medida que se propaga, se acopla con la estructura unida y se modula. El análisis de la respuesta modulada indica unión.

En otra realización, la invención puede usarse para identificar unión secundaria. Por ejemplo, la unión primaria puede ser la unión de un anticuerpo con la superficie conductora. La unión secundaria puede implicar la medición de la unión entre el anticuerpo inmovilizado y su antígeno en solución. Después de haberse detectado la unión primaria como se ha descrito en el párrafo anterior, la solución que contiene el anticuerpo se añade al dispositivo de bio-ensayo y la respuesta se mide de nuevo. La respuesta se compara con la respuesta de unión primaria. Un cambio indicaría que se ha producido un acontecimiento de unión.

En otra realización, la invención puede usarse en un formato de matriz. El dispositivo sensor o sistema biosensor tendrá múltiples sitios direccionables, cada uno de los cuales tiene unido a él un anti-ligando específico. Después de suministrar solución al dispositivo, se medirán y caracterizarán las respuestas de unión en cada sitio. Un dispositivo de este tipo puede usarse para medir y/o identificar la presencia de secuencias de ácido nucleico específicas en una muestra. En cada uno de los sitios direccionables se une una secuencia nucleica única como el anti-ligando. Tras la exposición a la muestra, se unirán secuencias complementarias en sitios apropiados. La respuesta en cada sitio indicará si se ha unido una secuencia. Dicha medición también indicarán si la secuencia unida es perfectamente coincidente con la secuencia anti-ligando o si hay uno o múltiples desapareamientos. Esta realización también puede usarse para identificar proteínas y clases de proteínas.

En otra realización, la presente invención puede usarse para generar una curva patrón o curva de valoración que se usaría posteriormente para determinar la concentración desconocida de un analito o ligando particular. Por ejemplo, podría unirse un anticuerpo al dispositivo sensor o sistema biosensor. El dispositivo podría exponerse a varias concentraciones diferentes del ligando y medirse la respuesta para cada concentración. Dicha curva también se conoce por los expertos en la materia como una curva de respuesta a dosis. Puede exponerse una muestra desconocida al dispositivo y medirse la respuesta. Su respuesta puede compararse con la curva patrón para determinar la concentración del ligando en la muestra desconocida.

Con frecuencia es deseable determinar ciertas cualidades de una molécula dada. Los ejemplos incluyen determinar la clase a la que pertenece una proteína, o qué tipo de polimorfismo es un gen dado u otra secuencia de ácido nucleico. Esto puede realizarse de varias maneras. Las proteínas se clasifican con frecuencia por número y tipos de homologías estructurales, o subestructuras particulares que se encuentran en las mismas o similares clases de

proteínas. Por ejemplo, las proteínas G habitualmente halladas en membranas celulares y que median en las rutas de transducción de señal entre el ambiente extracelular y el ambiente intracelular siempre tienen una estructura que atraviesa la membrana celular siete veces. Dicha estructura es prácticamente definitiva de una proteína G. Otras clases de proteínas tienen homologías estructurales similares, y como tal, cualquier método que pueda distinguir una clase de proteínas de otra basándose en estas homologías es de enorme utilidad en muchos de los campos de investigación biomédica. Dado que las propiedades dieléctricas de una molécula dada se determinan completamente por la geometría de la distribución de carga de dicha molécula, y dado además que la mayoría de las proteínas tienen una estructura o geometría única, entonces cada proteína puede determinarse de forma única midiendo las propiedades dieléctricas de la proteína. Por lo tanto una simple identificación dieléctrica, tal como las generadas por la presente invención, puede servir para identificar de forma única una proteína dada, y además, puede permitir la clasificación de la proteína en algunas clases previamente conocidas de proteínas. Puede añadirse un refinamiento adicional a la metodología de clasificación usando un grupo de antiligandos en el dispositivo de bio-ensayo que son específicos para subestructuras particulares de una proteína dada. Por ejemplo, puede utilizarse un grupo de anticuerpos que son específicos para subestructuras particulares tales como dominios, para la determinación de la existencia o ausencia de dichas subestructuras. Por lo tanto, puede caracterizarse cualquier proteína dada determinando tanto la presencia como la ausencia de ciertas subestructuras así como las propiedades dieléctricas de la proteína en sí misma. Refinamientos adicionales de esta estrategia de clasificación pueden incluir mirar la temperatura, pH, fuerza iónica, así como otros efectos ambientales en las propiedades anteriormente mencionadas.

También pueden caracterizarse ácidos nucleicos siguiendo un paradigma similar. Por ejemplo, puede saberse que un gen dado tiene una cierta secuencia de pares de bases. Con frecuencia en la naturaleza habrá pequeñas variaciones en esta secuencia. Por ejemplo, en el gen que codifica un canal de transporte iónico de cloruro en muchas membranas celulares hay mutaciones de pares de bases individuales habituales, o cambios. Dichos cambios conducen a una enfermedad llamada fibrosis quística en seres humanos. Por lo tanto la caracterización de una secuencia de ácido nucleico dada con respecto a pequeñas variaciones es de enorme importancia. Dichas variaciones se denominan con frecuencia polimorfismos, y dichos polimorfismos se detectan en la actualidad formando cadenas complementarias para cada uno de los polimorfismos conocidos. Puesto que cualquier gen dado puede tomar la forma de uno cualquiera de cientos incluso miles de polimorfismos, es con frecuencia una tarea ardua generar cadenas complementarias para cada polimorfismo. Usando la invención descrita en el presente documento, puede detectarse unión o hibridación no complementaria y distinguirse midiendo muchas de las mismas propiedades físicas que se han descrito en el párrafo anterior: las propiedades dieléctricas del acontecimiento de hibridación puede caracterizarse y correlacionarse con datos conocidos, determinando de este modo el tipo de hibridación que se ha producido, bien incompleta o bien completa. Por lo tanto, con un antiligando comprendido por una secuencia de ácido nucleico dada, pueden detectarse cientos de polimorfismos diferentes (como ligandos) por la caracterización del acontecimiento de unión. Un experto en la materia apreciará que son posibles refinamientos adicionales, tales como modificar las condiciones de rigurosidad para alterar el proceso de hibridación, o variar la temperatura y determinar el punto de fusión, lo que actúa como otro indicador de la naturaleza del proceso de hibridación.

En una realización, pueden caracterizarse interacciones de fármaco-receptor para determinar si un acontecimiento de unión dado da como resultado que el receptor se active o desactive, o alguna otra forma de efecto alostérico. Por ejemplo, puede usarse un receptor dado como un antiligando, y puede usarse un agonista conocido como el primer ligando. La interacción se caracteriza de acuerdo con una propiedad dieléctrica, u otra propiedad. Pueden ensayarse compuestos que se exploran con respecto a candidatos farmacológicos por sus propiedades de unión con el receptor. Por ejemplo, un candidato que se une y produce un valor de la propiedad similar al agonista conocido tiene una mayor probabilidad de ser un agonista. Este método puede usarse para caracterizar cualquier tipo de acontecimiento de unión de diana-receptor de interés, u otras clases de acontecimientos de unión.
En una realización, la sonda conjugada actúa como el sistema de reconocimiento para un ensayo inmunoabsorbente similar a un ensayo ELISA, o un ensayo de inmunotransferencia. Los conjugados de esta realización tienen un anticuerpo acoplado a este polímero, que es el anticuerpo primario del ensayo ELISA o ensayo de inmunotransferencia. Puede usarse un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, que cataliza una reacción que forma un producto coloreado, para reconocer el anticuerpo primario o algún resto del conjugado. Puede usarse un sustrato de la enzima para producir color para detección. En realizaciones adicionales, puede prepararse un kit para un sistema de ensayo, ensamblándose el kit usando, por ejemplo, un conjugado de polisacárido que se acopla al menos a una molécula de reconocimiento y al menos una molécula de señalización o especie marcadora. En estas realizaciones, la molécula de reconocimiento puede ser un anticuerpo, u otro producto químico o biomolécula.

Sistema sensor

En una realización, como se ilustra en la Figura 3, el sistema biosensor comprende un sensor de imágenes digitales **600** en una caja de luz baja **100**, una estación de lectura de alto rendimiento de datos **400**, y un ordenador de uso general **700**. La estación de lectura **400** tiene al menos un conector para insertar una caja de luz baja **100** que contiene un sensor de imágenes digitales CMOS **600**, conectando de este modo de forma eléctrica y mecánica la caja sensora con la estación de lectura. La estación de lectura puede conectarse al ordenador mediante bus serial universal (USB) **454**, por ejemplo, o por un dispositivo de interfaz de puestos paralelos diferente **452**.

Opcionalmente, la estación de lectura puede conectarse al ordenador mediante una interfaz de Ethernet **456**. Otras conexiones que pueden usarse en el sistema incluyen, pero sin limitación, Firewire, SCSI y PCMCIA. En realizaciones alternativas, el ordenador y la estación de lectura pueden reemplazarse por un ordenador portátil, o un asistente personal digital tal como una Palm Pilot.

En referencia a la realización de la Figura 3, un dispositivo lógico programable **460** en una placa madre en la estación de lectura **400** está en interfaz con un ordenador de uso general **700**, tal como un ordenador personal. El dispositivo lógico programable **460** también está en interfaz con el sensor de imágenes digitales **600**, y sincroniza la lectura de los datos de analito del sensor de imágenes digitales controlando las líneas de estado del sensor de imágenes digitales que señalizan el comienzo y el final de las imágenes, incluyendo las líneas de pulso de ciclo de datos de píxeles, fotograma y línea. El dispositivo lógico programable **460** controla el flujo de datos de imágenes del sensor de imágenes **600** y a la memoria FIFO local, donde la imagen se almacena hasta que el ordenador **700** pide una transferencia de los datos. Un ciclo típico para el dispositivo lógico programable **460** es recibir una orden del ordenador **700**, lo que provoca que el sensor produzca una imagen, capturar esa imagen en la memoria FIFO local en la placa madre en la estación de lectura **400**, y transferir los datos de imágenes capturadas al ordenador **700**. Una interfaz de usuario gráfica (GUI) proporciona un equipo para que el usuario del ordenador pida una captura de imágenes y ciclo de presentación, un modo de captura, o pida una secuencia continua, un modo de video en vivo. Se proporcionan filtros y herramientas de procesamiento de imágenes para permitir que el usuario maneje el sensor en condiciones de luz baja. Estas herramientas comprenden rutinas de procesamiento de imágenes para potenciar señales pequeñas del sensor, rutinas de software para coañadir imágenes, rutinas para restar imágenes de fondo o imágenes “oscuras” y rutinas para separar por filtrado el ruido. La GUI también proporciona al usuario control sobre los ajustes del sensor en placa. Esto permite que el usuario interaccione con el sensor, ajustando los parámetros en placa tales como tiempo de integración, aumento, e intervalo de conversor análogo a digital.

Como se ejemplifica por la realización de la Figura 3, la estación de lectura **400** incluye un conector **360** para unir la placa hija del sensor de imágenes y la caja de luz baja **100** con la estación de lectura **400**. Una característica de la disposición de esta realización es que el lector de analitos del sensor de imágenes digitales óptico se separa fácilmente de forma mecánica de la estación de lectura, en otras palabras, es desmontable. Un sensor de imágenes digitales desmontable proporciona provechosamente portabilidad del sensor de imágenes digitales, y funcionamiento de alto rendimiento del sistema biosensor. En funcionamiento, la caja de luz baja y el sensor de imágenes digitales pueden conectarse a la estación de lectura desde una cola, bien manual o robóticamente, y después de detectar los analitos, la caja de luz baja y el sensor de imágenes digitales pueden desconectarse, bien manual o automáticamente. Esta característica de conexión y uso inmediato del sistema biosensor permite el funcionamiento del sistema biosensor con una caja de luz baja y sensor de imágenes digitales que es una unidad desechable, por ejemplo. En realizaciones alternativas, la caja de luz baja y el sensor de imágenes digitales pueden regenerarse para su uso con una matriz diferente. En funcionamiento, se proporciona a la estación de lectura del sistema biosensor capacidad de inserción en caliente, en la que la caja de luz baja que contiene el sensor de imágenes ópticas puede conectarse con, y desconectarse de, la estación de lectura sin desactivar la fuente de alimentación ni de la estación de lectura ni del sensor de imágenes.

La estación de lectura incluye una interfaz microinformática de USB. Opcionalmente, puede incluirse una interfaz MICROSOFT EXTENDED CAPABILITIES PORT (ECP) con un interruptor controlado por el usuario para determinar la interfaz activa. El cable USB proporciona energía eléctrica que puede usarse por la placa madre de la estación de lectura. Para ECP, se proporciona un suministro de 9 VDC. Se proporciona un interruptor de reinicio manual para reiniciar la placa madre del biosensor, y el dispositivo lógico programable también puede reiniciarse manualmente.

En una realización, la presente invención es un método para potenciar la detección de señales de analitos mediante integración de tiempo. El rendimiento de datos y la medición de los parámetros de analitos en la diana se limitan por la relación de señal y ruido inherente en la detección de luz de la matriz por el sensor de imágenes digitales. La relación de señal y ruido puede aumentarse integrando la señal del analito durante varios milisegundos o más tiempo, con frecuencia de aproximadamente 10 milisegundos a aproximadamente dos minutos, en ocasiones de aproximadamente 30 a aproximadamente mil milisegundos, y en ocasiones de aproximadamente 50 a aproximadamente 600 milisegundos. En otra realización, la dependencia del tiempo de la señal de analito se registra almacenando una secuencia de fotogramas de señal de matriz, en la que cada fotograma se obtiene integrando la señal de analito durante un periodo de tiempo.

La interfaz microinformática de USB proporciona el reloj maestro para el sensor de imágenes y el dispositivo lógico programable. La producción del sensor de imágenes incluye datos de píxeles junto con línea de imagen y pulsos de fotogramas, que se pasan de vuelta a través del conector a la placa madre y se envían a una memoria FIFO. El pulso de fotogramas se usa para reiniciar el indicador de FIFO, y el pulso de líneas se usa como la autorización de escritura para la FIFO. Esta disposición almacena datos de píxeles en la FIFO comenzando con el píxel superior izquierdo como localización 0 (cero) de la FIFO.

Una vez que la imagen está en la FIFO, puede leerse por una de dos interfaces. En referencia a la realización de la Figura 3, se proporciona ECP en el que los datos de imágenes de la matriz se leen en un puerto paralelo (PP) **452,** un píxel por lectura. La lectura comienza cuando el PP **452** envía una petición inversa. Esto provoca que el

dispositivo lógico programable **460** habilite sus controladores de salida para el PP **452.** Después el dispositivo lógico programable impone el por.ciclo. El PP **452** responde con por.ack. La secuencia de ciclo ack continúa hasta que el ordenador **700** ha leído un fotograma de píxeles. El dispositivo lógico programable **460** usa el bit de datos de PP **452** cero como SDA, y el bit de datos de PP **452** 1 como SCL del bus I2C.

En otra realización, se leen los datos de imágenes en la FIFO por interfaz de USB. El funcionamiento del biosensor se potencia aumentando el ancho de banda de la transmisión de datos en serie en comparación con la transferencia de USB convencional. En la transferencia de USB convencional, se leería un paquete de datos de la FIFO, seguido de un intervalo de tiempo en el que la FIFO carga el siguiente paquete para leer. Por ejemplo, en una interfaz microinformática de USB convencional se lee un paquete de 63 píxeles de la FIFO y se envía mediante una de las líneas de datos en el USB. En una realización, se designan dos criterios de valoración en la FIFO para establecer dos memorias temporales. En el funcionamiento, se lee una memoria temporal y se transmite en una de las líneas de datos en el USB mientras que la otra memoria temporal se está cargando, aumentando de este modo el ancho de banda de transferencia usando el bus serial universal hasta el 100 %. El final de la transmisión de datos de la primera memoria temporal se produce inmediatamente antes, por ejemplo, uno o varios pulsos de ciclo antes, del inicio de la transmisión de datos en una línea de datos del bus serial universal de la segunda memoria temporal. Después se produce transmisión de datos en una línea de datos del bus serial universal de la segunda memoria temporal, cargando al mismo tiempo datos en el primer tampón. Estas etapas pueden repetirse hasta que se han enviado todos los datos que necesitan transferirse, aumentando de este modo la velocidad de transferencia de datos frente al USB convencional.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente realizaciones de la presente invención. Los ejemplos se proporcionan solamente para el fin de ilustrar y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención. Aunque se han descrito realizaciones ilustrativas de la presente invención, los expertos en la materia reconocerán que pueden cambiarse o modificarse sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención, y se pretende que abarquen todos estos cambios, modificaciones y disposiciones equivalentes que quedan dentro del verdadero alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se disolvió polisacárido lineal dextrano (Sigma) en agua desionizada a una concentración final de 1 % y después se esterilizó por autoclave. Se oxidó una alícuota de 0,40 ml de solución de dextrano con 44 microlitros de peryodato sódico 0,5 M durante una noche en oscuridad a temperatura ambiente en una plataforma de balanceo. El dextrano oxidado se limpió después por precipitación dos veces con NaOAc 0,3 M y 2xVol de EtOH. El sedimento se secó al aire y se volvió a disolver en 0,4 ml de tampón de $NaPO_4$ 5 mM, pH 7,2.

Se añadió un microlitro del dextrano oxidado a 7 microlitros de $NaCO_3$ 10 mM (pH 9,0) y 2 microlitros de oligonucleótidos (solución 2 μM en H_2O) en un tubo Eppendorf. Los oligonucleótidos variaron en longitud de 25 a 45 unidades, con una amina primaria introducida en el extremo 3' o 5' durante la síntesis. La reacción se llevó a cabo durante una noche en un baño de agua a 37 °C. Se añadió $NaBH_4$ al tubo y la mezcla se incubó adicionalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se precipitó con NaOAc 0,3 M y 2xVol de EtOH. El sedimento se disolvió en tampón TE y se resolvió una alícuota en un gel de agarosa al 1 % por electroforesis, y posteriormente se tiñó con EtBr. En este sistema de detección, los oligonucleótidos libres migraron cerca del frente salino, mientras que el oligonucleótido acoplado a dextrano migró mucho más lentamente.

Ejemplo 2

Se usaron polisacáridos ramificados de alto peso molecular, glucógeno (Sigma) y amilopectina (Sigma) para acoplar oligonucleótidos derivatizados con amina. Los grupos diol de estos polímeros se convirtieron a grupos aldehído por oxidación con $NaIO_4$. Se añadió peryodato sódico a 0,4 ml de solución de polisacárido 1 % (en H_2O) hasta una concentración final de 25 mM para glucógeno, y 20 mM para amilopectina, respectivamente. La oxidación se continuó en oscuridad durante una noche a temperatura ambiente en una plataforma de balanceo. El polisacárido oxidado se precipitó después dos veces con NaOAc 0,3 M y 2xVol de EtOH para retirar el exceso de $NaIO_4$. Después de secar al aire, los sedimentos se disolvieron en 0,4 ml de tampón de $NaPO_4$ 5 mM (pH 7,2). Se llevó a cabo acoplamiento de oligonucleótido derivatizado con amina y análisis en gel de los productos acoplados como se describe en el Ejemplo 1 para dextrano.

Ejemplo 3

Se prepara la sonda conjugada del Ejemplo 2 que tiene, de media, aproximadamente 1000 moléculas oligonucleotídicas acopladas a cada molécula de glucógeno a una densidad de acoplamiento de un oligonucleótido por cada 10 monómeros de glucosa.

Ejemplo 4

Se acoplan al mismo polisacárido la molécula de señalización 5'-ACTGCT-3 '(BP001) derivatizada en el extremo 5' con amina y en el extremo 3' con colorante fluorescente Cy5, y la molécula de sonda de reconocimiento oligonucleótido AKH108 (5'-CCGTGCAGATCTTAATGTGCCAGTAAAAG-3') derivatizado en el extremo 5' con un grupo amina. AKH108 hibrida con un producto de PCR amplificado con los cebadores de 5'-CCGTGCAGATCTTAATGTGC-3' y 5'-GCGCTGTACCAAAGGCATC-3' del genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae*, que corresponde a un fragmento dentro del gen que codifica 3-fosfoglicerato quinasa. El producto de PCR se aplica puntualmente en un portaobjetos de vidrio recubierto con poli (lisina) en un formato de micromatriz.

Para reticulación conjunta, se añaden 0,2 nmoles de AKH108 y 2 nmoles de BP001 a un tubo que contiene 20 nmoles de glucógeno oxidado en $NaCO_3$ 10 mM con un volumen final de 10 microlitros. La reacción se lleva a cabo a 37 °C durante una noche. Después se añade $NaBH_4$ al tubo a una concentración final de 4 mM y se incuba a temperatura ambiente durante otros 90 minutos. Los productos finales se precipitan con EtOH. Después de la centrifugación, los productos reticulados así como AKH108 libre bajan al precipitado, mientras que BP001 libre permanece en el sobrenadante y se descarta. El sedimento se disuelve con 10 μl de SPE 3X/SDS 0,1 % /BSA 1,0 mg/ml y se aplica a la superficie de la micromatriz. Después de hibridación a temperatura ambiente durante cinco horas, el portaobjetos se lava 3 veces con 10 μl de SSPE 0,1X/SDS 0,1 % nuevo, y se explora en un explorador de láser, y se observa el patrón punteado para el producto de PCR.

Ejemplo 5

Se usó el oligonucleótido 5'-NH_2-CCGATGCCTTAGTTTCAAGTGGTGCGATTGACATCGTTGTCAT-3', que hibrida específicamente con un producto de PCR amplificado a partir del gen RecA de *Enterococcus faecalis,* para reticular con el glucógeno y amilopectina. Los polisacáridos se oxidaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Para la reticulación, se mezclaron 20 nmoles del azúcar oxidado y 2 nmoles de los oligonucleótidos derivatizados con amina en tampón $NaCO_3$ 10 mM (pH 9,0) en un volumen final de 10 μl, y después se incubaron a 37 °C durante una noche. Al final de la reacción de acoplamiento, se añadió NaBH4 hasta una concentración final de 4 mM y se incubó durante otros 60 minutos a temperatura ambiente. Los productos finales se precipitaron con NaOAc 0,3 M y 2xVol de EtOH, después se disolvieron en $NaCO_3$ 10 mM (pH 9,0). Se usaron alícuotas de los oligonucleótidos reticulados para aplicar puntualmente en portaobjetos de vidrio tratado con epoxi. También se aplicó puntualmente en el mismo portaobjetos una cantidad equivalente de los oligonucleótidos mezclados con el polisacárido no oxidado como un control. Para hibridación en placa, se marcó el producto de PCR RecA con Alexa Fluor 546 (Molecular Probes Inc), disuelto en SSPE 3x/SDS 0,1 %/BSA 1,0 mg/ml y se aplicó a la superficie del portaobjetos de vidrio. Después de tres horas de hibridación a temperatura ambiente y lavados con SSPE 0,1x/SDS 0,1 %, el portaobjetos se exploró usando un explorador de láser. La señal puntual para el oligonucleótido acoplado con glucógeno fue de 5,86 en relación con el punto de glucógeno no oxidado de control, y la señal puntual para el oligonucleótido acoplado con amilopectina fue de 5,63 en relación con la amilopectina no oxidada de control.

Ejemplo 6

Para activación de carbodiimidazol (CDI), se añadieron 4 μl de CDI 0,5 M (en DMSO) a 10 μl de polisacárido 0,5 % en DMSO y 6 μl de DMSO. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas con agitación vorticial ocasional. Después se añadió 1 ml de n-butanol a cada tubo, se mezcló exhaustivamente por agitación vorticial y se centrifugó en una microcentrífuga. Después de retirar el butanol, los sedimentos se secaron al aire y se disolvieron en 10 μl de DMSO. Para acoplamiento de oligonucleótidos, se mezclaron 2,2 nmoles de oligonucleótidos derivatizados con amina con 5 μl de polisacárido activado por CDI 0,5 % en un volumen final de 20 μl. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días con agitación vorticial ocasional. Al final de las reacciones, se añadió 1 μl de etanolamina 10 % y se incubó adicionalmente durante 30 minutos, después se precipitó con EtOH. Los productos se disolvieron después en 10 μl de tampón TE y se analizaron por electroforesis en gel.

Ejemplo 7

Se usó un sensor de imágenes CMOS para detección en placa directa de señales de hibridación.

La microplaca desnuda de un sensor de imágenes monocromo PB0330 (Photobit) se unió a una placa hija con un conector lateral. Los cables de conexión se encapsularon en Epoxi y se secaron. La superficie de la microplaca se aclaró tres veces con dH_2O esterilizada por autoclave y se secó al aire. Para derivatizar la superficie con epoxi, se aplicó una solución de 2 % de (3-glicidoxipropil) trimetoxisilano en metanol a la superficie de la microplaca y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se lavó dos veces con metanol y se secó al aire.

Se aplicaron en puntos manualmente cuatro sondas de captura diferentes (100 pmoles/ml en tampón de $NaCO_3$ 50 mM, pH 10,5), por duplicado, en la superficie de microplaca tratada con Epoxi. Después de secarse los puntos, la superficie se lavó rápidamente una vez con etanolamina 1 % en $NaCO_3$ 50 mM (pH 10,5) y se incubó en la misma

solución de bloqueo durante 10 minutos a temperatura ambiente. La superficie se aclaró después cuatro veces con dH_2O esterilizada en autoclave.

Para hibridación en placa, la superficie de la microplaca se incubó con SSPE 3x/formamida al 50 %/BSA 1 mg/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente, después se hibridó con un producto de PCR (marcador de biotina en un extremo, como se describe posteriormente) en 20 ml de SSPE 3x/formamida al 50 %/BSA a 1 mg/ml (después de haberse calentado en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos y enfriarse rápidamente a 4 ºC). La hibridación se llevó a cabo a 30 ºC durante una noche en una cámara húmeda. A continuación, la superficie de la microplaca se lavó con SSPE 0,1x a temperatura ambiente cuatro veces, 5 minutos cada vez. Para unir el conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina con la biotina en el producto de PCR hibridado, la superficie de la microplaca se incubó en primer lugar con BSA 1 mg/ml en TBS a temperatura ambiente durante 20 minutos, después se incubó con Avidx-AP (Tropix) a una dilución 1:100 en TBS/BSA 1 mg/ml durante dos horas a temperatura ambiente. La superficie de la microplaca se lavó después con TBS cinco veces, 5 minutos cada vez a temperatura ambiente.

Para detectar la señal de hibridación en placa, la placa hija con TBS en la superficie de microplaca se insertó en el conector en la Estación de Lectura en una caja resistente a la luz. Se ejecutó un software patentando en un PC para recuperar una “imagen oscura” (es decir la imagen de fondo, I_{oscura}). Con la placa hija aún unida a la Estación de Lectura, se reemplazó el TBS con una solución de sustrato quimioluminiscente que incluía CDP-*star* y el potenciador Emerald II (ambos de Tropix) preparados de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se recuperó un fotograma (I) con un tiempo de integración de aproximadamente 0,1 s del sensor. Se trató $I - I_{oscuro}$ como una captura de señal real. El software tiene una subrutina incorporada que añade capturas procesadas sucesivas juntas y presentan el resultado como una imagen, extendiendo de este modo el tiempo de integración de señal.

Se descubrió que los siguientes ajustes de registro del sensor son óptimos en este punto:

Aumentos (Registros 53, y 43-46) al máximo; Tiempo de integración (Registros 9 y 10) a 0,1 segundos por fotograma; Compensación negativa análoga (Registros 32 y 57) al máximo; Etapa de ganancia (Registro 62) a 74. El resto de los Registros se dejaron en el ajuste por defecto.

Las sondas de captura y cebadores de PCR usados en el experimento descrito a continuación fueron los siguientes:

Neisseria meningitidis

Sonda de captura (1)

5’-amina-GGCAGAAGACGCGCTCAAACGT-TACGGTTTTTCAGAC-3’
Cebadores
5’-GACGACTACGCCTTGGAC-3’
5’-biotina-AGACGGCGTAGTCTTCCAAA-3’
Listeria monocytogenes

Sonda de captura (2)

5’-amina-TGACCGCGTTGTAACAAAACAC-CCATTCTATGACCGTGATTC-3’
Cebadores
5’-GTCATCTGGACAACTACTCCTT- 3’
5’-biotina-TGTCCAGGAGCTGTATGAAC-3’
Hemophilus influenzae

Sonda de captura (3)

5’-amina-CTTCTCACTTAGGTCGTCCAACT-GAAGGAGAATTCAAACCAG-3’
Cebadores
5’-CCGTGCAGATCTTAATGTGCC- 3’
5’-biotina- GCGCTGTACCAAAGGCATC-3’
Mycoplasma pneumoniae

Sonda de captura (4)

5’-amina-AAAGAGGAAACGCCAGCGGT-GATCTTCCGTGG-3’
Cebadores
5’-GTTAATGGTGTTGGCAAAACAAC-3’
5’-biotina- AACCGTCCCGAGGTGTC-3’

Las sondas de captura se reticularon con glucógeno oxidado como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos finales se disolvieron en $NaCO_3$ 50 mM (pH 10.5) a una concentración final de 100 pmoles/ml, y se aplicaron

puntualmente en una superficie de microplaca tratada con Epoxi por duplicado en el siguiente patrón, en el que 1 = *Neisseria meningitidis*, 2 = *Listeria monocytogenes*, 3 = *Hemophilus influenzae*, 4 = *Mycoplasma pneumoniae*:

1	2	3	4
1	2	3	4

La Figura 4 muestra los resultados de detección de hibridación usando un sensor de imágenes CMOS. El tiempo de integración para cada punto fue de aproximadamente 0,5 s. Para cada analito en la Figura 4, la imagen de la derecha muestra la matriz punteada y la imagen de la izquierda muestra los puntos detectados. Los puntos de la matriz ilustrados en la parte derecha de la Figura 4 se marcan con un círculo para mayor conveniencia de observación.

También se describen en el presente documento los siguientes aspectos:

1. Un conjugado para uso en la detección de analitos con un sensor que comprende un producto químico o una biomolécula acoplado a un polímero que contiene diol.
2. Un conjugado para uso en la detección de analitos con un sensor que comprende un producto químico o una biomolécula acoplado a un polisacárido lineal.
3. Un conjugado para uso en la detección de analitos con un sensor que comprende un producto químico o una biomolécula acoplado a un polisacárido ramificado.
4. Un conjugado para uso en la detección de analitos con un sensor que comprende un producto químico o una biomolécula acoplado a un polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo cercano a un enlace fosfodiéster.
5. Un conjugado para uso en la detección de analitos con un sensor que comprende un producto químico o una biomolécula acoplado a un polímero seleccionado del grupo que consiste en ARN, poli(T), poli(U) y poli(A).
6. Un conjugado que comprende un producto químico o biomolécula acoplado a un polisacárido ramificado seleccionado del grupo que consiste en amilosa, amilopectina, glucógeno, dextrano, celulosa, quitina, quitosano, peptidoglucano, glucosaminoglucano y mezclas de los mismos.
7. Un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6 donde el producto químico o la biomolécula es un oligonucleótido.
8. Un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6 donde el producto químico o la biomolécula es un ácido nucleico proteico.
9. Un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6 donde el producto químico o la biomolécula es una proteína.
10. Un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6 donde el producto químico o la biomolécula es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
11. Un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6 que comprende una pluralidad de productos químicos o biomoléculas que son de forma independiente iguales o diferentes, y que comprenden adicionalmente una pluralidad de especies marcadoras que son de forma independiente iguales o diferentes.
12. Un método para preparar un conjugado que comprende hacer reaccionar un polisacárido ramificado con un agente oxidante, formando de este modo un polisacárido ramificado que tiene grupos aldehído; y añadir un grupo amino reactivo a cada uno de una pluralidad de productos químicos o biomoléculas; y
acoplar una pluralidad en los grupos aldehído a la pluralidad de productos químicos o biomoléculas.
13. El método del aspecto 12 donde el agente antioxidante es peryodato sódico.
14. El método del aspecto 12 donde el acoplamiento de la pluralidad de grupos aldehído con al menos uno de la pluralidad de productos químicos o biomoléculas se realiza con un reticulador fotorreactivo.
15. Un método para preparar un conjugado que comprende
hacer reaccionar un polisacárido ramificado con un agente de carbonilación, formando de este modo un polisacárido ramificado que tiene grupos carbamato; y
añadir un grupo amino reactivo a cada uno de una pluralidad de productos químicos o biomoléculas; y
acoplar una pluralidad de los grupos carbamato a la pluralidad de productos químicos o biomoléculas.
16. El método del aspecto 15 donde el agente de carbonilación es N,N'-carbonildiimidazol o N,N'-disuccinimidilcarbonato.
17. un método para preparar un conjugado que comprende hacer reaccionar un polisacárido ramificado con un reticulador fotorreactivo heterobifuncional.
18. Un método para preparar un conjugado que comprende hacer reaccionar un polisacárido ramificado con ácido 3-maleimidopropiónico.
19. Una matriz para detectar analitos con un sensor de imágenes que comprende un conjugado como en uno cualquiera de los aspectos 1-6.
20. Una matriz como en el aspecto 19 donde el conjugado se aplica puntualmente en una superficie del sensor de imágenes.
21. Una matriz como en el aspecto 19 donde el conjugado se aplica puntualmente en un sustrato que es adyacente al sensor de imágenes.
22. Una matriz como en el aspecto 19, donde el sensor de imágenes comprende un sensor de imágenes CMOS.
23. Un método para detectar analitos que comprende poner en contacto un fluido que contiene analitos diana con una matriz en uno cualquiera de los aspectos 19-22.

24. Un método para aumentar la señal que surge de analitos en una matriz formada en un sensor de imágenes CMOS que comprende acoplar una pluralidad de sondas a una molécula seleccionada del grupo que consiste en un polisacárido, un hidrogel y un oligonucleótido ramificado.
25. Un método para detectar analitos en una matriz que comprende aumentar el tiempo de integración de marco de un sensor de imágenes CMOS, integrando de este modo la señal del analito.
26. El método del aspecto 25 que incluye además las etapas de almacenar la señal integrada y repetir la integración a intervalos temporales fijos.
27. Un dispositivo sensor que comprende,
un sensor de imágenes digitales óptico;
un recinto de luz baja; y
una matriz de sonda conjugada.

28. El dispositivo sensor del aspecto 27 donde el sensor de imágenes digitales óptico es un sensor de imágenes CMOS.
29. El dispositivo sensor del aspecto 27 donde el recinto de luz baja comprende además una apertura de entrada fluida que tiene un septo.
30. Un sistema biosensor que comprende,
una estación de lectura que tiene un primer conector;
un recinto portátil que comprende
un sensor de imágenes digital óptico;
un recinto de luz baja;
una matriz de sondas;
un segundo conector para unir el recinto portátil con el primer conector, uniendo de este modo el recinto portátil con la estación de lectura.
31. El sistema biosensor del aspecto 30 donde el segundo conector es un conector de borde de circuito impreso.
32. El sistema biosensor del aspecto 30 donde la estación de lectura comprende un medio de circuito para cambio en caliente del recinto portátil.
33. El sistema biosensor del aspecto 30 que comprende además un medio para enfriar el sensor de imágenes digitales óptico.
34. Un kit que tiene partes componentes capaces de ensamblarse en un sistema de ensayo que comprende un conjugado de polisacárido acoplado a al menos una molécula de reconocimiento y al menos una molécula de señalización.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz para detectar analitos con un sensor de imágenes, comprendiendo la matriz:

- un sensor de imágenes digital óptico semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS) que comprende como su capa superior una capa de pasivación transparente; y
- una pluralidad de sondas de conjugados unidas covalentemente con dicha capa de pasivación transparente;

donde al menos un conjugado de la pluralidad de conjugados comprende un resto de sonda de unión a diana acoplado covalentemente con un polímero.

2. Una matriz de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es un polisacárido ramificado seleccionado de amilosa, amilopectina, glucógeno, dextrano, celulosa, quitina, quitosano, peptidoglucano, glucosaminoglucano y mezclas de los mismos.

3. Una matriz de acuerdo con la reivindicación 2, donde el polisacárido ramificado es dextrano.

4. Una matriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el resto de sonda de unión a diana es un oligonucleótido, un ácido nucleico peptídico, una proteína o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

5. Una matriz de acuerdo con la reivindicación 4, donde el resto de sonda de unión a diana es un oligonucleótido.

6. Una matriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el resto de sonda de unión a diana se acopla con el polímero mediante un grupo de enlace.

7. Una matriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el resto de unión a diana se acopló covalentemente con el polímero mediante reacción con un reticulador fotorreactivo o un reticulador fotorreactivo heterobifuncional.

8. Una matriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el polímero es un polisacárido, y donde el resto de unión a diana se acopló covalentemente con dicho polisacárido mediante reacción con un agente de carbonilación o un agente oxidante.

9. Un método para detectar analitos, comprendiendo el método poner en contacto un fluido que contiene analitos diana con una matriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

FIGURA 1

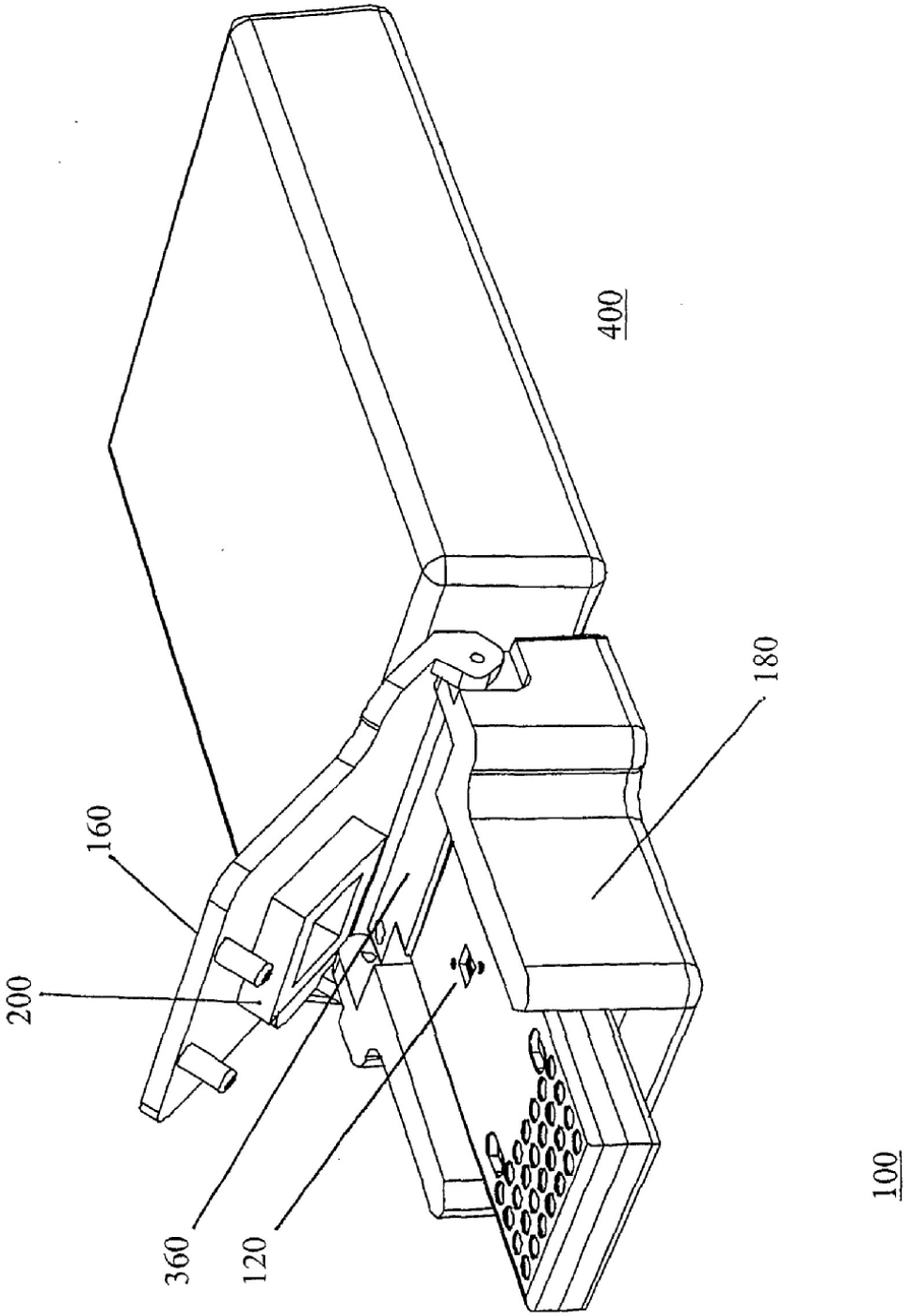


FIGURA 2

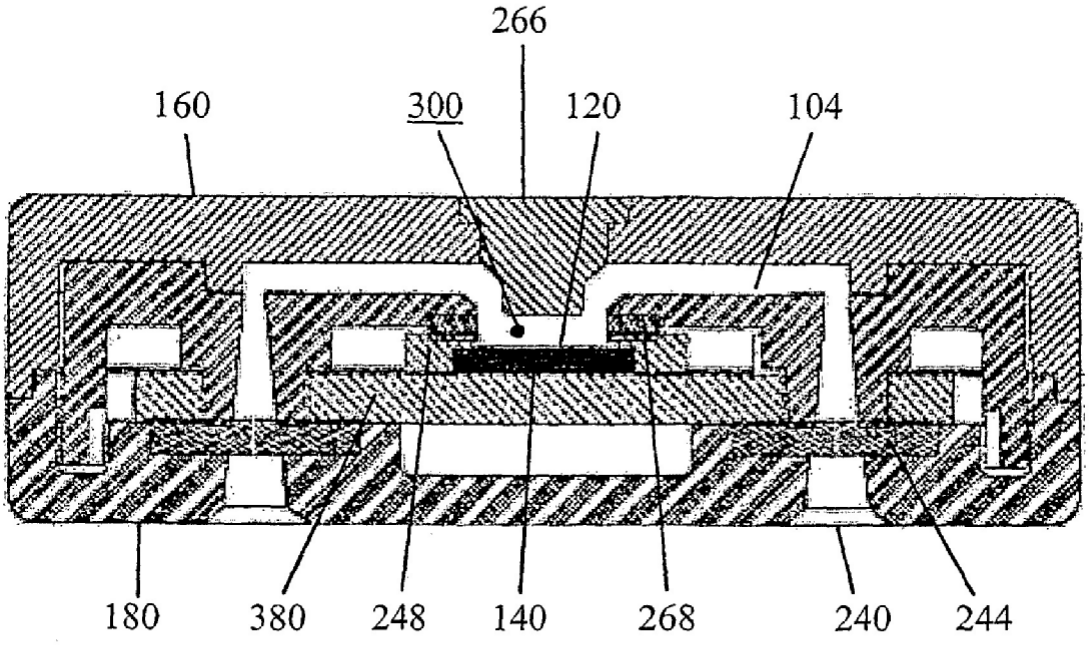


FIGURA 3

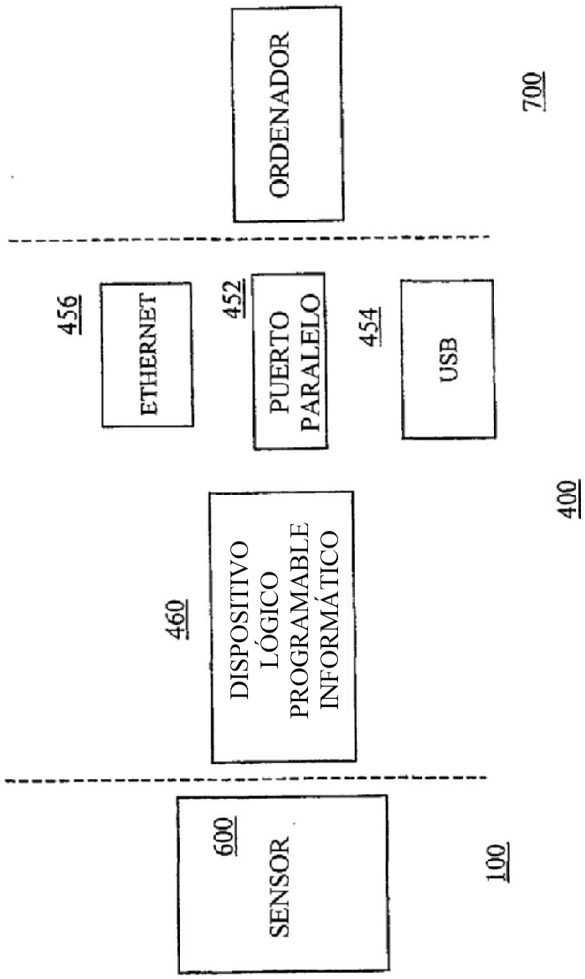
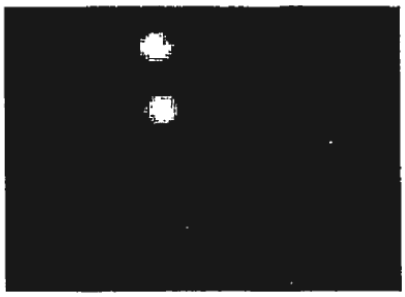
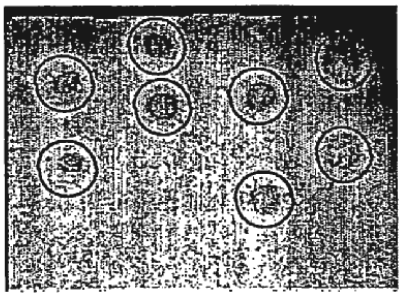

ORDENADOR
700
456
ETHERNET
452
PUERTO PARALELO
454
USB
400
460
DISPOSITIVO LÓGICO PROGRAMABLE INFORMÁTICO
600
SENSOR
100

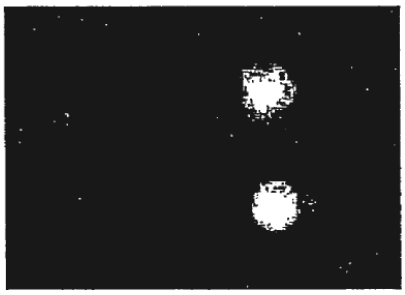
FIGURA 4

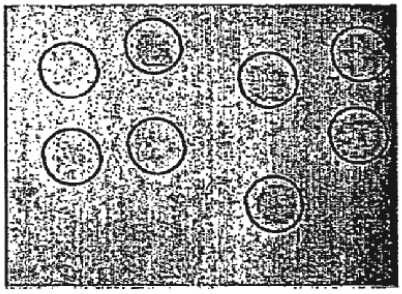
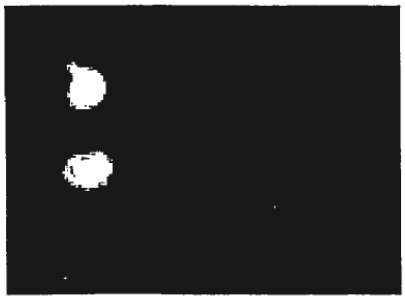
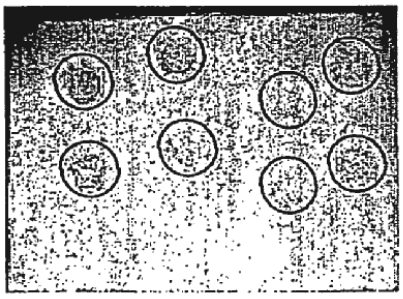
1. Listeria monocytogenes





2. Hemophilus influenzae





3. Neisseria meningitidis