

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 154**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/US2012/066410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13078424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12851735 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2783018**

54 Título: **Biosensor versátil y sensible**

30 Prioridad:

23.11.2011 US 201161563130 P

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

23.03.2017

73 Titular/es:

**THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY
OF TORONTO (100.0%)
27 King's College Circle
Toronto, ON M5S 1A1, CA**

72 Inventor/es:

**KELLEY, SHANA, O.;
ZARAGOZA, ALEXANDRE;
SARGENT, EDWARD, HARTLEY;
DAS, JAGOTAMOY y
CEDERQUIST, KRISTIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 606 154 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

Biosensor versátil y sensible

5 Campo de la invención

El campo de la invención es los dispositivos analíticos para caracterizar o detectar una amplia gama de analitos, incluyendo los ácidos nucleicos, las proteínas y las moléculas pequeñas.

10 Antecedentes

Resulta sumamente deseable desarrollar sensores universales que puedan detectar una amplia gama de diferentes dianas moleculares. Por ejemplo, tales plataformas versátiles pueden proporcionar potencialmente una única solución a pruebas que se ejecuten utilizando diferentes tipos de instrumentación. Sin embargo, hasta la fecha, se han desarrollado muy pocos sistemas de detección universales y ninguno tiene la suficiente sensibilidad para el análisis de muestras o el uso clínico directos. Adicionalmente, aquellos métodos de detección que sean rápidos y más sensibles que los disponibles en la actualidad cubrirán necesidades no satisfechas en la detección de drogas, el diagnóstico médico, las pruebas en el punto de atención y la monitorización del medio ambiente.

20 La detección electroquímica es una modalidad atractiva para tales sensores universales, ya que no se basa en sistemas ópticos complejos y relativamente frágiles, y la superficie del sensor puede fabricarse como un microchip compacto y relativamente barato que contenga un conjunto de sensores, con diferentes especificaciones, que puedan leerse esencialmente de manera simultánea. En los documentos WO2008018833, WO200052456 y US2007099211 de Hiroshi Aoki y otros (the Analyst, 2003, 128:681-685) se dan a conocer ejemplos de métodos de
25 detección electroquímica. Se han desarrollado propuestas de detección que informan sobre los cambios en el sistema electrostático de una monocapa inmovilizada sobre un sensor, con diversas estrategias de lectura, incluyendo transistores de efecto de campo (Tian, B. y otros (2010), Science 13:830-834), micropalanca (Wu, G. y otros (2001) Nat. Biotechnol. 19:856-860), y sensores electroquímicos (Drummond, TG; Hill, MG, y Barton, JK (2008) Nat. Biotechnol. 21:1192-1199). Sin embargo, sigue siendo difícil obtener un método eficaz que pueda detectar con
30 sensibilidad diversos analitos. Los métodos de señalización electroquímicos son especialmente llamativos de cara a una detección rápida, sensible, portátil y rentable. Un sistema electroquímico ha resultado prometedor de cara a una detección versátil, pero con una sensibilidad limitada a los analitos de ácidos nucleicos que requieren una amplificación enzimática compleja y lenta de las secuencias diana antes de la detección (Lai, R.L. y otros (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. 103:4017-4021).

35 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

40 Los dispositivos y métodos descritos en el presente documento proporcionan un nuevo enfoque a la detección electroquímica que permite una excelente sensibilidad a una amplia gama de analitos, incluyendo los ácidos nucleicos, las proteínas y las moléculas pequeñas. En ciertas realizaciones, se inmoviliza una sonda de secuencia o sonda de aptámero sobre una superficie de sensor que detecta la carga local. Esta sonda de secuencia o sonda de aptámero se expone a un pseudo-ligando o neutralizador, que se acompleja con la sonda de secuencia o sonda de
45 aptámero y tiene una carga opuesta a la misma, reduciendo de este modo la magnitud de la carga total o global que está presente en el medio ambiente local de la sonda. En ciertas realizaciones, se pone en contacto con la sonda una muestra, que puede contener un analito. El analito de interés, si está presente en la muestra, forma un complejo con la sonda de secuencia o sonda de aptámero. La formación del complejo desplaza el neutralizador, cambiando así el estado de carga del ambiente local de la sonda, por ejemplo al generar una densidad de carga más alta cerca de la superficie de ensayo, que se detecta posteriormente. El neutralizador puede contener uno o más emparejamientos incorrectos de secuencia, con el fin de mejorar la eficiencia de desplazamiento de la sonda de secuencia o sonda de aptámero por parte del analito.

50 Puede utilizarse cualquier superficie de sensor adecuada. En ciertas realizaciones, la superficie del sensor proporciona una respuesta que es dependiente de la carga. En ciertas realizaciones, la superficie del sensor es un electrodo de detección electroquímica nanoestructurado. En ciertas realizaciones, la superficie del sensor es un transistor de efecto de campo, una micropalanca, o un sensor electroquímico. En ciertas realizaciones, se usan al menos dos superficies de sensor con diferentes sondas fijadas, que son capaces de formar complejos con diferentes analitos.

60 El analito puede ser cualquier sustancia o químico de interés en un procedimiento analítico, incluyendo sin limitación ácidos nucleicos, proteínas y moléculas pequeñas. En una realización, el analito de interés puede ser una molécula pequeña, incluyendo pero sin estar limitado a, un fármaco terapéutico, una droga, un contaminante del medio ambiente, y nucleótidos libres. En tal realización, la sonda puede ser un aptámero configurado para fijar la molécula
65 pequeña, y puede incluir un neutralizador que se acompleje con la sonda y se vea desplazada por la molécula pequeña.

En ciertas realizaciones, pueden modificarse las estabildades relativas entre la sonda y el pseudo-ligando, la sonda y el analito, y el analito y el pseudo-ligando mediante la manipulación de la temperatura. En ciertas realizaciones, pueden modificarse las estabildades relativas entre la sonda y el pseudo-ligando, la sonda y el analito, y el analito y el pseudo-ligando mediante la composición de una solución tampón en la que se formen los complejos.

5 En ciertas realizaciones, el analito de interés puede ser un ácido nucleico diana, incluyendo, pero sin estar limitado a, ADN, ARN y ácido nucleico péptido (APN). En tales realizaciones, la sonda puede ser una secuencia de ácido nucleico que sea al menos parcialmente complementaria al analito de ácido nucleico, y puede incluir un neutralizador que se acompleje con la sonda de secuencia y se vea desplazado por el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la sonda puede comprender un ácido nucleico, tal como ADN o APN. En ciertas realizaciones, el pseudo-ligando puede comprender un APN.

15 En ciertas realizaciones, el analito de interés puede ser una proteína o un fragmento de proteína. En tales realizaciones, la sonda puede ser un aptámero configurado para ligarse con la proteína o fragmento de proteína, y puede incluir un neutralizador que se acompleje con el aptámero de la sonda y se vea desplazado por la proteína o el fragmento de proteína. En ciertas realizaciones, el analito de interés puede ser una molécula no cargada. En ciertas realizaciones, el analito es una molécula pequeña con un peso molecular inferior a 500 daltons aproximadamente.

20 En ciertas realizaciones, el analito de interés se liga al neutralizador con una afinidad elevada. En tales realizaciones, la formación de un complejo entre el neutralizador y el analito libera el neutralizador de la sonda, lo que provoca un aumento de la magnitud de la carga cerca de la superficie del sensor. En tales realizaciones, el neutralizador puede incorporar uno o más emparejamientos incorrectos de las bases con el fin de reducir su afinidad con la sonda.

25 Breve descripción de los dibujos

30 Los objetos y ventajas anteriores, y otros, resultarán evidentes tras considerar la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que los mismos caracteres de referencia se refieren a las mismas partes.

La FIG. 1A ilustra el método de detección electrostática de la técnica anterior, que utiliza una sonda electronegativa sobre una superficie de sensor.

35 La FIG. 1B ilustra una realización en la que se genera un gran cambio en la carga cerca de la superficie de detección cuando un analito desplaza un pseudo-ligando, de una sonda cargada inmovilizada sobre la superficie de detección.

La FIG. 2 muestra un proceso ilustrativo para detectar un analito de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIG. 3A ilustra una realización en la que iones indicadores cargados se ven atraídos hacia la sonda al liberar el neutralizador y fijar una diana.

40 La FIG. 3B muestra un chip sensor ejemplar que contiene múltiples electrodos de detección nanoestructurados.

La FIG. 3C muestra un electrodo de detección nanoestructurado ejemplar.

La FIG. 4 muestra un sistema ejemplar de detección de un analito, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIG. 5 muestra una lista de secuencias ilustrativas de la sonda y del neutralizador.

45 La FIG. 6A muestra un biosensor de ATP ilustrativo, en el que se produce el desplazamiento de un neutralizador con respecto a una sonda de aptámero de ADN de un electrodo de detección, cuando el ATP se acompleja con una sonda de aptámero.

50 La FIG. 6B muestra voltamogramas diferenciales de impulsos ilustrativos para un biosensor de ATP, en ausencia de un neutralizador (sólo aptámero), después de que el neutralizador se haya acomplejado con la sonda de aptámero (+ neutralizador), y tras el desplazamiento del neutralizador con respecto a la sonda de aptámero por parte del ATP (+ ATP).

La FIG. 6C muestra la relación entre la fuerza de la señal y la concentración de ATP en un biosensor de ATP ilustrativo.

La FIG. 6D muestra la dependencia del tiempo para el cambio de la señal, observada a partir de un biosensor de ATP ilustrativo al añadir ATP.

55 La FIG. 7A muestra un biosensor de cocaína ilustrativo, en el que se produce el desplazamiento de un neutralizador con respecto a una sonda de aptámero de un electrodo de detección, cuando la cocaína se acompleja con la sonda de aptámero.

La FIG. 7B muestra voltamogramas diferenciales de impulsos ilustrativos para un biosensor de cocaína, ante la presencia de cocaína (+ cocaína) y la ausencia de cocaína (- cocaína).

60 La FIG. 7C muestra la relación entre la intensidad de señal y la concentración de cocaína en un biosensor de cocaína ilustrativo.

La FIG. 8A muestra un biosensor de ácido nucleico ilustrativo, en el que se produce el desplazamiento de un neutralizador con respecto a una sonda de secuencia inmovilizada sobre un electrodo de detección, cuando un ácido nucleico diana se acompleja con la sonda de secuencia.

65 La FIG. 8B muestra voltamogramas diferenciales de impulsos de un biosensor de ADN, ante la ausencia de un neutralizador (solamente sonda), una vez que el neutralizador se ha acomplejado con la sonda de secuencia

(+ neutralizador), y tras desplazarse el neutralizador con respecto a la sonda de secuencia 1 pM de un ADN diana complementario (+ ADN diana) de 20 mer.

La FIG. 8C muestra la relación entre la intensidad de señal y la concentración del ADN diana complementario, de 20 mer, para un biosensor de ADN.

La FIG. 8D muestra la relación entre la intensidad de señal y la concentración total de ARN de *E. coli*, para un biosensor que utiliza una sonda complementaria al *rpoB*.

La FIG. 8E muestra la relación entre la intensidad de señal y los lisados obtenidos a partir de diferentes concentraciones de *E. coli*, para un biosensor ilustrativo que utiliza una sonda complementaria al *rpoB*.

La FIG. 9A muestra un biosensor de proteína ilustrativo, en el que se produce el desplazamiento de un neutralizador con respecto a una sonda de aptámero inmovilizada sobre un electrodo de detección, cuando una proteína (en este caso, trombina) se acompleja con la sonda de aptámero.

La FIG. 9B muestra voltamogramas diferenciales de impulsos para un biosensor de trombina ilustrativo, en ausencia de un neutralizador (aptámero solamente), después de que el neutralizador se haya acomplejado con la sonda de aptámero (+ neutralizador), y tras verse desplazado el neutralizador con respecto a la sonda de aptámero por 100 pM de trombina (+ trombina).

La FIG. 9C muestra voltamogramas diferenciales de impulsos para un biosensor de trombina, ante la presencia de la proteína de bloqueo no específica albúmina de suero bovino (+ BSA) y ante la ausencia de la albúmina de suero bovino (- BSA).

La FIG. 9D muestra la relación entre la fuerza de señal y la concentración de trombina para un biosensor de trombina. La línea discontinua horizontal muestra la señal generada por 100 nM de albúmina de suero bovino, una proteína no específica.

La FIG. 10 muestra un biosensor de ácido nucleico ilustrativo, en el que se produce el desplazamiento de un neutralizador con respecto a una sonda de secuencia inmovilizada sobre un electrodo de detección, cuando un ácido nucleico diana se acompleja con el neutralizador.

Descripción detallada

En la FIG. 1A se ilustran los principios subyacentes de los ensayos de la técnica anterior. En los ensayos de la técnica anterior, como se ilustra en la FIG. 1A, se fija una sonda de molécula no acomplejada a la superficie de un electrodo de detección. Como resultado, la carga del sensor se determina únicamente mediante la sonda de molécula antes de introducir el analito, siendo el analito un ligando que se liga a la sonda de molécula y forma un complejo estable con la misma. Tras la fijación por parte del analito, la carga del analito cambia el estado de carga en la superficie del electrodo. Este enfoque conlleva limitaciones significativas en los métodos de detección basados en la carga de la técnica anterior. En primer lugar, la señal de fondo puede ser elevada debido a la carga inherente de la molécula de la sonda, que a menudo es un ácido nucleico electronegativo. Como resultado, la relación entre la señal, que resulta al acomplejarse el analito con la sonda, y la señal de fondo puede ser baja si la carga de la sonda es muy elevada en relación con la carga del analito, lo que resulta en una sensibilidad limitada del ensayo. Como resultado, tales ensayos a menudo requieren una amplificación (mediante métodos tales como PCR) del analito tediosa, costosa, y dada a errores, antes del análisis. Los analitos no cargados que no producen un cambio significativo en la carga en la superficie del electrodo cuando se acomplejan con la sonda, en particular los analitos de bajo peso molecular, pueden resultar indetectables. Por último, la señal de detección a es menudo una reducción de la magnitud de carga en la superficie del electrodo, como resultado de la formación de complejos entre la sonda fijada y el analito. Esto conlleva una estructura de ensayo de tipo "sin señal" en la que la presencia del analito está indicada por la ausencia de señal, una configuración que a menudo resulta en una alta tasa de determinaciones de falsos positivos. Los métodos de detección de la técnica anterior dependen esencialmente de la naturaleza de la amplitud de señal, la relación entre señal y fondo, y el signo de cambio de señal del analito. Desafortunadamente, la elección del analito no es una variable que el diseñador del ensayo pueda cambiar, sino que más bien es un requisito de la prueba.

Las realizaciones ilustradas en la FIG. 1B introducen una nueva libertad en el diseño del carácter electrostático de la superficie del sensor. Se fija una molécula de sonda a la superficie de un electrodo y se forma un complejo con un neutralizador, siendo el neutralizador un pseudo-ligando que tenga afinidad por la sonda y neutralice la carga de la sonda durante la formación del complejo. En ciertas realizaciones, puede suministrarse al usuario un dispositivo con el neutralizador ya acomplejado con la sonda. En ciertas realizaciones, el usuario puede aplicar el neutralizador a un elemento que contenga la sonda, tal como un electrodo de detección, antes de añadir el analito. En otra realización más, el usuario puede aplicar el neutralizador a un elemento que contenga una sonda de forma esencialmente simultánea a la adición del analito. El neutralizador actúa como un pseudo-ligando que forma un complejo reversible con la sonda, y que puede desplazarse mediante un ligando o analito que forme un complejo con la sonda. Con este fin el neutralizador puede incorporar emparejamientos incorrectos de pares de base con la sonda, de manera que el analito de interés fije la sonda con más fuerza, más rápidamente y/o con mayor firmeza, lo que lleva al desplazamiento del neutralizador. También puede modificarse la afinidad del neutralizador a la sonda utilizando cambios de temperatura o cambios en la composición del tampón. Tales cambios en la composición del tampón incluyen, pero no se limitan a, cambios en la resistencia iónica, la presencia o ausencia de cationes multivalentes, la presencia o ausencia de disolventes orgánicos, la presencia o ausencia de agentes caotrópicos, y la presencia o ausencia de polímeros hidrófilos.

El neutralizador puede ser cualquier molécula que forme un complejo con la sonda de molécula. En ciertas realizaciones, dicho complejo tiene una magnitud de carga reducida en comparación con la sonda fijada, de tal manera que el neutralizador se desplace con respecto a tal complejo al añadir el analito diana. El neutralizador puede ser un análogo de ácido nucleico que incorpore una estructura cargada positiva o neutralmente. El neutralizador también puede ser un análogo de ácido nucleico que incorpore una estructura cargada negativamente, pero que tenga una carga neta positiva. En ciertas realizaciones, el neutralizador es un conjugado de ácido nucleico péptido y aminoácidos catiónicos que se ligan específicamente con una sonda electronegativa, de modo que la carga del complejo neutralizador-sonda sea menos electronegativa que la de la sonda sola. En otras realizaciones, el neutralizador puede incorporar análogos de ácido nucleico morfolino o análogos de ácido nucleico de metilfosfonato.

El uso de un pseudo-ligando desplazable permite que diversas realizaciones superen las limitaciones de los ensayos de carga de detección tradicionales. En ciertas realizaciones, se suprime la señal de fondo en el ensayo mediante una compensación de carga diseñada por el diseñador del ensayo, mejorando de este modo la detección de la señal. En tales realizaciones, los cambios de señal que corresponden a la presencia de un analito no sólo se determinan por la carga molecular del ligando del analito, sino también por la carga inherente de la sonda de molécula, que se descubre tras liberar el neutralizador. Esto permite detectar analitos que no produzcan cambios significativos en la carga de la sonda durante la formación de complejos, lo que permite utilizar ensayos con una gama de analitos de bajo peso molecular que la detección electroquímica no permitía anteriormente. Tales moléculas de bajo peso molecular habitualmente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons, y pueden incluir, pero no se limitan a, nucleótidos y análogos de nucleótidos, drogas ilegales, drogas terapéuticas, y contaminantes del medio ambiente.

En ciertas realizaciones, la supresión de la señal de fondo también mejora en gran medida la relación entre la señal específica del analito y la señal de fondo. Sorprendentemente, esta reducción en la relación entre la señal específica del analito y la señal de fondo permite la detección directa de analitos de ácido nucleico, eliminando la necesidad de una amplificación por PCR de las muestras, costosa y lenta antes, de la caracterización o la detección.

En ciertas realizaciones, el signo y la amplitud de la señal no sólo están determinados por la carga del analito, sino también por la de la sonda. Esto permite diseñar un ensayo "con señal" en el que la presencia del analito está indicada por un aumento de magnitud de la señal medida. Dichos ensayos de tipo con señal en general muestran una baja tasa de resultados con falsos positivos en relación con los ensayos con una estructura de tipo sin señal.

La FIG. 2 muestra un proceso ilustrativo 200 para detectar un analito de acuerdo con ciertas realizaciones. El proceso comienza en la etapa 202. En la etapa 204, se forma un primer complejo reversible entre una sonda fijada sobre una superficie de sensor y un pseudo-ligando. El pseudo-ligando puede ser parcialmente complementario a la sonda, y tener una carga que sea opuesta a la de la sonda. En la etapa 206, se pone en contacto una muestra que puede contener el analito con el primer complejo situado en la superficie del sensor. Si el analito está presente en la muestra, en la etapa 208 el analito desplaza el pseudo-ligando, y se forma un segundo complejo. En ciertas realizaciones, el analito desplaza el pseudo-ligando, y se forma un segundo complejo entre el analito y la sonda. En ciertas realizaciones, el analito desplaza el pseudo-ligando y se forma un segundo complejo entre el analito y el pseudo-ligando. En la etapa 210, se detecta la presencia del segundo complejo, que indica que el analito está presente en la muestra. El proceso termina en la etapa 212. Debe comprenderse que las etapas del proceso 200 son meramente ilustrativas, y que ciertas etapas pueden efectuarse y/o realizarse de forma simultánea en otro orden adecuado, sin apartarse del alcance de la invención. En ciertas realizaciones, el proceso 200 también incluye una etapa de comunicación del resultado de la detección (no se muestra), por ejemplo mostrando visualmente un indicador (por ejemplo, representando un texto, símbolo, o indicador codificado por color) a un usuario del proceso. En ciertas realizaciones, la etapa de comunicación de los resultados incluye almacenar el resultado en una memoria local o remota asociada con el proceso 200, o enviar un mensaje a un usuario del proceso 200.

La FIG. 3A muestra una realización ilustrativa que se sometió a prueba usando un sistema indicador electrocatalítico, que proporciona una señal proporcional a la magnitud del cambio de carga en las superficies de electrodo. Para medir el cambio de la carga en la superficie del sensor, se utilizó un sistema indicador catalítico 300, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, para generar una señal que pueda monitorizarse mediante voltametría diferencial de impulsos (DPV) en presencia, por ejemplo, de una molécula 310 de bajo peso molecular, tal como un nucleótido y un análogo de nucleótido, una droga ilegal, una droga terapéutica, y un contaminante del medio ambiente. En este sistema ilustrativo, el aceptor de electrones primario 308, que puede ser cualquier aceptor de electrones adecuado tal como $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, se ve atraído electrostáticamente a la superficie 302 de electrodo en proporción a la cantidad de ácido nucleico 304 portador de fosfato. Cuando se utiliza $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ durante la lectura electroquímica, la formación de un ciclo redox por parte de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ regenera químicamente Ru(III), lo que amplifica la señal de manera significativa. Esta realización ilustrativa está libre de etiquetas covalentes y no requiere el procesamiento previo de las muestras. Cabe esperar corrientes catalíticas altas cuando sólo se inmovilizan sondas de aptámero de ADN 304 sobre los sensores 302, debido a la afinidad electrostática de Ru(III) con los grupos fosfato de la cadena principal de ADN, sin embargo, en los ensayos probados estas corrientes se veían fuertemente atenuadas en la presencia del neutralizador 306. Este sistema indicador puede utilizarse con microelectrodos nanoestructurados, que pueden fabricarse sobre la superficie de un chip.

Las FIGS. 3B y 3C muestran un sensor ilustrativo utilizado en una realización ejemplar. Para fabricar el sensor, se utilizó estampado fotolitográfico para producir un chip microelectrónico 320 con un conjunto de sensores 322. Los chips utilizados en este estudio poseían veinte sensores. Con el uso de una oblea 324 de silicio recubierta con una capa 326 de oro (Au) y una capa 328 de SiO₂ como base, se estamparon terminales de contacto y conectores sobre chips individuales. Se utilizó entonces una sobrecapa de Si₃N₄ para pasivar la superficie del chip. Para proporcionar una plantilla para el crecimiento de sensores electrodepositados, se utilizó a continuación fotolitografía para abrir unas aberturas 330 de 5 μm en el Si₃N₄. A continuación, se empleó electrodeposición de oro para hacer crecer unas microestructuras fractales 332, cuyo tamaño y morfología puede modularse mediante el tiempo de deposición, la potencial concentración de Au, un electrólito de soporte, y un protocolo de recubrimiento mediante métodos conocidos en la técnica. Dado que las nanoestructuras aumentan la sensibilidad del ensayo de manera significativa, se recubrieron estructuras de Au con una capa delgada de Pd, para formar unos sensores finamente nanoestructurados (FIG. 3C). Debe comprenderse que los materiales, dimensiones y procesos utilizados para generar los sensores son meramente ilustrativos y que pueden usarse otros materiales, procesos, o dimensiones adecuados sin apartarse del alcance de la divulgación.

En ciertas realizaciones, se fabricaron chips utilizando varias obleas de silicio de 2,54 cm, que se pasivaron con una gruesa capa de dióxido de silicio formada térmicamente. A continuación, se depositaron 25 nm de Ti. Posteriormente se depositó sobre el chip una capa de oro de 350 nm, usando evaporación de oro asistida por haz de electrones, y se modeló usando fotolitografía estándar y un proceso aditivo. A continuación, se depositó una capa de 5 nm de Ti. Se depositó una capa de 500 nm de Si₃N₄ aislante mediante deposición de vapor químico. A continuación se imprimieron unas aberturas de 5 μm sobre los electrodos, usando fotolitografía estándar, y se expusieron unas áreas de conexión de 0,4 mm x 2 mm mediante fotolitografía estándar.

Para fabricar los sitios de prueba de ensayo de determinadas realizaciones, los chips se limpiaron mediante sonicación en acetona durante 5 min, se enjuagaron con alcohol isopropílico y agua desionizada (DI), y se secaron con un flujo de nitrógeno. La electrodeposición se realizó a temperatura ambiente; se usaron aberturas de 5 μm en los electrodos fabricados a modo del electrodo de trabajo, y se hizo contacto con las mismas usando las áreas de conexión expuestas. Se fabricaron sensores de Au (oro) usando una solución de deposición que contenía 50 mM de soluciones de HAuCl₄ y 0,5 M de HCl. Se formaron estructuras de Au de 100 μm y 20 μm utilizando amperometría de CC a 0 mV durante 100 segundos, y a 0 mV durante 20 segundos, respectivamente. Después de un lavado con agua DI y un secado, se recubrieron con Pd los sensores de Au para formar nanoestructuras mediante reelectrodeposición en una solución de 5 mM de H₂PdCl₄ y 0,5 M de HClO₄, a -250 mV durante 10 segundos (para una estructura de 100 micras) y durante 5 segundos (para una estructura de 20 micras).

En ciertas realizaciones, se utilizó un protocolo ejemplar para preparar los ensayos. En este protocolo, se desprotegeron aptámeros tiolados y sondas de ADN tioladas usando ditiotreitól (DTT), y posteriormente una purificación con HPLC. A continuación se liofilizaron las sondas purificadas con HPLC y se almacenaron a -20 °C. Se incubó con sensores una solución tampón de fosfato (25 mM, pH 7) que contenía una sonda tiolada de 5 μM, 25 mM de NaCl, y 50 mM de MgCl₂ durante 1 hora, en una cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente, para inmovilizar la sonda sobre la superficie de ensayo. A continuación, se lavó dos veces el chip durante 5 minutos con una solución tampón de fosfato (25 mM) que contenía 25 mM de NaCl. Los sensores se incubaron después con una solución tampón de fosfato (25 mM) que contenía 10 μM de neutralizador y 25 mM de NaCl durante 30 minutos, a temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron tres veces durante 5 minutos con el mismo tampón. Con fines de demostrar la detección, se trataron entonces los chips con diferentes analitos, a lo que siguió un lavado.

En ciertas realizaciones, se efectuaron experimentos electroquímicos utilizando un potencióstato Epsilon de Bioanalytical Systems (West Lafayette, Indiana) con un sistema de tres electrodos que presentaba un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Se midieron las señales electroquímicas en una solución tampón de 25 mM de fosfato (pH 7) que contenía 25 mM de NaCl, 10 μM de [Ru(NH₃)₆]Cl₃, y 4 mM de K₃[Fe(CN)₆]. Se obtuvieron señales de voltametría diferencial de impulsos (DPV) con una etapa de potencial de 5 mV, una amplitud de impulso de 50 mV, un ancho de impulso de 50 mseg, y un periodo de impulso de 100 mseg. Se calcularon los cambios de señal correspondientes al reemplazo del neutralizador, por objetivo específico, con corrientes de fondo restadas: $\Delta I\% = (I_{\text{después}} - I_{\text{antes}}) / I_{\text{antes}} \times 100$ (en donde $I_{\text{después}}$ = corriente tras el reemplazo del neutralizador, I_{antes} = corriente antes del reemplazo del neutralizador). En estas realizaciones ilustrativas, se obtuvieron imágenes de microscopio electrónico de barrido utilizando un 3025 SEM de Aspx (Delmont, Pennsylvania).

La FIG. 4 muestra un sistema ejemplar de detección de un analito de acuerdo con ciertas realizaciones. El sistema de detección 400 tiene una cámara de detección 402 que incluye uno o más electrodos. En la FIG. 4, la cámara de detección incluye un electrodo de trabajo 404, un contraelectrodo 406, y un electrodo de referencia 408. Sin embargo, puede utilizarse cualquier cantidad o tipos adecuados de electrodos. La cámara de detección 402 también tiene una entrada 410 para hacer fluir hacia dentro una muestra, para su contacto con el electrodo de trabajo 404, y una salida 412 para hacer fluir la muestra hacia el exterior. Si la muestra contiene el analito de interés, el analito puede formar un complejo sonda-analito 414 sobre la superficie del electrodo de trabajo 404. En ciertas realizaciones, una vez que la muestra entra en la cámara de detección 402 a través de la entrada 410, puede asignarse cierta cantidad de tiempo para facilitar la formación del complejo sonda-analito 414. En ciertas

realizaciones, una muestra que contenga el analito puede fluir hacia el exterior a través de la salida una vez que se haya asignado suficiente tiempo para que se forme el complejo sonda-analito 414. Posteriormente puede hacerse fluir hacia el interior una solución de lavado a través de la cámara 402 de muestra, para eliminar los materiales no deseados que puedan estar presentes en la muestra.

El sistema de detección 400 mostrado en la FIG. 4 incorpora una configuración ilustrativa de potencióstato con tres electrodos, sin embargo, debe comprenderse que puede utilizarse cualquier configuración adecuada de los componentes. El contraelectrodo 406 está conectado al resistor 418, que a su vez está conectado a la salida del amplificador de control 416. Un módulo de detección 420 está conectado a través del resistor 418 para proporcionar una medición de la corriente. El módulo de detección 420 puede estar configurado para proporcionar la medición de la corriente a tiempo real, en respuesta a cualquier forma de onda de entrada. El electrodo de referencia 408 está conectado al terminal inversor del amplificador de control 416. Un generador de señales 422 está conectado a la terminal no inversora del amplificador de control 416. Esta configuración mantiene un potencial constante en el electrodo de trabajo al tiempo que permite mediciones precisas de la corriente. En ciertas realizaciones, la cámara de detección 402 puede contener una pluralidad de electrodos para detectar múltiples analitos. Por ejemplo, la cámara de detección 402 puede incluir múltiples electrodos de trabajo, cada uno con un tipo diferente de sonda fijada para la complejación con diferentes objetivos presentes en la muestra. En ciertas realizaciones, el sistema de detección 400 puede estar configurado para dedicarse a los electrodos de trabajo individualmente uno por uno, al tiempo que utiliza un contraelectrodo y un electrodo de referencia comunes.

Una unidad de control y comunicación 424 está acoplada operativamente al módulo de detección 420 y al generador de señales 422. La unidad de control y comunicación 424 puede sincronizar las formas de onda de entrada y las mediciones de salida, y puede recibir y almacenar la entrada y salida en una memoria. En ciertas realizaciones, la unidad de control y comunicación 424 puede ser una unidad separada que interconecte con el sistema de detección 400. Por ejemplo, el sistema de detección 400 puede ser un cartucho desechable con una pluralidad de terminales de entrada y de salida, que pueden conectar con una unidad 424 de control y comunicación externa. En ciertas realizaciones, la unidad de control y comunicación puede acoplarse de manera operativa a una unidad de visualización que muestre la salida como una función de la entrada. En ciertas realizaciones, la unidad de control y comunicación 424 puede transmitir la información de entrada y de salida a un destino remoto, para su almacenamiento y visualización. Por ejemplo, la unidad de control y comunicación 424 podría ser un dispositivo móvil o capaz de interconectar con un dispositivo móvil. En ciertas realizaciones, la unidad de control y comunicación 424 podría alimentar el sistema de detección 400. El sistema 400 puede accionarse usando cualquier fuente de alimentación adecuada, incluyendo una batería o una fuente de alimentación de CA enchufada.

En ciertas realizaciones, puede proporcionarse un sistema de detección como una composición de ensayo para su uso en la detección de drogas. La composición de ensayo puede presentar un primer complejo reversible que comprenda una molécula de sonda fijada en una superficie de sensor, que forme un complejo con un pseudo-ligando complementario o parcialmente complementario. La sonda puede tener afinidad con un fármaco de moléculas más grandes que las del pseudo-ligando. En consecuencia, el fármaco puede desplazar el pseudo-ligando, formando un segundo complejo. El primer y segundo complejos pueden tener un primer y segundo estados de carga, respectivamente. En ciertas realizaciones, el sistema de detección puede proporcionarse como un kit, que incluya un dispositivo con una superficie de sensor y una sonda fijada en la superficie del sensor. El kit también puede tener un pseudo-ligando que pueda formar un complejo reversible con el pseudo-ligando. El pseudo-ligando del kit puede estar ya acomplejado con la sonda, o puede incluirse por separado con el kit para su posterior complejación.

En diversas realizaciones, los neutralizadores se sintetizaron utilizando una propuesta de síntesis en fase sólida en un sintetizador de péptidos automatizado de tipo Preludio (Protein Technologies, Inc.; Tucson, Arizona). En estas realizaciones, los productos de síntesis se confirmaron mediante espectroscopia de masas.

En ciertas realizaciones, para examinar la capacidad del ensayo para detectar moléculas pequeñas, se seleccionó ATP a modo del analito o ligando de unión modelos. En la FIG. 5 se muestran una sonda y unas secuencias de aptámero de ATP ilustrativas. En la FIG. 6A se muestra una configuración ilustrativa del ensayo 600 de neutralizador para detección de ATP. En estas realizaciones, en primer lugar se inmovilizan unos aptámeros tiolados de unión a ATP 602 sobre unos sensores 604 con Pd sobre sus superficies, y luego se introduce un neutralizador 606 parcialmente complementario. La porción de APN 608 del neutralizador 606 es principalmente complementaria al aptámero 602. Sin embargo, se introdujeron dos emparejamientos incorrectos 610 para permitir liberar fácilmente el neutralizador 606 al añadir el ATP 612. La presencia del neutralizador 606 reduce fuertemente la carga en la superficie del sensor 604, que se vería restaurada por el desplazamiento del neutralizador 610 por parte de una molécula diana.

En la FIG. 6B, un gráfico de DPV 620 muestra señales obtenidas en los sensores antes de la neutralización 622, después de la neutralización 624, y después de la introducción 626 de ATP. Para la detección de ATP, se incubaron los sensores con una solución tampón de fosfato (25 mM) que contenía 25 mM de NaCl y diferentes concentraciones de ATP durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los barridos de aptámeros inmovilizados no acomplejados revelaron una elevada corriente catalítica, consistente con la fuerte atracción electrostática de Ru(III)

con la estructura de ADN del aptámero. La corriente observada se reduce en > 80 % cuando la molécula del neutralizador se hibrida con el aptámero. Sorprendentemente, el pico de reducción también se desplaza hacia potenciales más negativos. Esto puede deberse a la desaceleración de la cinética de transferencia de electrones cuando el neutralizador está presente. Cuando el analito de ATP se liga a la sonda de aptámero, un cambio estructural del aptámero provoca la liberación del neutralizador, lo que conlleva un aumento de la corriente catalítica. Como se muestra en el gráfico de concentración 630 de la FIG. 6C, el cambio observado en la corriente antes de la unión de ATP y después de la unión de ATP estaba directamente relacionado con la concentración de ATP en la solución. Las líneas discontinuas horizontales 632 muestran la señal generada en ausencia del ATP.

Para evaluar la dependencia del tiempo de la respuesta del sensor en ciertas realizaciones, se introdujo el ATP en la solución catalítica de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y se midieron cambios de señal a tiempo real. La FIG. 6D muestra un gráfico de tiempo 640 ilustrativo, que contiene datos que indican que los cambios de señal en la presencia 642 de ATP se producen dentro de un periodo de 1 min, y el cambio de señal en la ausencia 644 de ATP no es significativo incluso tras 20 min. Estos resultados indican claramente que la respuesta del sensor es rápida, y que el complejo sonda-neutralizador es estable.

La FIG. 7A muestra una realización ilustrativa de un ensayo 700 con cocaína que se llevó a cabo usando una propuesta similar a la descrita anteriormente para el ATP, con unos aptámeros 702 que se inmovilizaron sobre unos sensores 704, y específicos para una molécula de cocaína 712. El gráfico de DPV 720 de la FIG. 7B muestra que la elevada corriente inicial del aptámero de unión a la cocaína disminuyó tras la hibridación 722 del neutralizador. En la FIG. 5 se muestran secuencias ilustrativas para el aptámero 702 y el neutralizador 706 utilizados en el ensayo 700 para cocaína. En esta realización, el neutralizador 706 presenta una porción 708 que es complementaria al aptámero 702, y dos emparejamientos incorrectos 710 que permiten liberar fácilmente el neutralizador 706 al añadir la cocaína 712. Cuando se provocó el complejo de aptámero-neutralizador con la cocaína 712, el cambio estructural resultante del aptámero 702 liberó el neutralizador 706 y resultó en una elevada corriente catalítica 724. Para la detección de cocaína en esta realización ilustrativa, se incubaron los sensores 704 con una solución tampón de fosfato (25 mM) que contenía 25 mM de NaCl y diferentes concentraciones de cocaína, durante 2 min a temperatura ambiente. El gráfico de concentración 730 de la FIG. 7C muestra el cambio observado en la corriente (en puntos porcentuales), sobre el eje Y frente a la concentración de cocaína (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre el eje X. Las líneas discontinuas horizontales 732 muestran la señal generada en ausencia de la cocaína. El cambio observado en la corriente antes de la unión de la cocaína y tras la unión de la cocaína estaba directamente relacionado con la concentración de cocaína en la solución. El cambio de señal para 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cocaína fue > 60 % mayor que en ausencia de la cocaína, o en presencia de un analito no objetivo. Este nivel de sensibilidad es comparable con pruebas comerciales y es suficiente para la detección de drogas.

Después de haber establecido un alto nivel de rendimiento con analitos de moléculas pequeñas, se evaluó el rendimiento del ensayo para determinar si proporcionaba una sensibilidad clínicamente relevante (femtomolar o mejor) contra analitos de ácido nucleico, dado que otros intentos de desarrollar sistemas de detección universales no han logrado con éxito una buena sensibilidad con esta clase de analitos.

La FIG. 8A ilustra una representación esquemática 800 de un ensayo ejemplar aplicado de cara a un ácido nucleico objetivo 812. Se inmovilizó una sonda tiolada 802 de ADN sobre el sensor 804. La corriente 822 catalítica de la sonda de ADN 802 no acomplejada fue inicialmente alta, y se suprimió significativamente en 824 tras añadir el neutralizador 806, como se muestra en la gráfica de DPV 820 de la FIG. 8B. Tras la exposición a 1 pM de un oligonucleótido complementario objetivo de 20 mer, la corriente 826 aumentó en > 300 %. En la FIG. 5 se muestran las secuencias para la sonda de ADN 802, el neutralizador 806 de la sonda de ADN, y el ADN objetivo 812. El neutralizador 806 tiene una porción 808 que es complementaria a la sonda de ADN 802, y dos emparejamientos incorrectos 810 que permiten liberar fácilmente el neutralizador 806 tras añadir el ADN objetivo 812.

En ciertas realizaciones, se estudió la dependencia de la concentración de un ensayo de ácido nucleico usando el ADN objetivo sintético de 20 mer y un objetivo no complementario, que se usó para evaluar los niveles de fondo y evaluar la especificidad. En la FIG. 5 se muestra una secuencia ilustrativa para el objetivo no complementario. Para este ADN objetivo sintético, se incubaron los sensores con una solución tampón de fosfato (25 mM) que contenía 25 mM de NaCl, 10 mM de MgCl_2 , y diferentes concentraciones de objetivo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para identificar el límite de detección del ensayo ejemplar, la concentración de ADN objetivo varió entre 10 pM y 10 aM, como se muestra en el gráfico de concentración 830 de la FIG. 8C. La señal aumentó con el aumento de concentración del objetivo, dentro de un intervalo que abarca 5 órdenes de magnitud. La línea discontinua horizontal 832 indica las corrientes promedio de 100 nM del objetivo no complementario. El cambio de señal para 10 aM de ADN objetivo, aun cuando estaba por encima de los 100 nM del objetivo no complementario, no fue lo suficientemente elevado como para ser estadísticamente significativo, lo que indica que el límite de detección de este ensayo para un objetivo de 20 mer es de entre 100 y 10 aM.

También se evaluó el rendimiento de ciertas realizaciones del ensayo con muestras heterogéneas complejas en forma de ARN total de *E. coli*. La sonda de ADN se diseñó para la polimerasa de ARN β mARN (*rpoB*), una transcripción altamente expresada en bacterias y que no se conserva entre especies. En la FIG. 5 se muestran secuencias ilustrativas para la sonda de ADN y el neutralizador. Como se muestra en el gráfico de concentración

840 de la FIG. 8D, la señal producida por este ensayo ilustrativo depende de la concentración de una mezcla heterogénea de ARN total de *E. coli*, en el que la línea discontinua horizontal 842 muestra la señal observada en la ausencia del ARN de *E. coli*. En los casos del ARN total de *E. coli*, se incubaron unos sensores con PBS estéril y sin RNasa que contenía diferentes concentraciones del objetivo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detectaron con éxito 10 pg/ μ L de ARN total de *E. coli*, lo que indica que el ensayo ilustrativo puede alcanzar altos niveles de sensibilidad con un exceso de material no complementario.

También se proporcionaron y probaron ciertas realizaciones del ensayo que usan lisados bacterianos no procesados. En la prueba de estas realizaciones, se generaron lisados bacterianos no procesados al introducir suspensiones que contenían cantidades conocidas de *E. coli* en una cámara de lisis, en la que unos fuertes campos eléctricos lisaron las bacterias. A continuación, se utilizó este lisado sin purificación o amplificación adicional. En la FIG. 5 se muestran secuencias ilustrativas utilizadas para la sonda de lisado bacteriano y el neutralizador de lisado bacteriano. El gráfico de concentración 850 de la FIG. 8E ilustra la dependencia de la señal de ensayo a la cantidad de *E. coli* utilizada para producir los lisados no procesados, y muestra que la señal aumentó con el aumento de la concentración de la bacteria *E. coli* en las suspensiones iniciales. En estos estudios, se incubaron sensores con lisado de *E. coli* en PBS estéril y sin RNasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La línea horizontal discontinua 852 de la FIG. 8 representa la señal promedia para un lisado de 150 ufc/ μ L de *Staphylococcus saprophyticus*, cuyos componentes eran no complementarios a la sonda. Sorprendentemente, el límite de detección para la bacteria *E. coli* fue 0,15 ufc/ μ L. Este límite de detección de sensibilidad no tiene precedentes en el análisis directo de muestras sin procesar, y es clínicamente relevante para la detección de bacterias halladas en muestras clínicas. La cinética del ensayo de estas realizaciones ilustrativas permite detectar rápidamente la presencia de bacterias con una sensibilidad y especificidad elevadas, requiriendo menos de 30 minutos desde la adquisición de la muestra hasta el resultado.

Se caracterizaron ciertas realizaciones para verificar que el formato de ensayo descrito en el presente documento, en conexión con diversas realizaciones, podría detectar biomarcadores de proteínas, utilizando trombina como sistema modelo. El aptámero de unión a trombina es una secuencia bien caracterizada, conocida porque se pliega para formar una estructura de cuarteto de G y fija la trombina en el exosito 1. En la FIG. 5 se muestran secuencias ilustrativas para el aptámero de unión a trombina y el neutralizador del aptámero de trombina. La FIG. 9A muestra un método de detección 900 de proteínas ilustrativo de acuerdo con ciertas realizaciones. Se depositó un aptámero tiolado 902 de unión a trombina sobre una superficie de sensor 904 y, posteriormente, se acomplejó con un neutralizador 906 de aptámero de trombina, que neutraliza al menos parcialmente la carga cerca de la superficie de sensor 904. El neutralizador 906 tiene una porción 908 que es complementaria al aptámero 902 y dos emparejamientos incorrectos 910 que permiten liberar fácilmente el neutralizador 906 al añadir la trombina 912. La unión de la trombina 912 al aptámero 902 de unión a trombina, que forma un complejo de aptámero-trombina 914, desplaza el neutralizador 906 de aptámero de trombina y restaura la carga, lo que resulta en un cambio detectable en la respuesta del sensor.

En la FIG. 9B, gráfico de DPV 920 muestra las corrientes electrocatalíticas sólo del aptámero 922, del complejo aptámero-neutralizador 924, y del complejo aptámero-trombina 926. La corriente electrocatalítica se vio claramente suprimida al unirse el neutralizador al aptámero de trombina. Cuando se trató con 100 pM de trombina, se observó un gran aumento de la corriente catalítica. Por el contrario, el gráfico de DPV 930 de la FIG. 9C muestra que el cambio de señal era insignificante cuando se trató con 100 nM de BSA (una proteína no específica), lo que indica que el ensayo era específico para la trombina. Como se muestra en el gráfico de concentración 940 de la FIG. 9D, la señal observada era directamente proporcional a la concentración de trombina, y mostró que podía detectarse claramente una cantidad tan baja de trombina de hasta 10 fM. Las líneas discontinuas horizontales 942 muestran la señal generada en ausencia de la trombina.

La FIG. 10 muestra una realización ilustrativa de un ensayo de ácido nucleico 1000, en el que el analito desplaza el pseudo-ligando mediante la formación de un complejo con el pseudo-ligando en lugar de con la sonda. En esta realización, el neutralizador 1006 tiene una mayor afinidad con el analito 1012 que con la sonda 1002, lo que resulta en la formación de un complejo 1014 entre el analito 1012 y el neutralizador 1006. En el ensayo 1000, el neutralizador 1006 es específico para el analito 1012 e incorpora uno o más emparejamientos incorrectos 1010 de pares de base con la sonda 1002, y una porción 1008 que es complementaria a la sonda 1002. En esta realización, la señal observada después de que el neutralizador 1006 hibride con la sonda 1002 se incrementa al eliminar el neutralizador 1006 incorrectamente emparejado de la sonda 1002, debido a la hibridación con un objetivo 1012 perfectamente emparejado que está en solución. Esto conlleva la restauración de la carga en la superficie 1004 de detección de electrodo en la ausencia de un complejo analito-sonda, en función de la eliminación del neutralizador 1006 y de la restauración de la carga de la sonda 1002 que está fijada a la superficie 1004 de detección de electrodo. Debe comprenderse que, aunque esta realización se ha descrito en el contexto de la detección de ácido nucleico, la realización no está limitada a esto, y que puede utilizarse para detectar una amplia variedad de analitos.

Así, se han descrito realizaciones y aplicaciones específicas de un biosensor sensible, aplicable a una amplia gama de moléculas biológicas. Por lo tanto, el objeto de la invención no estará limitado excepto por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Adicionalmente, al interpretar tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones, todos los términos deberán interpretarse de la manera más amplia posible de manera coherente con el contexto. En

particular, los términos “incluye/n”, “que incluye/n”, “contiene/n”, “que contiene/n”, “tiene”, “tienen”, “que tiene/n”, “comprende/n” y “que comprende/n”, tal como se utilizan en el presente documento, deben interpretarse como una referencia a elementos, componentes o etapas de manera no exclusiva, indicando que los elementos, componentes o etapas referenciados pueden estar presentes, o utilizarse, o combinarse con otros elementos, componentes o etapas a los que no se haga referencia expresa. El término “pluralidad”, tal como se usa en el presente documento significa más de uno, y puede incluir cualquier subconjunto definido o indefinido de dos o más etapas, elementos o componentes. Adicionalmente, cuando una definición o uso de un término en una referencia es incompatible o contrario a la definición de dicho término incluido en el presente documento, se aplica la definición de dicho término proporcionado en el presente documento y no se aplica la definición de dicho término en la referencia.

5

10

REIVINDICACIONES

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

5 poner en contacto una muestra con un primer complejo reversible que comprenda una sonda, fijada en una superficie de sensor, y un pseudo-ligando que tenga una carga opuesta a la de la sonda; y
 10 detectar la presencia del analito mediante la detección de un segundo complejo, formado por el desplazamiento del pseudo-ligando de la sonda por parte del analito, si está presente en la muestra, en el que la detección comprende comparar un estado de carga de la sonda, previo al desplazamiento del pseudo-ligando, con un estado de carga de la sonda después del desplazamiento del pseudo-ligando.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el primer complejo tiene un primer estado de carga y el segundo complejo tiene un segundo estado de carga, y en el que la detección de la presencia del segundo complejo comprende determinar una diferencia entre el primer estado de carga y el segundo estado de carga.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el segundo estado de carga tiene una mayor magnitud general que el primer estado de carga.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la detección de la presencia del segundo complejo comprende medir un cambio en la amplitud de corriente, provocado por la formación del segundo complejo.

5. El método de la reivindicación 4, en el que un aumento en la amplitud de la corriente por encima de un umbral predeterminado es indicativo de la presencia del analito.

6. El método de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la magnitud del cambio en la amplitud de la corriente es indicativa de la concentración del analito en la muestra.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la detección comprende medir un cambio en la tensión, causado por la formación del segundo complejo.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la afinidad de la sonda con el pseudo-ligando es menor que la afinidad de la sonda con el analito.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la afinidad del pseudo-ligando con el analito es mayor que la afinidad de la sonda con el analito.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que las estabilidades relativas del primer complejo y el segundo complejo se modifican mediante la manipulación de la temperatura o la composición del tampón.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el pseudo-ligando comprende un APN.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el APN comprende uno o más grupos funcionales catiónicos adjuntos.

13. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el APN comprende uno o más emparejamientos incorrectos de pares de bases con una secuencia de ácido nucleico de la sonda.

14. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: (i) formar el segundo complejo entre el pseudo-ligando y el analito o (ii) formar el segundo complejo entre la sonda y el analito.

15. Un sensor para su uso en el método de detección de un analito de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, comprendiendo el sensor:

55 una superficie de sensor que comprende una pluralidad de electrodos;
 una sonda fijada sobre al menos uno de la pluralidad de electrodos; y
 un pseudo-ligando que tiene una carga opuesta a la de la sonda, capaz de formar un primer complejo reversible con la sonda, de tal manera que un analito desplace el pseudo-ligando al entrar en contacto con el primer complejo.

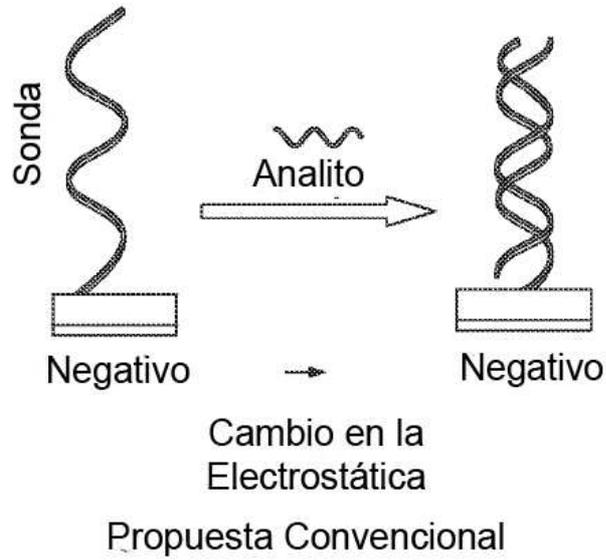


FIG. 1A

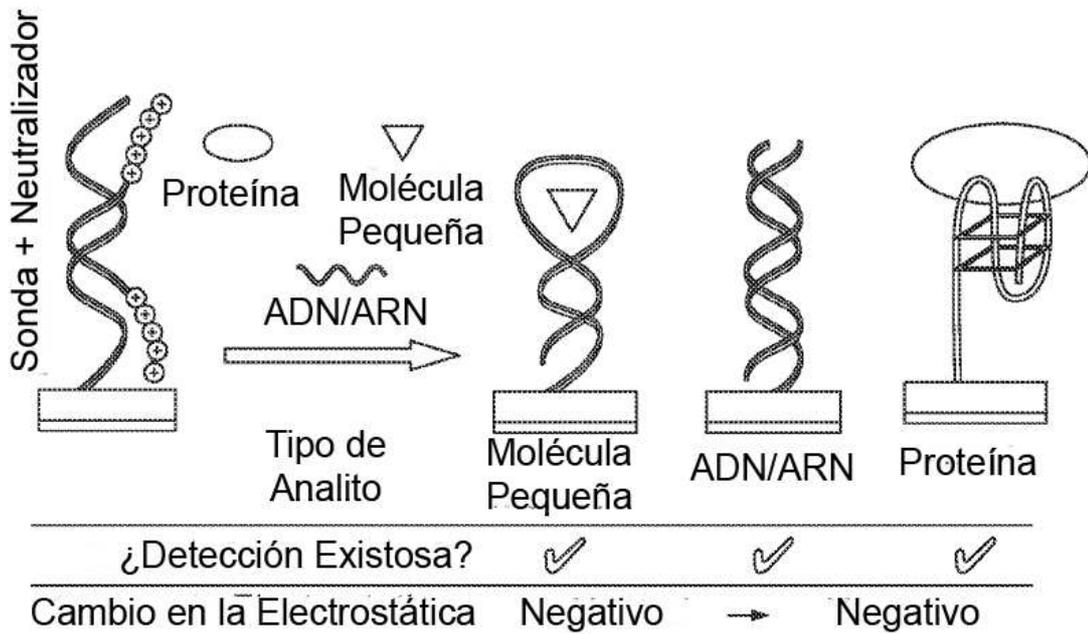


FIG. 1B

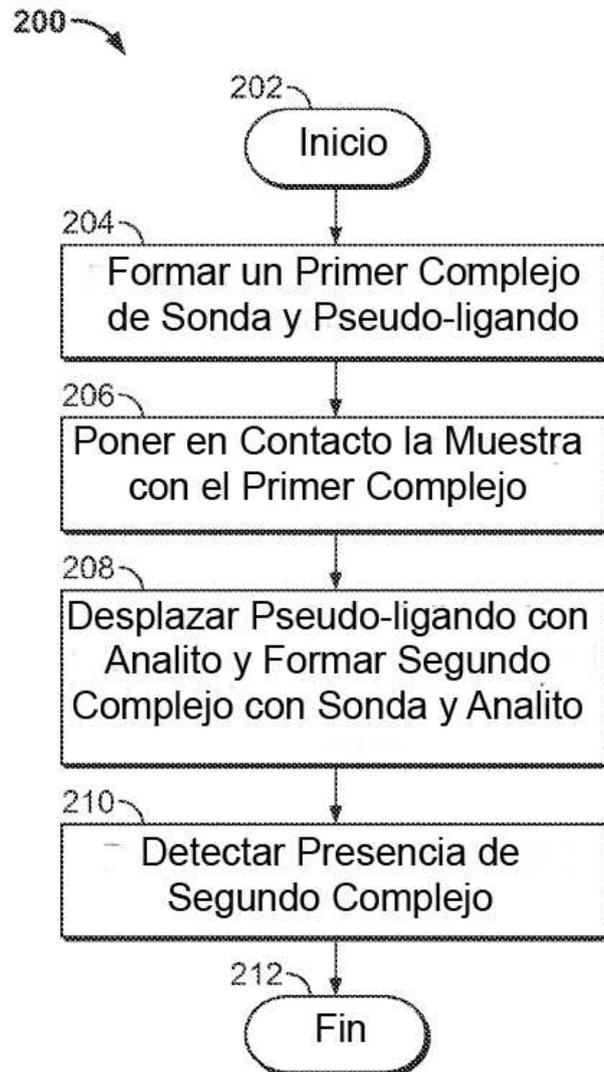


FIG. 2

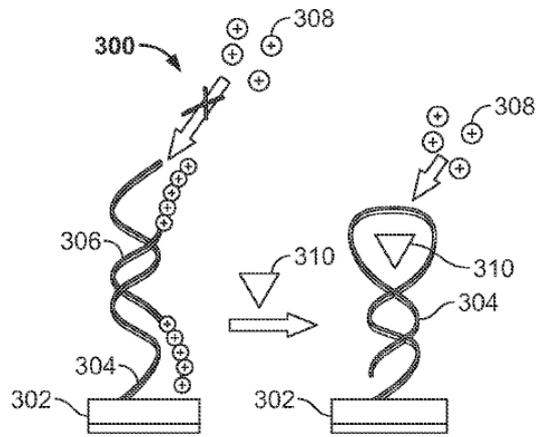


FIG. 3A

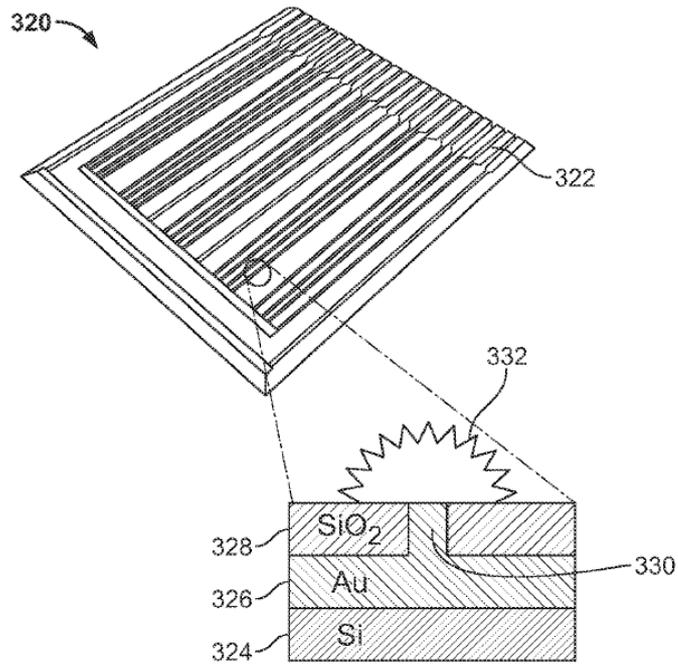


FIG. 3B

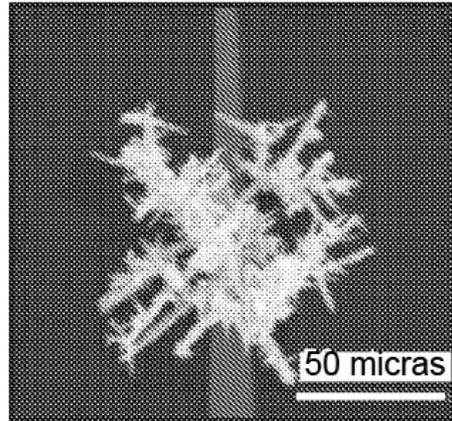


FIG. 3C

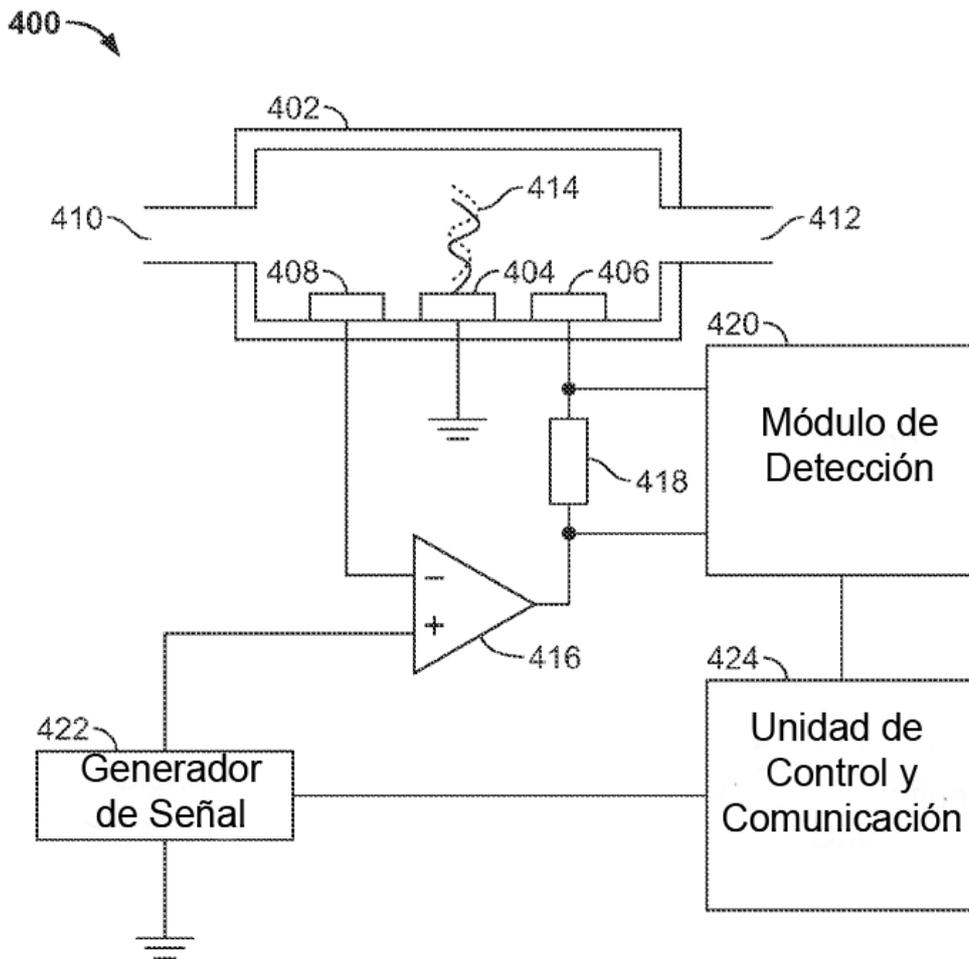


FIG. 4

Nombre	Tipo	Secuencia ^{a,b}
Aptámero de unión al ATP	ADN	ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT TTT-C ₃ -SH
Neutralizador de aptámero de ATP	APN	KKKKK-TCC ACA ATA CCC CCC-KKKKK
Aptámero de unión a la cocaína	ADN	HS-C ₆ -GAC AAG GAA AAT CCT TCA ATG AAG TGG GTC
Neutralizador de aptámero de cocaína	APN	KKKKK-CAT AGA AGA ATT TTC-KKKKK
Aptámero de unión a la trombina	ADN	HS-C ₆ -GGT TGG TGT GGT TGG
Neutralizador de aptámero de trombina	APN	KKKKK-CGA CAG CAA-KKKKK
Sonda para lisado/ARN total/objetivo de 20 mer de E. coli	ADN	HS-C ₆ -ATC TGC TCT GTG GTG TAG TT
Neutralizador para sonda de ADN	APN	KKKKK-CTA CAC CCC AAA GCA G-KKKKK
Objetivo de 20 mer	ADN	AAC TAC ACC ACA GAG CAG AT
Objetivo no acompañado de 20 mer	ADN	ATT GCA TCA ATG TCT TAC TT

a 5' a 3' para secuencias de ADN, terminal N a C para secuencias de APN
 b Las porciones subrayadas indican emparejamientos incorrectos de base única en los neutralizadores

FIG. 5

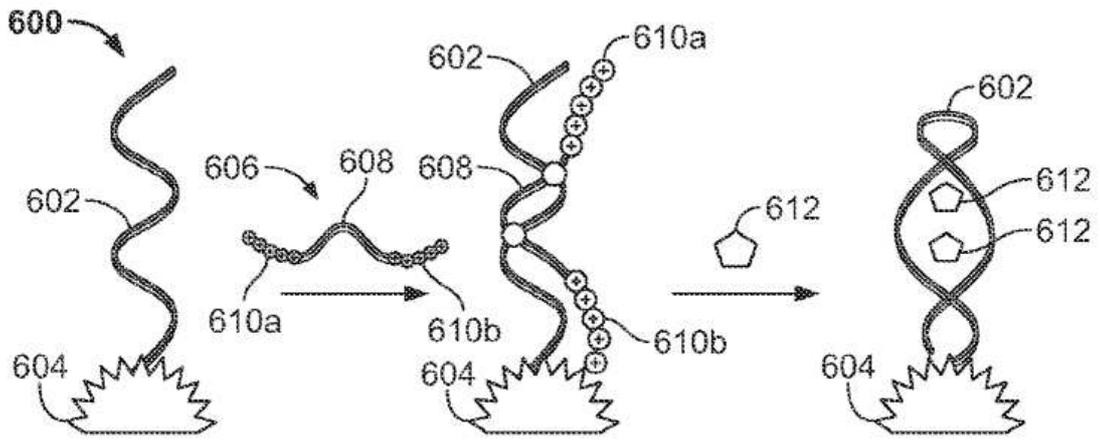


FIG. 6A

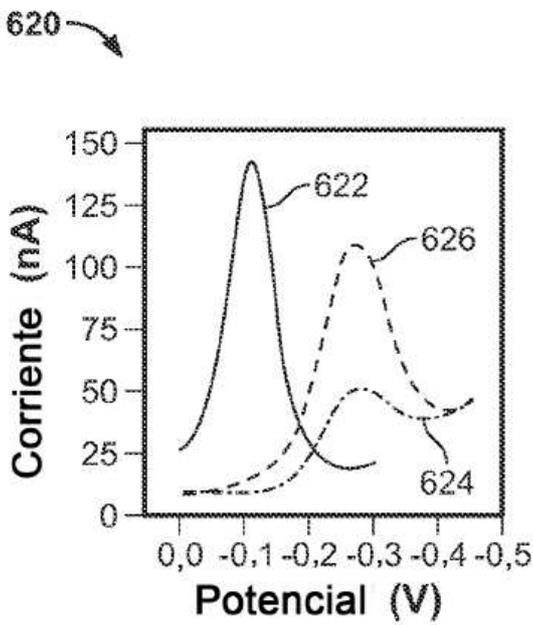


FIG. 6B

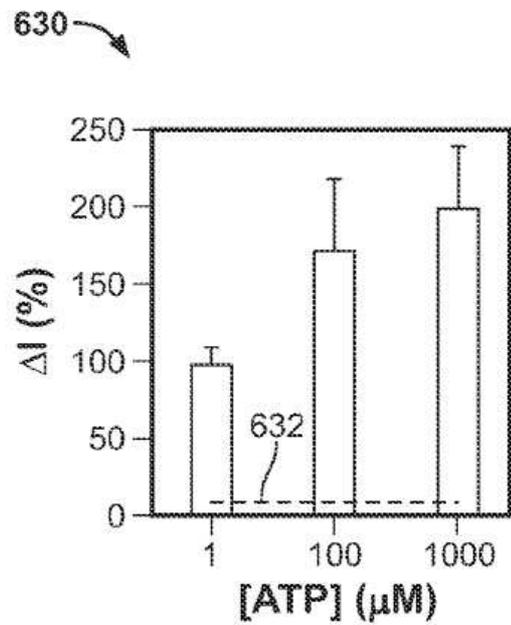


FIG. 6C

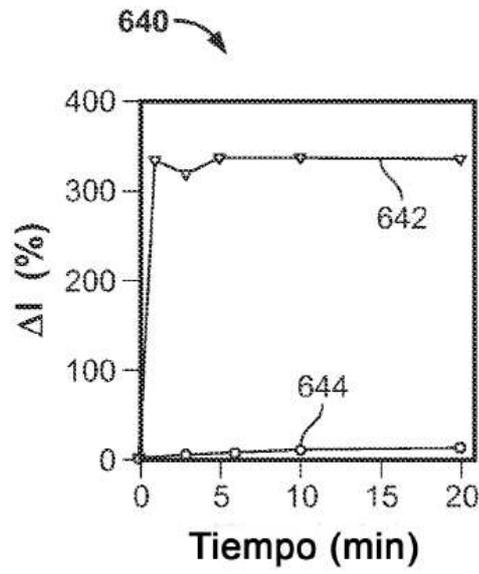


FIG. 6D

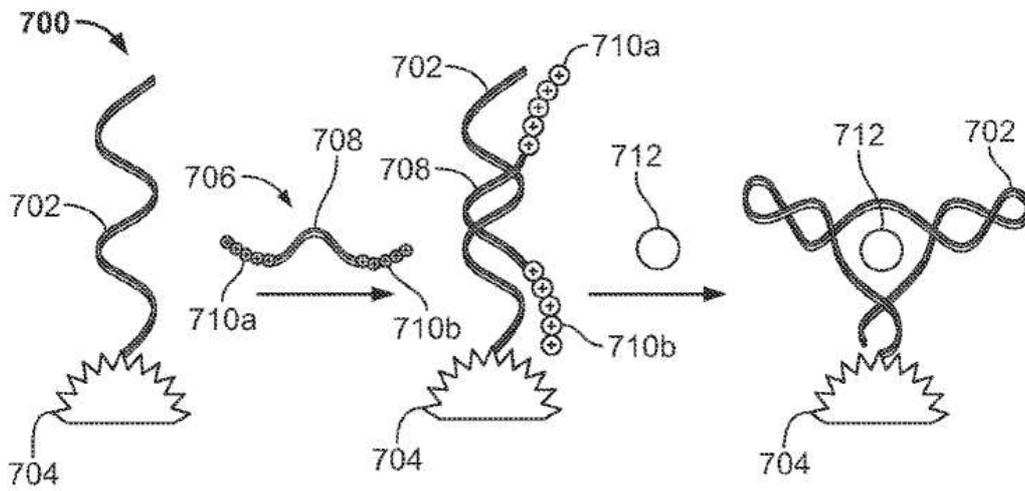


FIG. 7A

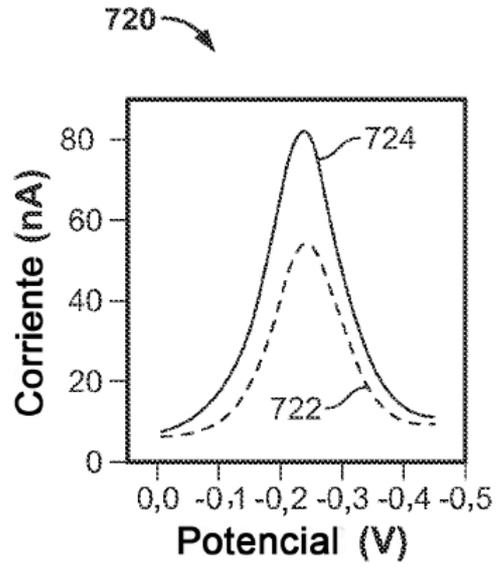


FIG. 7B

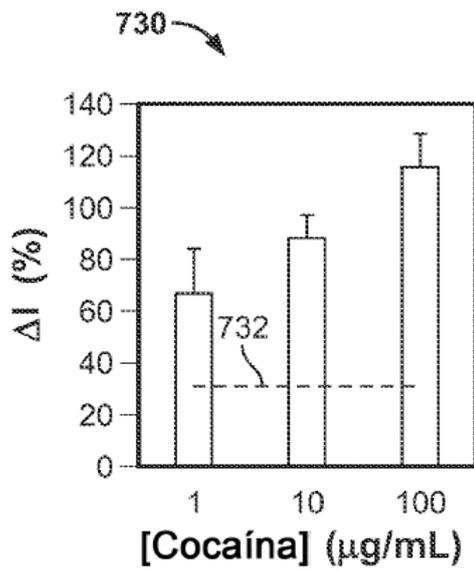


FIG. 7C

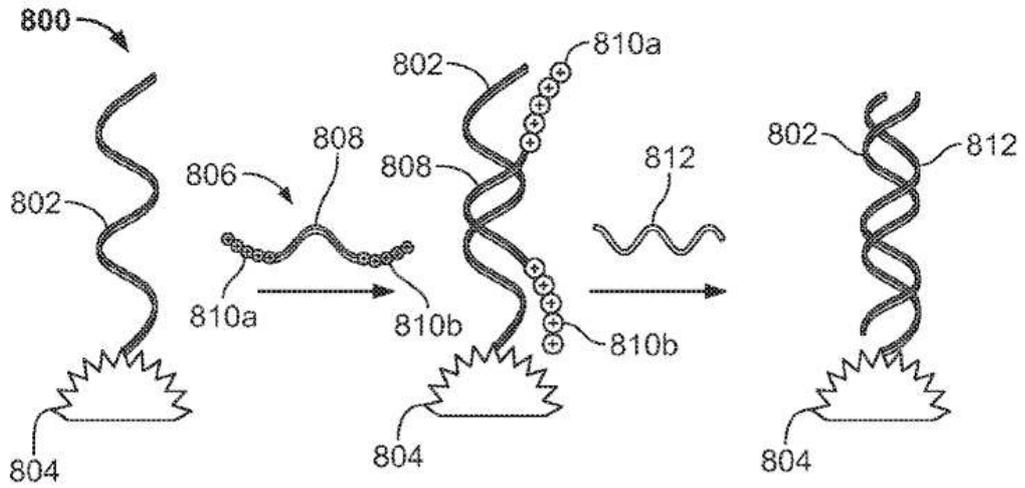


FIG. 8A

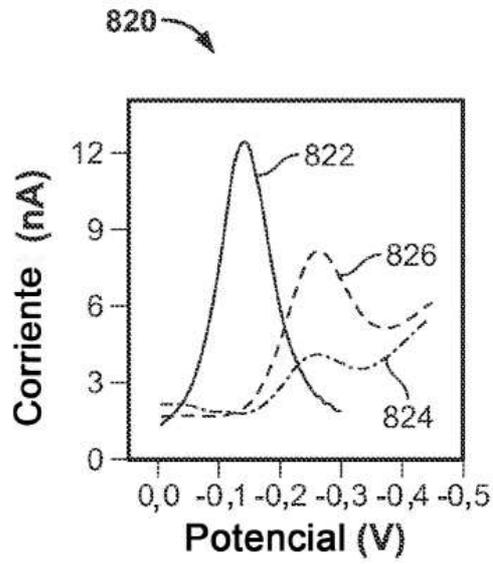


FIG. 8B

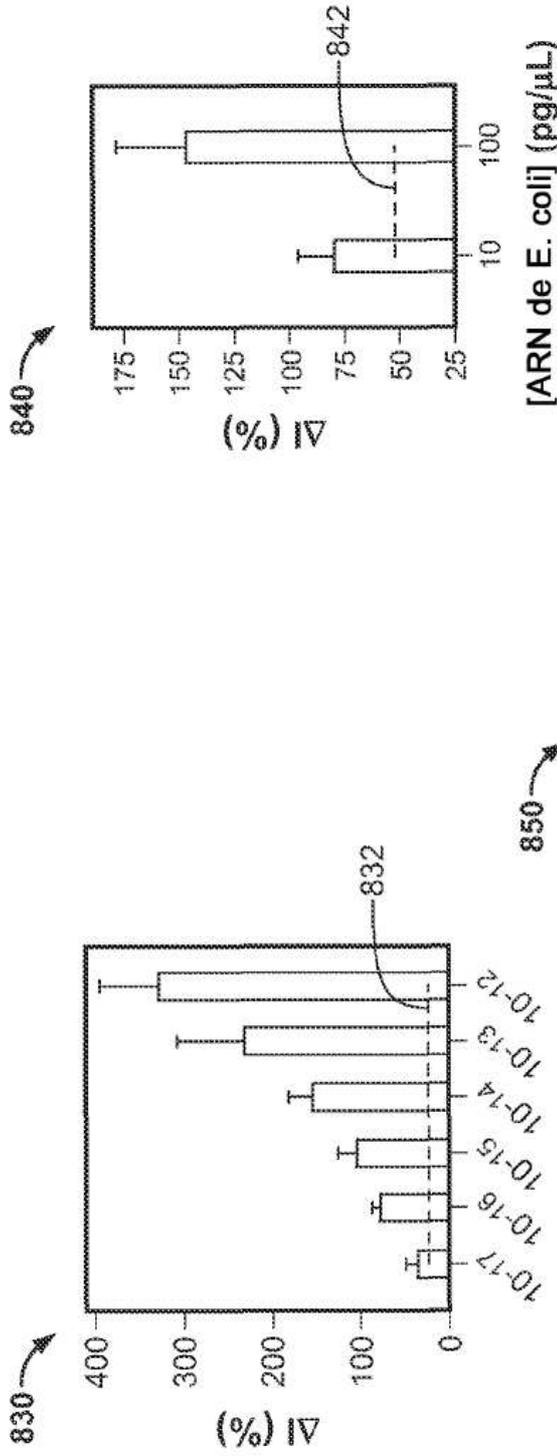


FIG. 8C

FIG. 8D

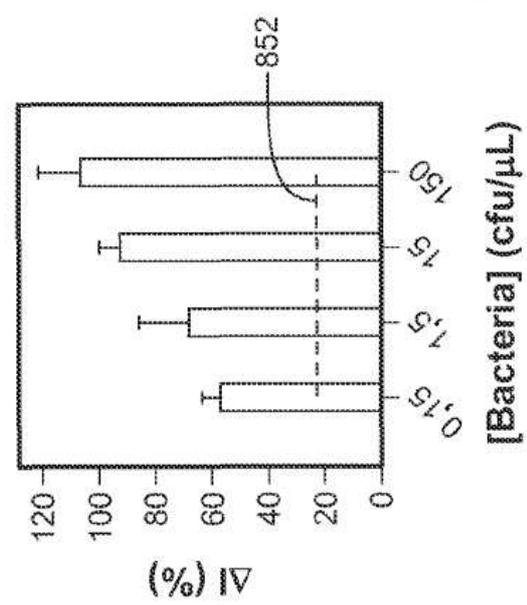


FIG. 8E

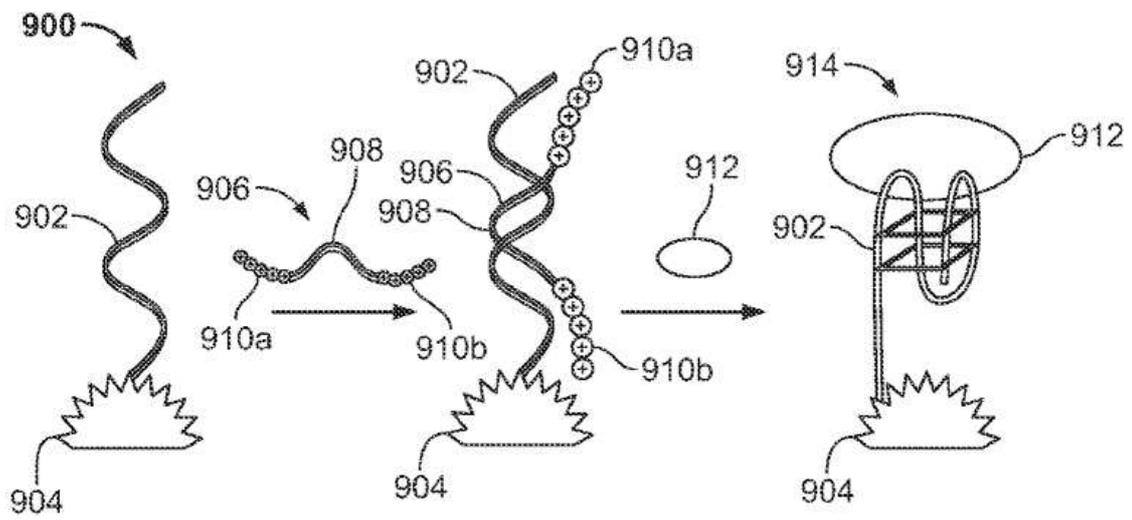


FIG. 9A

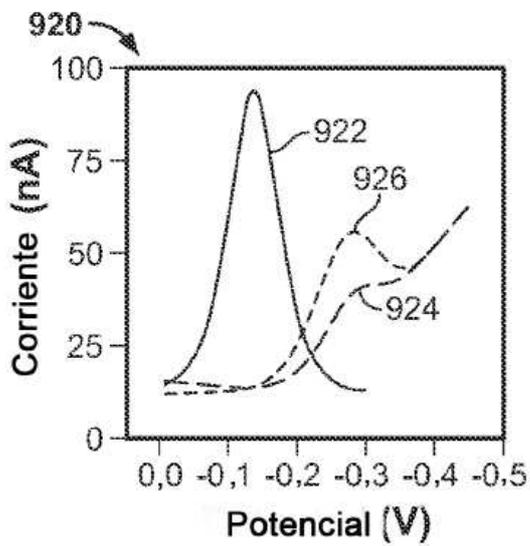


FIG. 9B

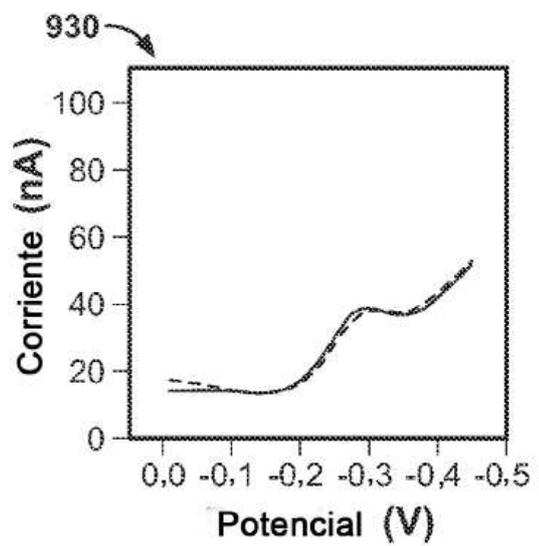


FIG. 9C

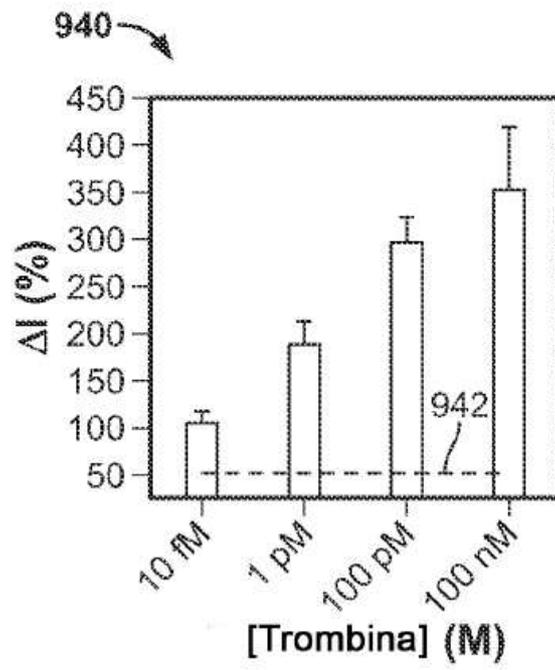


FIG. 9D

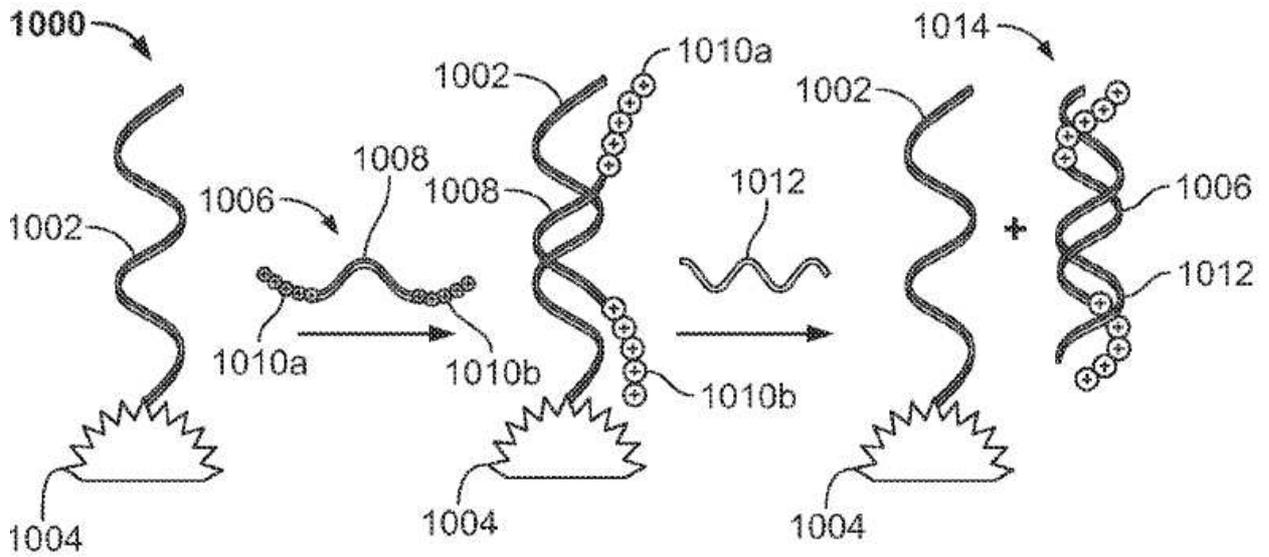


FIG. 10