

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 638**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

**G01N 27/02** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2013 PCT/GB2013/051749**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006394**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13733454 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2870466**

54 Título: **Un electrodo y uso del mismo**

30 Prioridad:

**03.07.2012 GB 201211775**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.10.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED  
(100.0%)  
Buxton Court, 3 West Way  
Botley, Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**DAVIS, JASON**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 635 638 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**

Un electrodo y uso del mismo

- 5 La presente invención se refiere a un electrodo para su uso en la detección electroquímica de especies diana, en particular, para la detección de insulina.

**Antecedentes**

- 10 La insulina es una hormona polipeptídica de bajo peso molecular (aproximadamente 5800 Da) producida por el páncreas. Es responsable de regular el metabolismo de los hidratos de carbono y los niveles de glucosa en sangre. La forma humana es un péptido compuesto de 51 aminoácidos, una cadena A de 21 residuos y una cadena B de 30 residuos unidas por dos enlaces disulfuro. Una determinación de la insulina circulante en suero o plasma es de valor intrínseco en el diagnóstico clínico y clasificación de diversos tipos de diabetes y enfermedades relacionadas y control de dopaje en atletas.

- 15 Durante la última década, se han desarrollado una variedad de métodos de detección, incluyendo aquellos basados en radioinmunoensayo, espectrometría de masas, espectrometría de fluorescencia y resonancia de plasmón superficial para la determinación de insulina. Estos métodos son, sin embargo, poco prácticos o insensibles, y no son traducibles a un formato de punto de atención.

- 20 Con un aumento en la incidencia de la diabetes, el desarrollo de una prueba de diagnóstico ultrasensible, barata, sencilla y automatizada sería de un valor considerable. Al intentar cumplir con estos requisitos, los análisis electroquímicos han recibido atención. Aunque se han informado sensores amperométricos basados en la oxidación de la insulina, estos operan a altos potenciales, y por consiguiente, padecen la interferencia de ácido ascórbico y ácido úrico. También son relativamente insensibles; el contenido en sangre de la insulina es normalmente por debajo de 80 pM entre comidas, muy inferior a los límites de detección de la mayoría de los sensores electroquímicos informados hasta la fecha.

- 25 La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica que es capaz de monitorizar de forma sensible los cambios en la capacidad o resistencia a la transferencia de carga asociados con la unión específica de ciertos materiales a una superficie de electrodo modificada adecuadamente. Algunos inmunoensayos basados en EIS se han demostrado para la detección de moléculas proteicas relativamente grandes (PM >20 kD). Sin embargo, generalmente no se ha aplicado EIS al análisis de moléculas más pequeñas, tales como polipéptidos de bajo peso molecular, donde se espera que el impacto sobre la impedancia resultante de la unión interfacial sea mucho menor que en el caso de proteínas grandes; ésta es una consideración particularmente significativa en el contexto de fluidos biológicos complejos que contienen concentraciones muy bajas de las moléculas de interés.

**Sumario de la invención**

- 30 Los presentes inventores han encontrado ahora un sistema de ensayo para detectar insulina que es altamente selectivo, se extiende linealmente a través del intervalo de concentración clínicamente relevante en su totalidad y presenta límites de detección en el intervalo picomolar bajo. Las interfaces pueden reutilizarse fácilmente y por lo tanto son ideales para su uso en diagnósticos de punto de atención.

- 35 En particular, los presentes inventores han establecido sorprendentemente que las muestras fisiológicas que contienen insulina son susceptibles al análisis cuantitativo por medio de espectroscopía de impedancia electroquímica con selectividad y sensibilidad excepcionales. Los inventores han encontrado también que la sensibilidad de estos sistemas de ensayo puede mejorarse aún más aplicando técnicas de impedancia electroquímica no farádica, analizando el cambio de fase en la señal eléctrica que se produce cuando la insulina se une a las moléculas sonda sobre la superficie del electrodo y haciendo uso de electrodos preparados usando un protocolo de modificación de superficie multietapa específico basado en la fotopolimerización de monómeros de betaína fotopolimerizables. Este protocolo de modificación de superficie multietapa también puede aplicarse a la preparación de electrodos para su uso en la detección electroquímica de especies diana distintas de la insulina.

- 40 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un electrodo para su uso en espectroscopía de impedancia electroquímica, que se ha preparado de esta manera.

- 45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar insulina en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, en el que el método comprende: (a) poner en contacto un electrodo de la presente invención con un medio portador que comprende insulina; y (b) detectar una señal eléctrica.

- 50 La presente invención también proporciona un espectrómetro de impedancia electroquímica que comprende un electrodo de la presente invención.

- 55 Aún en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un electrodo de la presente invención para

detectar insulina mediante una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para fabricar un electrodo para su uso en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, de acuerdo con la reivindicación 1.

- 5 El documento US 2019/061533 A1 describe la preparación de revestimientos de poli (carboxibetaína) no ensuciantes para sensores usando un proceso de dos etapas en el que un iniciador de la polimerización se inmoviliza sobre un sustrato y luego se polimerizan monómeros de carboxibetaína usando fotopolimerización o polimerización radicalica por transferencia de átomos (ATRP).
- 10 Analytical Chemistry, 2008, vol. 80 n.º 20, páginas 7894-7901, ISSN 0003-2700, XP055083280 y Biomacromolecules, 2006, vol. 7, n.º 12, también enseñan la preparación de recubrimientos de poli(carboxibetaína) no ensuciantes inmovilizando mercapto-undecil-bromoisobutirato como iniciador de polimerización sobre un sustrato seguido de ATRP de monómeros de carboxibetaína. En un aspecto preferido de la invención, este método comprende además (c) unir moléculas sonda aptas para unión específica a una especie diana a dichos polímeros.
- 15 La especie diana es preferiblemente insulina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un electrodo que se puede obtener mediante el método anterior de fabricación de un electrodo de la presente invención. La presente invención proporciona además un método para detectar una especie diana en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, en el que el método comprende: (a) poner en contacto el electrodo que puede obtenerse mediante el método anterior de fabricación de un electrodo de la presente invención con un medio portador que comprende dicha especie diana; y (b) detectar una señal eléctrica. La invención proporciona además un espectrómetro de impedancia electroquímica que comprende un electrodo que se puede obtener por el método anterior de fabricación de un electrodo de la presente invención, así como el uso de un electrodo que puede obtenerse mediante el método anterior de fabricación de un electrodo de la presente invención para detectar una especie diana mediante una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica.

20

25

Otras características y realizaciones preferidas se describen en la descripción adjunta y en las reivindicaciones adjuntas.

30

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra gráficos de Nyquist de electrodos diferentes registrados en solución de PBST (10 mM, pH 7,4) que contiene  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M como se describe en el Ejemplo 1: (a) electrodo de oro desnudo; (b) interfaces PEG SAM; (c) interfaces modificadas con anticuerpo preparado posteriormente; Recuadro: (A) Un gráfico Nyquist típico ideal de EIA farádica y (B) el circuito equivalente de Randles usado para el ajuste de datos.

35

La figura 2 muestra los espectros de impedancia farádica típicos correspondientes al biosensor del ejemplo 1 después de la incubación en solución de PBST con diferentes concentraciones: (A) las curvas de interior a exterior representan 0 pM, 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, y 50 nM de insulina, respectivamente; (B) la resistencia a la transferencia de carga normalizada ( $R_{ct}$ ) cambia del biosensor después de la incubación con diferentes concentraciones de proteína de insulina en PBST (10 mM, pH 7,4) que contiene  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M; el recuadro muestra la curva de calibración correspondiente para los biosensores de insulina.

40

La figura 3 muestra una curva de calibración para ensayos "in situ" de insulina en suero sanguíneo al 10 % como se describe en el Ejemplo 1. Las superficies del biosensor se incubaron en solución de PBST (10 mM, pH 7,4) que contenía  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM, KCl 0,1 M y suero sanguíneo al 10%, con diferentes concentraciones de insulina, y mediciones de EIS realizadas posteriormente en la misma solución.

45

La figura 4 muestra el efecto de la concentración de suero sanguíneo tal como se describe en el Ejemplo 1 sobre la respuesta del sensor a la insulina antes (columna izquierda) y después (corrección de la columna derecha). Las superficies de los electrodos se incubaron en solución de PBST (10 mM, pH 7,4) que contenía insulina 100 pM y diferentes porcentajes en volumen de suero sanguíneo durante 30 minutos, y después se aclararon con PBST antes de mediciones EIS "ex situ" en PBST que contenía  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M. Los datos medidos se corrigieron a continuación mediante la sustracción de las contribuciones de EIS de la insulina en el propio suero calculados a partir de la curva de calibración.

50

La figura 5 muestra una curva de calibración para ensayos "in situ" de insulina en suero sanguíneo al 50% como se describe en el Ejemplo 1. Las superficies de los electrodos se incubaron en solución de PBST (10 mM, pH 7,4) que contenía  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM, KCl 0,1 M y suero sanguíneo al 50%, con diferentes concentraciones de insulina, y las mediciones EIS se realizaron en una solución de PBST (10 mM, pH 7,4) que contenía  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0.1 M después del aclarado con PBST.

55

La figura 6 muestra la regeneración de la superficie sensorial del sensor del Ejemplo 1 mediante inmersión en tampón Gly-HCl 0,2 M que contiene DMSO al 1 % durante 5 min antes de aclarado con PBST, y análisis de impedancia en solución PBST (10 mM, pH 7,4) que contiene  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M.

60

La figura 7 muestra los resultados del análisis de EIS no farádico de cambio de fase de muestras de insulina medidas en una serie de concentraciones en un sensor como se describe en el Ejemplo 2: (A) datos de respuesta; (B) curva de calibración.

65

La figura 8 muestra un análisis ESI no farádico de cambio de fase de una muestra de insulina representativa y

una serie de muestras de control en un sensor como se describe en el Ejemplo 2.

La figura 9 muestra una ilustración esquemática de un método para preparar un electrodo funcionalizando una superficie de sustrato con un anticuerpo de insulina de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 La figura 10 muestra los gráficos de fase Bode de EIS no farádica de un electrodo modificado con PCBMA registrado a diferentes intervalos de tiempo (específicamente, en los días 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 19, 22, 25, 28 y 32) en PBS (10 mM, pH 7,4), como se describe en el Ejemplo 3.

10 La figura 11 muestra los gráficos Bode de EIS no farádica de las interfaces de biosensor como se describe en el Ejemplo 3 después de la exposición a concentraciones calibradas de insulina. Las mediciones se hicieron en PBS 10 mM (pH 7,4) a través de un intervalo de frecuencias de 0,1-100 KHz. El pico curvado estrechamente emparejado a un valor de aproximadamente 6 y que generalmente disminuye a medida que el registro (frecuencia) aumenta son las mediciones de log (impedancia). Las curvas que aumentan primero como log (frecuencia) aumentan, después alcanzan un máximo y posteriormente disminuyen a medida que el log (frecuencia) continúa aumentando, son mediciones de cambio de fase. Las últimas curvas se pueden distinguir por la concentración de la muestra de insulina particularmente a valores bajos de log (frecuencia) por debajo de aproximadamente 0; en esta región la curva más baja corresponde a 0 pM de insulina, con curvas sucesivamente más altas correspondientes a 1 pM, 10 pM, 100 pM y, finalmente, 2000 pM de insulina.

15 La figura 12 muestra las curvas de fase (A), que representan el desfase de fase detectado entre las señales de entrada y salida en función de la frecuencia aplicada y (B) las curvas de impedancia de los gráficos Bode de EIS no farádica de una superficie sensorial típica como se describe en el Ejemplo 3. Para ambas gráficas (A) y (B), en la medida en que se pueden identificar curvas discretas, la curva más baja corresponde a 0 pM de insulina, con curvas sucesivamente más altas correspondientes a 1 pM, 10 pM, 100 pM y, finalmente, 2000 pM de insulina.

20 La figura 13 muestra los cambios de fase limpios de biosensores en el dominio de baja frecuencia, como se describe en el Ejemplo 3. La curva más baja corresponde a 1 pM de insulina, con curvas sucesivamente más altas correspondientes a 10 pM, 100 pM y, finalmente, 2000 pM de insulina.

25 La figura 14 muestra la respuesta del biosensor a la insulina 50 pM en concentración sérica progresivamente creciente con la respuesta en PBS puro tomada como el 100 %, como se describe en el Ejemplo 3. La respuesta se basa en el cambio de fase de EIS antes y después del enriquecimiento con insulina, y los errores del ensayo están dentro del 2 %. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres repeticiones de medición.

30 La figura 15 muestra ensayos de muestras de suero de pacientes reales comparativos representativos con el método de EIS no farádico como se describe en el Ejemplo 3 (electrodos de macrodisco, cada una de las muestras analizada por triplicado) y un inmunoensayo quimioluminiscente clínicamente aprobado. Se muestran las diferencias porcentuales. Obsérvese que para los grupos de bloques adyacentes, el bloque de la izquierda corresponde a los resultados de quimioluminiscencia y el bloque de la derecha a los resultados de EIS.

35 La figura 16 muestra un gráfico de Bland Altman del rendimiento del biosensor, en comparación con un ensayo de quimioluminiscencia estándar clínico y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 3. Los datos mostrados aquí se adquirieron tanto en electrodos de oro de macro disco como en matrices de microelectrodos serigrafadas.

40

### Descripción detallada

45 Los electrodos de la presente invención comprenden moléculas sonda dispuestas sobre la superficie plana de un sustrato. Las moléculas sonda son capaces de unirse selectivamente a una especie diana. En los electrodos para su uso en la detección del EIS de insulina, la especie diana es insulina. En ciertos electrodos de la presente invención, la especie diana puede ser una especie distinta de la insulina, como se describe adicionalmente en el presente documento.

50 El sustrato del electrodo puede comprender cualquier material eléctricamente conductor. El sustrato puede comprender un metal o carbono. El metal puede ser un metal en forma elemental o una aleación de un metal. Opcionalmente, la totalidad del sustrato comprende un metal o carbono. El sustrato puede comprender un metal de transición. El sustrato puede comprender un metal de transición seleccionado entre cualquiera de los grupos 9 a 11 de la Tabla Periódica. El sustrato puede comprender un metal seleccionado entre, pero sin limitación, renio, iridio, paladio, platino, cobre, indio, rubidio, plata y oro. El sustrato puede comprender un metal seleccionado entre oro, plata y platino. El sustrato puede comprender un material que contiene carbono, que puede seleccionarse entre grafito pirolítico en plano de borde, grafito pirolítico en plano basal, carbón vítreo, diamante dopado con boro, grafito pirolítico altamente ordenado, polvo de carbono y los nanotubos de carbono.

55 En una realización preferida, el sustrato comprende oro, por ejemplo, el sustrato es un sustrato de oro.

60

65 La superficie del sustrato es plana, que incluye una superficie generalmente plana, típicamente sin muescas, protuberancias y poros. Tales superficies de sustrato pueden prepararse fácilmente, antes de que las moléculas sonda y cualquier molécula enlazadora asociada se unan a la superficie, mediante técnicas tales como pulido con partículas finas, por ejemplo, pulverización con partículas finas, opcionalmente en una secuencia de etapas en las que el tamaño de las partículas finas disminuye en cada paso de pulido. Las partículas finas pueden comprender, por ejemplo, un material a base de carbono, tal como diamante, y/o pueden tener partículas con diámetros de 10  $\mu\text{m}$

o menos, opcionalmente 5  $\mu\text{m}$  o menos, opcionalmente 3  $\mu\text{m}$  o menos, opcionalmente 1  $\mu\text{m}$  o menos, opcionalmente 0,5  $\mu\text{m}$  o menos, opcionalmente 0,1  $\mu\text{m}$  o menos, Después del pulido, la superficie del sustrato puede lavarse, por ejemplo, por ultrasonidos, opcionalmente en un medio líquido adecuado, tal como agua, por ejemplo, durante un periodo de al menos 1 minuto, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos. Opcionalmente, la superficie del sustrato puede lavarse con un abrasivo, por ejemplo, una solución ácida, por ejemplo después del pulido y, si se usa, etapas de lavado ultrasónico. La solución abrasiva puede comprender un ácido inorgánico, por ejemplo  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y/o un peróxido, por ejemplo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en un medio líquido adecuado, por ejemplo, agua. Opcionalmente, los sustratos pueden ser pulidos electroquímicamente, que pueden seguir cualesquiera etapas que implican uno o más de pulir con partículas finas, lavar, por ejemplo, con ultrasonidos, y/o usar una solución abrasiva.

El pulido electroquímico puede implicar un ciclo entre un potencial superior e inferior hasta que se alcanza un pico de reducción estable, por ejemplo, un potencial superior de 0,5 V o más, opcionalmente 1 V o more, opcionalmente 1,25 V o más, y un potencial inferior de 0,5 V o menos, opcionalmente 0,25 V o menos, opcionalmente 0,1 V o menos.

La molécula sonda preferiblemente comprende o es una especie de unión seleccionada entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un aptámero, un oligosacárido, un péptido y una proteína. Preferiblemente, las moléculas sonda comprenden o son una especie de unión seleccionada entre uno o más de un anticuerpo, un ácido nucleico y un péptido. Más preferiblemente, las moléculas sonda comprenden o son un anticuerpo.

Si las moléculas sonda comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo pueden seleccionarse de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgD, IgE, IgG e IgM. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es del tipo IgG. El anticuerpo se une selectivamente a la especie diana. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede derivarse de un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un mamífero seleccionado de un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, una cabra, una oveja, y un caballo. En una realización, las moléculas sonda comprenden un anticuerpo del tipo IgG derivado de un ratón.

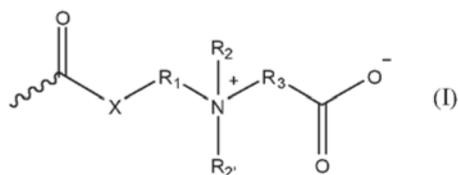
Si las moléculas sonda comprenden un aptámero, el aptámero se puede seleccionar entre un aptámero de péptido, un aptámero de ADN y un aptámero de ARN.

Tal como se indica anteriormente, preferiblemente, las moléculas sonda comprenden una especie de unión seleccionada entre uno o más de un anticuerpo, un ácido nucleico y un péptido.

Preferiblemente, la superficie del sustrato que tiene las moléculas sonda sobre la misma, como un todo, es selectiva para la especie diana (por ejemplo, para insulina). Si la superficie del sustrato que tiene las moléculas sonda sobre la misma es selectiva para la especie diana, esto indica que sustancialmente solo o solo la especie diana se unirá a la superficie (por unión a las moléculas sonda) y otras especies (por ejemplo, presentes en el medio portador con la especie diana) no se unirán, o no se unirán en ningún grado significativo, a otras partes de la superficie del sustrato u otras especies en la misma. Tales superficies de sustrato selectivo pueden denominarse superficies de sustrato altamente selectivas (o superficies de electrodos altamente selectivas).

En una realización, las moléculas sonda pueden comprender un polímero que está unido a: (a) la superficie plana del sustrato; y (b) a un resto B capaz de unirse selectivamente a la insulina. Preferiblemente, dicho polímero comprende una pluralidad de grupos betaína colgantes. Un grupo betaína es un grupo que comprende tanto un grupo funcional catiónico cargado positivamente que no lleva átomo de hidrógeno (por ejemplo, un grupo funcional amonio cuaternario o fosfonio) y un grupo funcional cargado negativamente (por ejemplo un grupo carboxilato o un grupo sulfonato). Colgante significa que dichos grupos betaína son grupos laterales que se extienden alejándose de la cadena principal del polímero (es decir, la cadena derivada de unidades monoméricas repetitivas).

Los grupos betaína colgantes, por ejemplo, pueden comprender un catión de amonio cuaternario y un grupo carboxilato. Por ejemplo, los grupos betaína colgantes pueden tener la fórmula (I)



en la que:

$\text{R}_1$  y  $\text{R}_3$  son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquileo  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_5$ ;  
 $\text{R}_2$  y  $\text{R}_2'$  son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquilo  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_5$ ; y  
 $\text{X}$  es O o NH.

En un aspecto ejemplar, los grupos betaína colgantes pueden tener la fórmula (I), en la que  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_3$  son etileno,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_2'$  son metilo y  $\text{X}$  es O. Un polímero que contiene tales grupos colgantes se puede obtener por fotopolimerización

de (alquil)acrilatos de carboxibetaína tales como metilacrilato de carboxibetaína (CBMA) y etilacrilato de carboxibetaína (CBEA). En otro aspecto ejemplar, los grupos betaína colgantes pueden tener la fórmula (I) en la que  $R_1$  es propileno,  $R_3$  es etileno,  $R_2$  y  $R_2$ . son metilo y X es NH. Un polímero que contiene tales grupos colgantes se puede obtener mediante fotopolimerización de carboxibetaína (alquil)acrilamidas tales como carboxibetalacrilamida.

5 El polímero puede tener, por ejemplo, una cadena principal de hidrocarburo, por ejemplo, una cadena principal que es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, que tiene al menos 10 átomos de carbono, opcionalmente al menos 50 átomos de carbono, opcionalmente al menos 100 átomos de carbono). Típicamente, cuando el polímero comprende una pluralidad de grupos de betaína colgantes, el polímero comprende al menos 5, o  
10 al menos 10, por ejemplo, al menos 25 grupos de betaína colgantes. Dichos polímeros se pueden obtener, por ejemplo, mediante fotopolimerización de monómeros fotopolimerizables que contienen un doble enlace carbono-carbono fotopolimerizable (así como un grupo betaína, si el polímero comprende una pluralidad de grupos betaína colgantes). Por ejemplo, se pueden usar monómeros que comprenden grupos (alquil)acrilato tales como acrilato, metacrilato y etilacrilato. Según la presente invención, los electrodos se pueden obtener llevando a  
15 cabo el método de fabricación de un electrodo de la presente invención, como se describe con más detalle en el presente documento.

La presente solicitud también se refiere a un método para detectar insulina en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, en el que el método comprende: (a) poner en contacto un electrodo de la presente  
20 invención con un medio portador que comprende insulina; y (b) detectar una señal eléctrica en el electrodo de trabajo.

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es conocida por el experto en la técnica. En general, Generalmente, se aplica un potencial de ca variable en un potencial de polarización (o CC) entre un electrodo de  
25 trabajo y un contraelectrodo. En general, el EIS implica escanear a través de una gama de frecuencias de CA. La relación entre la señal de entrada (típicamente el potencial variable) y la señal de salida (típicamente la corriente variable) permite calcular la impedancia. Generalmente existe una diferencia de fase entre la señal de entrada y la señal de salida, de modo que la impedancia puede considerarse como una función compleja, que tiene una parte real (a veces denominada Z') y una parte imaginaria (a veces denominada Z'').

30 Las partes real e imaginaria de la impedancia se pueden trazar una contra otra, por ejemplo, en la forma de un gráfico de Nyquist, como se ilustra en la figura 1. Al ajustar los datos de impedancia a un supuesto circuito equivalente, se puede determinar la resistencia a la transferencia de electrones, que es un medio a través del cual se puede evaluar el evento de unión. Como alternativa, el método puede comprender medir la propia diferencia de  
35 fase.

El intervalo de frecuencia del potencial alternativo variable aplicado puede ser de 0,05 Hz a 10 kHz. La amplitud del potencial alternativo aplicado, que está típicamente en forma de onda sinusoidal, puede ser de 1 mV a 100 mV, opcionalmente de 5 mV a 50 mV, opcionalmente de 5 mV a 20 mV, opcionalmente de 5 mV a 15 mV, opcionalmente  
40 de 8 mV a 12 mV, opcionalmente aproximadamente 10 mV. El potencial de polarización (o potencial de corriente continua) puede ajustarse a cualquier potencial deseado. Si está presente una sonda redox en el medio portador, el potencial de polarización puede ajustarse al potencial de electrodo de la sonda redox en las condiciones en las que se lleva a cabo el método.

45 En un aspecto, puede estar presente una sonda redox en el medio portador, y el método puede implicar EIA farádico. Si está presente una sonda redox, puede ser una especie de metal de transición, en la que el metal de transición puede adoptar dos estados de valencia (por ejemplo, un ión metálico (M) capaz de adoptar estados M (II) y M (III)). En una realización, la sonda redox contiene un ión metálico, en el que el metal del ión metálico se selecciona de hierro, rutenio, iridio, osmio, cobalto, tungsteno y molibdeno. En una realización, la sonda redox se  
50 selecciona de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ,  $Fe(NH_3)_6^{3+/2+}$ ,  $Fe(phen)_3^{3+/2+}$ ,  $Fe(bipy)_2^{3+/2+}$ ,  $Fe(bipy)_3^{3+/2+}$ ,  $Ru^{3+/2+}$ ,  $RuO_4^{3-/2-}$ ,  $Ru(CN)_6^{3-/4-}$ ,  $Ru(NH_3)_6^{3+/2+}$ ,  $Ru(en)_3^{3+/2+}$ ,  $Ru(NH_3)_5(Py)^{3+/2+}$ ,  $Ir^{4+/3+}$ ,  $Ir(Cl)_6^{2-/3-}$ ,  $Ir(Br)_6^{2-/3-}$ ,  $Os(bipy)_2^{3+/2+}$ ,  $Os(bipy)_3^{3+/2+}$ ,  $OxCl_6^{2-/3-}$ ,  $Co(NH_3)_6^{3+/2+}$ ,  $W(CN)_6^{3-/4-}$ ,  $Mo(CN)_6^{3-/4-}$ , ferroceno opcionalmente sustituido, poliferroceno, quinonas, tales como p-benzoquinona e hidroquinona y fenol. En una realización, la sonda redox es una especie que contiene hierro en la que el hierro está en los estados Fe(II) y/o Fe(III). En una realización, la sonda redox es  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ . La sonda redox  
55 puede estar presente en el medio portador en una cantidad de 0,1 mM a 100 mM, opcionalmente de 0,5 mM a 10 mM, opcionalmente de 0,5 mM a 2 mM, opcionalmente de 0,5 mM a 1,5 mM, opcionalmente aproximadamente 1 mM.

60 En un aspecto particularmente preferido de la invención, sin embargo, la técnica de EIS es una técnica de EIS no farádica. En este aspecto, no se añade una sonda redox al medio portador. Por ejemplo, el medio portador puede no contener una sonda redox exógena añadida externamente, es decir, por ejemplo, puede no comprender una sonda redox. Los presentes inventores han encontrado que la EIS no farádica proporciona resultados más sensibles para la detección de insulina que la EIS farádica. Este fue un resultado inesperado debido a que los ensayos EIS están convencionalmente dominados por métodos farádicos en los que se añade una sonda redox al medio portador  
65 (debido a que los efectos resistivos de un evento de unión en una superficie se amplifican ampliamente muestreando el impacto de esto sobre la corriente generada por una sonda redox en gran exceso).

- El medio portador está preferiblemente en forma líquida. El líquido portador puede ser cualquier líquido en el que las especies diana (por ejemplo, insulina) puedan ser suspendidas o disueltas. En una realización, el líquido portador comprende agua. En una realización, el líquido portador comprende un fluido biológico. Un fluido biológico puede ser un fluido que se ha obtenido de un sujeto, que puede ser un ser humano o un animal. En una realización, el líquido portador comprende un fluido biológico no diluido. Un fluido biológico no diluido en el presente contexto es un fluido biológico obtenido de un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal, que no ha sido diluido con otro líquido, aunque pueden estar presentes aditivos tales como una sonda redox en el fluido biológico no diluido. El fluido biológico puede seleccionarse de sangre, orina, lágrimas, saliva, sudoración, y líquido cefalorraquídeo.
- Opcionalmente, el medio portador comprende un fluido biológico obtenido de un sujeto, por ejemplo, un ser humano o animal, y un diluyente. El diluyente puede añadirse al fluido biológico después de haber sido obtenido del sujeto. El diluyente puede incluir un medio líquido, por ejemplo, un medio líquido seleccionado de agua y un alcohol, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, etanol. El medio portador puede comprender además un tampón. El tampón puede comprender un fosfato.
- El método puede comprender calcular la concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) a partir de la señal eléctrica. La señal eléctrica puede convertirse en datos de impedancia y luego convertirse en la concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) a partir de la señal eléctrica. La señal eléctrica puede convertirse en datos de resistencia de transferencia de carga, o datos de cambio de fase, y luego convertirse en la concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) a partir de la señal eléctrica. El método puede implicar comparar los datos obtenidos en la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, por ejemplo, a partir de la señal eléctrica, los datos de impedancia, los datos de resistencia de transferencia de carga, o los datos de cambio de fase, y comparando los datos con los datos obtenidos en una etapa de calibración, para obtener la concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina). El método puede implicar una etapa de calibración inicial que determina una relación entre la concentración de la especie diana (por ejemplo insulina) y datos electroquímicos obtenidos de la señal electroquímica en la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica; los datos electroquímicos pueden seleccionarse a partir de datos de impedancia, datos de resistencia de transferencia de carga y datos de cambio de fase; la relación se puede usar para convertir los datos electroquímicos obtenidos de una muestra de interés en la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica a la concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) en la muestra.
- Los inventores han encontrado que el cálculo de la concentración de insulina a partir de un cambio de fase en una señal eléctrica que se produce tras la unión de la insulina a las moléculas sonda da lugar a un ensayo de insulina particularmente sensible comparado con otros métodos conocidos en la técnica para cuantificar datos de espectroscopía de impedancia electroquímica. Por consiguiente, es un aspecto particularmente preferido del método de la invención que la concentración de insulina se calcula a partir de un cambio de fase en una señal eléctrica que se produce al unirse la insulina a las moléculas sonda. Los datos de fase adecuados pueden proporcionarse, por ejemplo, directamente mediante un software de potenciostato (por ejemplo, utilizando potenciostatos Autolab comercialmente disponibles). Los datos de fase se pueden muestrear a cualquier frecuencia y en presencia de cualquier concentración de especies diana.
- La concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) en el medio portador puede ser 0,1 pM o más, opcionalmente 0,2 pM o más, opcionalmente 0,5 pM o más, opcionalmente 1,0 pM o más, La concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) en el medio portador puede ser 100 nM o menos opcionalmente 80 nM o menos, opcionalmente 50 nM o menos, opcionalmente 10 nM o menos, La concentración de la especie diana (por ejemplo, insulina) en el medio portador puede ser de 0,1 pM a 100 nM, opcionalmente de 0,2 pM a 100 nM, opcionalmente de 0,5 pM a 50 nM.
- Los presentes inventores han encontrado que es posible regenerar el electrodo que se ha unido a especies diana (por ejemplo, insulina), disociando especies diana unidas (por ejemplo, insulina) del electrodo. Por lo tanto, el método puede implicar, después de poner en contacto el electrodo con el medio portador de manera que las especies diana (por ejemplo, insulina) se unan a las moléculas sonda, disociar especies diana (por ejemplo, insulina) de las moléculas sonda. La disociación puede comprender el contacto de la superficie de electrodo que tiene especies diana (por ejemplo, insulina) sobre la misma con un medio líquido ácido, que opcionalmente tiene un pH de 6 o inferior, opcionalmente un pH de 5 o inferior, por ejemplo un pH de 4 o inferior. El medio líquido ácido puede contener una sustancia ácida, por ejemplo un tampón ácido (por ejemplo, clorhidrato de glicina). El medio líquido ácido puede ser acuoso o no acuoso. Por ejemplo, puede ser un medio no acuoso que comprende un disolvente no acuoso tal como DMSO.
- El método puede comprender además, después de disociar la insulina de las moléculas sonda, reutilizar el electrodo en uno o más métodos adicionales para detectar insulina en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica. Cada uno de tales métodos adicionales puede comprender llevar a cabo un método para detectar insulina de la presente invención.
- La presente invención también se refiere a un espectrómetro de impedancia electroquímica, en el que el espectrómetro comprende un electrodo como se define en el presente documento. El espectrómetro de impedancia

electroquímica puede ser de un diseño estándar. El espectrómetro de impedancia electroquímica puede comprender un electrodo de la presente invención como electrodo de trabajo, un contraelectrodo y, si se desea, un electrodo de referencia. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un medio para aplicar, controlar y variar un potencial entre los electrodos de trabajo y contraelectrodos, y un medio para medir la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un potencióstato para controlar el potencial y medir la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica comprende preferiblemente un medio para calcular los datos de impedancia del potencial aplicado y la corriente resultante. El espectrómetro de impedancia electroquímica puede comprender un medio para calcular la resistencia a la transferencia de electrones del electrodo de trabajo.

El espectrómetro de impedancia electroquímica es preferiblemente para detectar insulina presente en un medio portador a una concentración de 0,1 pM o más, opcionalmente 0,2 pM o más, opcionalmente 0,5 pM o más, opcionalmente 1,0 pM o más,

La presente invención se refiere también al uso de un electrodo como se describe en el presente documento, o un espectrómetro de impedancia electroquímica como se describe en el presente documento, para la detección de una especie diana, por ejemplo, insulina. El uso puede incluir la detección de la presencia de y/o la detección de la concentración de la especie diana, por ejemplo, insulina. El uso puede ser para detectar la insulina presente en un medio portador a una concentración de 0,1 pM o más, opcionalmente 0,2 pM o más, opcionalmente 0,5 pM o más, opcionalmente 1,0 pM o más,

Los presentes inventores han encontrado que se puede obtener una superficie de electrodo particularmente no ensuciante y estable, idealmente para su uso en las circunstancias técnicamente exigentes asociadas con la detección de insulina por EIS, realizando la funcionalización de la superficie del sustrato mediante un procedimiento multietapa aprovechando las técnicas de fotopolimerización. En particular, los presentes inventores han ideado un método para fabricar un electrodo para su uso en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, de acuerdo con la reivindicación 1.

Ventajosamente, este método conduce a una superficie de sustrato modificada con polímero que es sustancialmente no ensuciante. Además, las etapas del método pueden llevarse a cabo en solución acuosa y por fotoiniciación en condiciones de laboratorio moderadas y seguras. Esto puede contrastarse con un método alternativo en el que se genera un polímero en solución y posteriormente se deposita por colada o por centrifugación sobre una superficie, lo que conduce a reacciones relativamente incontroladas y superficies potencialmente inestables (debido a la ausencia de unión covalente del polímero a la superficie del sustrato). El presente método es también ventajoso con respecto a un método alternativo en el que se genera una monocapa autoensamblable iniciadora y luego se inicia una reacción de radical libre en una atmósfera y disolvente inertes y con el monómero añadido (que es inconveniente, relativamente incontrolado y potencialmente peligroso).

Para facilitar la comprensión, la figura 9 muestra una ilustración esquemática de esta metodología para preparar un electrodo. Se hace hincapié en que esta figura solo muestra una realización específica de la presente invención y no es representativa del alcance completo del presente método.

Los monómeros fotopolimerizables pueden estar unidos a la superficie plana de un sustrato en la etapa (a) por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en el presente documento para unir un resto de enlace "L" a una superficie de sustrato. Se apreciará que dependiendo de la naturaleza química tanto del sustrato como de los monómeros, puede ser posible unir los monómeros directamente a la superficie. Como alternativa, la superficie puede ser activada químicamente primero para introducir grupos funcionales químicamente reactivos (tales como, pero sin limitación, grupo tiol o amina), que permiten la unión de los monómeros. Por ejemplo, la cisteamina se utiliza comúnmente para introducir grupos funcionales amina reactivos sobre sustratos de oro; el grupo tiol del reactivo de cisteamina se une al sustrato y los grupos de amina libre resultantes se pueden hacer reaccionar fácilmente con un grupo funcional adecuado, tal como un grupo ácido carboxílico, sobre los monómeros (en el caso de un grupo de ácido carboxílico sobre los monómeros, dando como resultado la formación de un enlace amida). Típicamente, la etapa de fijación de los monómeros fotopolimerizables comprende la unión covalente o semi-covalente de monómeros fotopolimerizables a la superficie plana del sustrato (es decir, la formación de un enlace covalente o semi-covalente entre los monómeros fotopolimerizables y la superficie del sustrato). Para disipar cualquier duda, la inclusión de monómeros fotopolimerizables en la superficie plana de un sustrato de oro a través de un enlace oro-azufre se incluye dentro del alcance de la expresión "unir covalentemente o semi-covalentemente" (considerándose el enlace oro-azufre como un enlace covalente o semi-covalente, por ejemplo, un enlace semi-covalente).

La superficie modificada que tiene una capa de monómeros fotopolimerizables dispuesta sobre la misma puede ser una monocapa autoensamblada.

En el método de la invención, la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b). Por lo tanto, se realiza la etapa (a), y a continuación se realiza la etapa (b). Esto significa que la unión (típicamente covalente) de una capa de monómeros fotopolimerizables está sustancialmente completa antes de que la superficie modificada se ponga en contacto con

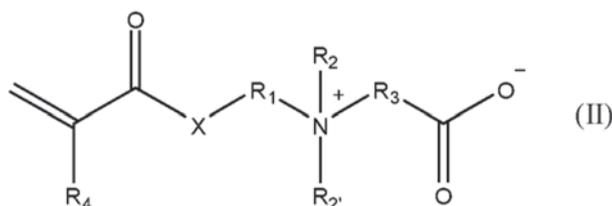
otros monómeros fotopolimerizables, opcionalmente monómeros de reticulación, y se realiza la polimerización fotoquímica. Esta naturaleza multietapas del método conduce a la generación de una superficie de sustrato estable y homogéneamente modificada.

- 5 Típicamente, pero no esencialmente, los monómeros fotopolimerizables usados en las etapas (a) y (b) son los mismos. Los monómeros fotopolimerizables (y otros monómeros fotopolimerizables) son monómeros de betaína fotopolimerizables.

10 Los monómeros de betaína fotopolimerizables comprenden un grupo funcional fotopolimerizable y un grupo betaína. Como se ha explicado en la divulgación anterior, un grupo betaína es un grupo que comprende tanto un grupo funcional catiónico cargado positivamente que no lleva átomo de hidrógeno (por ejemplo, un grupo funcional amonio cuaternario o fosfonio) y un grupo funcional cargado negativamente (por ejemplo un grupo carboxilato o un grupo sulfonato).

15 El grupo fotopolimerizable puede ser cualquier grupo susceptible a la fotopolimerización bajo condiciones adecuadas para la modificación de la superficie del electrodo. En una realización, los monómeros fotopolimerizables pueden comprender cada uno un doble enlace carbono-carbono fotopolimerizable. Por ejemplo, los monómeros fotopolimerizables pueden comprender grupos (alquil)acrilato, tales como grupos acrilato, metacrilato y/o etilacrilato. En el caso de un monómero de betaína fotopolimerizable, el grupo fotopolimerizable es un grupo distinto del grupo funcional catiónico cargado positivamente del grupo betaína y el grupo funcional negativamente cargado del grupo betaína.

25 En una realización, los monómeros de betaína polimerizables comprenden cada uno un catión de amonio cuaternario y un grupo carboxilato. Los monómeros de betaína fotopolimerizables pueden, por ejemplo, ser de la fórmula (II)



en la que:

- 30 R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquileo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;  
 R<sub>2</sub> y R<sub>2</sub>' son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;  
 R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>; y  
 X es O o NH

35 En los aspectos ejemplares del método, los monómeros de betaína fotopolimerizables se seleccionan de metacrilato de carboxibetaína (CBMA), carboxibetaína acrilamina (CBAA) y etilacrilato de carboxibetaína (CBEA).

40 Opcionalmente se pueden usar monómeros de reticulación en la etapa (b). Un reticulante adecuado es dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), aunque también pueden usarse otros reticulantes conocidos en la técnica.

45 Un fotoiniciador se usa típicamente para iniciar la polimerización fotoquímica de los monómeros en la etapa (b). Puede usarse cualquier fotoiniciador adecuado de los muchos fotoiniciadores conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de fotoiniciadores adecuados incluyen formiato de metilbenzoilo y 1-hidroxiciclohexifenil cetona.

La fotopolimerización puede dar como resultado polímeros que comprenden una pluralidad de grupos betaína colgantes, tal como se describe en otras partes del presente documento. Los polímeros pueden comprender, por ejemplo, al menos 5, o al menos 10, por ejemplo, al menos 25 grupos de betaína colgantes.

50 La fotopolimerización puede dar como resultado un polímero que puede tener, por ejemplo, una cadena principal de hidrocarburo, por ejemplo, una cadena principal que es un resto alquileo de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, que tiene al menos 10 átomos de carbono, opcionalmente al menos 50 átomos de carbono, opcionalmente al menos 100 átomos de carbono).

55 En un aspecto preferido, este método comprende además (c) unir moléculas sonda aptas para unión específica a una especie diana a dichos polímeros. Las moléculas sonda pueden unirse directamente a los polímeros siempre que tanto las moléculas sonda como los polímeros tengan grupos funcionales reactivos accesibles adecuados. Como alternativa, los polímeros, o las moléculas sonda, pueden activarse químicamente haciendo reaccionar con

compuestos activantes adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, los grupos funcionales cargados negativamente accesibles, tales como grupos carboxilato en grupos de betaína colgantes del polímero pueden activarse fácilmente usando compuestos tales como NHS, haciéndolos así reactivos químicamente a moléculas sonda tales como anticuerpos.

5 En un aspecto ejemplar, la especie diana es insulina y, por lo tanto, la etapa (c) implica unir moléculas sonda capaces de unión específica a insulina (por ejemplo, anticuerpos de insulina) a dichos polímeros.

10 Sin embargo, como se ha indicado en la divulgación anterior, este método de fabricación de un electrodo también puede aplicarse a la producción de electrodos para su uso en la detección por espectroscopía de impedancia electroquímica de moléculas sonda que son capaces de realizar una unión específica a especies diana distintas de insulina (denominadas en el presente documento como "otras especies diana").

15 Dichas otras especies diana incluyen proteínas, polipéptidos, anticuerpos, nanopartículas, fármacos, toxinas, gases nocivos, sustancias químicas peligrosas, explosivos, partículas virales, células, organismos multicelulares, citocinas y quimiocinas, ganietocitos, orgánulos, lípidos, secuencias de ácido nucleico, oligosacáridos, intermedios químicos de las rutas metabólicas y macromoléculas. En realizaciones preferidas, la otra especie diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una molécula biológica, más adecuadamente una macromolécula biológica, mucho más adecuadamente un polipéptido.

20 Si la otra especie diana es o comprende una proteína, la proteína puede seleccionarse de, pero sin limitación, proteínas nativas, proteínas desnaturalizadas, fragmentos de proteínas y proteínas expresadas procarionte o eucarióticamente. La proteína puede tener su significado normal en la técnica y mucho más preferiblemente, "proteína" se refiere a una molécula polipeptídica. Dicho polipéptido puede comprender modificaciones tales como glicosilación; fosforilación u otras modificaciones de este tipo.

Si la otra especie diana es un anticuerpo, el anticuerpo puede seleccionarse de una o más de las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

30 Si la otra especie diana es una nanopartícula, la nanopartícula puede seleccionarse de, pero sin limitación, una o más de nanopartículas aislantes, metálicas o semiconductoras.

35 Si la otra especie diana es un fármaco, el fármaco puede seleccionarse de, pero sin limitación, alcohol (por ejemplo, etanol), anfetaminas, nitrato de amilo, heroína, ketamina, esteroides anabólicos, LSD, disolventes, cannabis, cocaína (tal como clorhidrato de cocaína o "coca"), tabaco, tranquilizantes, crack (es decir, base libre de cocaína), éxtasis y/o gammahidroxibutirato (GHB). Como alternativa, en algunas realizaciones, el fármaco puede ser una sustancia medicinal.

40 La otra especie diana puede ser un fármaco candidato, por ejemplo, una entidad química o biológica que puede ser ensayada o cribada para una actividad o propiedad particular usando la presente invención.

Si la otra especie diana es una toxina, la toxina puede seleccionarse de, pero sin limitación, una o más toxinas procedentes de animales, plantas, o bacterias.

45 Si la otra especie diana es una partícula viral, la partícula viral puede seleccionarse de, pero sin limitación, una o más partículas virales con y sin un genoma.

50 Si la otra especie diana es una célula, la célula puede seleccionarse de, pero sin limitación, una o más células progenitoras pluripotentes, células humanas (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, mastocitos, fagocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales), células cancerosas (por ejemplo, las que provienen de cánceres de hígado, hueso cervical, pancreático, colorrectal, próstata, epidérmico, cerebro, mama, pulmón, testicular, renal, vejiga, organismos unicelulares de origen no humano, algas, hongos, bacterias, células vegetales, huevos de parásitos, plasmodios y micoplasmas).

55 Si la otra especie diana es un orgánulo, el orgánulo puede seleccionarse de, pero sin limitación, uno o más de núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, lisosoma, fagosoma, membranas intracelulares, membranas extracelulares, citoesqueleto, membrana nuclear, cromatina, matriz nuclear y cloroplastos.

60 Si la otra especie diana es un lípido, el lípido puede seleccionarse de, pero sin limitación, uno o más de lípidos de señalización, lípidos estructurales, fosfolípidos, glicolípidos y ácidos grasos.

Si la otra especie diana es una secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico puede seleccionarse de, pero sin limitación, uno o más de ADN, ADNc, ARN, ARNr, ARNm, ARNm<sub>i</sub> y ARNt.

65 Si la otra especie diana es un oligosacárido, el oligosacárido se puede seleccionar, pero sin limitación, uno o más de oligosacáridos de origen humano, animal, vegetal, fúngico o bacteriano.

La otra especie diana puede ser cualquier antígeno o analito que sea indicativo de una enfermedad particular. La diana puede seleccionarse de, por ejemplo, proteína C reactiva, enzima convertidora de angiotensina I (peptidil-dipeptidasa A) 1; adiponectina; receptor específico del producto final de glucosilación avanzada; alfa-2-HS-glicoproteína; angiogenina, ribonucleasa, familia A de RNasa, 5; apolipoproteína A-I; apolipoproteína B (incluyendo antígeno Ag(x)); apolipoproteína E; proteína X asociada a BCL2; CLL linfocitos B/linfoma 2; complemento C3; ligando 2 de quimiocina (motivo C-C); CD 14, soluble; CD 40, soluble; cdk5; relacionado con pentraxina; catepsina B, dipeptidil peptidasa IV; factor de crecimiento epidérmico; endoglina; Fas; fibrinógeno; ferritina; hormona del crecimiento 1; alanina aminotransferasa; factor de crecimiento de hepatocitos; haptoglobina; proteína 70kDa de choque térmico 1 B; molécula de adhesión intracelular 1; factor de crecimiento insulínico 1 (somatomedina C), receptor de factor de crecimiento insulínico de tipo 1, proteína 1 de unión a factor de crecimiento insulínico; proteína 2 de unión a factor de crecimiento insulínico; proteína 3 de unión a factor de crecimiento insulínico; interleucina 18; receptor de interleucina 2, alfa; receptor de interleucina 2, beta; interleucina 6 (interferón, beta 2); receptor de interleucina 6, transductor de señal de interleucina 6 (gp130, receptor de oncostatina M); interleucina 8; activina A; leptina (homólogo de obesidad, ratón); activador de plasminógeno, tejido; proopiomelanocortina (adrenocorticotropina/beta-lipotropina/hormona estimuladora de alfa-melanocitos/hormona estimuladora de beta-melanocitos/beta-endorfina); proinsulina; resistina; selectina e (molécula de adhesión endotelial 1); selectina P (proteína de membrana granular 140 kDa, antígeno CD62); inhibidor de serpin peptidasa, clado E (nexina, inhibidor activador del plasminógeno tipo 1), miembro 1; cinasa regulada por suero/glucocorticoide; globulina de unión a hormonas sexuales; factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann); inhibidor de metalopeptidasa TIMP 2; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 1 B; molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1); factor de crecimiento endotelial vascular; Factor II, Factor V, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XII, productos de degradación de F/fibrina, complejo de trombina-antitrombina III, fibrinógeno; plasminógeno, protrombina, y factor von Willebrand, y similares. Los marcadores útiles para la diabetes incluyen, por ejemplo, proteína C reactiva; glucosa; insulina; TRIG; GPT; HSPA1 B; IGFBP2; LEP; ADIPOQ; CCL2; ENG; HP; IL2RA; SCp; SHBG; y TIMP2.

La otra especie diana puede ser una diana asociada con el control de la diabetes. En una realización, la diana puede seleccionarse entre glucosa, insulina, receptor alfa de Interleucina 2 (IL2-RA), proteína C reactiva (CRP) y hemoglobina glicada (HbA1c). Si la otra diana es glucosa, los restos de sonda pueden seleccionarse de, por ejemplo, el elemento de reconocimiento molecular del ensayo GDH-FAD o una proteína de unión a glucosa/galactosa (GGBP) (Scholle et al., Mol. Gen. Genet 208:247-253 (1987)). Si la otra diana es IL-2RA, los restos de sonda pueden comprender o consistir en un anticuerpo monoclonal específico para IL-2RA. Si la otra especie diana es o comprende una proteína C reactiva, preferiblemente ésta es proteína C reactiva humana.

Se cree que la reacción de múltiples etapas de la presente invención da lugar a superficies que tienen características de estabilidad y anti-ensuciamiento mejoradas con respecto a superficies de electrodo modificadas con polímero anteriores. Por consiguiente, la presente invención se refiere también a un electrodo que se puede obtener mediante este método de fabricación de un electrodo. Se apreciará que tales características anti-ensuciantes y de estabilidad son particularmente ventajosas en el contexto de la detección de insulina a partir de muestras fisiológicas, donde la selectividad y la sensibilidad son cuestiones importantes.

Los electrodos modificados con polímero de la presente invención son susceptibles de análisis utilizando técnicas de análisis superficial conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos electroanalíticos (tales como "reducción reductiva") y métodos espectroscópicos de superficie (tales como espectroscopía de fotoelectrones de rayos X y elipsometría) para confirmar que una película de polímero se une químicamente a un electrodo a través de una química basada en azufre. La elipsometría y la microscopía de fuerza atómica se pueden utilizar para definir el espesor de la película y la homogeneidad. La espectroscopía de masas se puede usar para definir la composición de la película. Se puede utilizar adicionalmente electroanálisis adicional, tal como impedancia, para definir la estabilidad y el espesor de la película.

El electrodo que puede obtenerse mediante el método de fabricación de un electrodo de la presente invención puede utilizarse en un método para detectar una especie diana en una técnica EIS. Este método para detectar una especie diana comprende: (a) poner en contacto el electrodo con un medio portador que comprende la especie diana; y (b) detectar la señal eléctrica. En una realización ejemplar, el método es para detectar insulina y por lo tanto el medio portador comprende insulina. Sin embargo, el método también puede aplicarse para la detección de la "otra especie diana" descrita en el presente documento.

De forma análoga, la invención proporciona un espectrómetro de impedancia electroquímica que comprende un electrodo que puede obtenerse mediante el método de fabricación de un electrodo de la presente invención. Preferiblemente, este espectrómetro de impedancia electroquímica comprende un electrodo que se puede obtener por el método de fabricación de un electrodo de la presente invención, en el que el método comprende cada uno de las etapas (a), (b) y (c) descritas en el presente documento (es decir, que da como resultado un electrodo que comprende moléculas sonda unidas a los polímeros que están dispuestos en la superficie plana del sustrato de electrodo). De nuevo, el espectrómetro de impedancia electroquímica es preferiblemente adecuado para detectar insulina (es decir, comprende un electrodo que comprende moléculas sonda capaces de unirse selectivamente a la insulina). Sin embargo, también se proporcionan espectrómetros de impedancia electroquímica adecuados para

detectar "otra especie diana" descrita en el presente documento y que comprenden de este modo un electrodo que comprende moléculas sonda capaces de unirse selectivamente a una especie diana de interés.

5 También de manera similar, la invención proporciona el uso de un electrodo que puede obtenerse mediante el método de fabricar un electrodo de la presente invención para detectar una especie diana mediante una técnica EIS. De nuevo, este uso comprende preferiblemente el uso para detectar la insulina. Sin embargo, el uso también puede usarse para detectar "otras especies diana" definidas en el presente documento.

10 Un aspecto particularmente preferido de la invención se refiere a un método para detectar insulina en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica en la que:

- la técnica es una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica no farádica;
- el método comprende calcular la concentración de insulina a partir de la señal eléctrica, en el que la concentración de insulina se calcula a partir de un cambio de fase en una señal eléctrica que se produce tras la unión de la insulina a las moléculas sonda. y
- el electrodo se puede obtener por el método de fabricación de un electrodo de la presente invención,

20 Los inventores han descubierto que tal método da lugar a un método excepcionalmente selectivo para detectar la insulina hasta límites de detección muy bajos (de los órdenes de 1 pM o menores) en muestras biológicas complejas y que es fácilmente aplicable a diagnósticos de punto de atención.

Los métodos y electrodos proporcionados en el presente documento se describen a continuación con referencia a Ejemplos particulares. La invención no pretende limitarse a estos Ejemplos particulares.

#### 25 **Ejemplo 1 - Detección de insulina por EIS farádica, a través de análisis de resistencia de transferencia de carga, en un electrodo modificado con PEG**

(Ejemplo Comparativo) *Productos químicos y reactivos*

30 Se adquirieron insulina humana, suero sanguíneo humano, estreptavidina y albúmina de suero bovino (BSA) en Sigma Aldrich. Se adquirió el anticuerpo monoclonal anti-insulina (isotipo IgG1 de ratón) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Se adquirieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y dimetilsulfóxido (DMSO) en Sigma Aldrich. Se adquirió tiol QUE CONTENÍA POLIETILENGLICOL (PEG) HS-C<sub>11</sub>-(EG)<sub>3</sub>-OCH<sub>2</sub>-COOH en Prochimia Surfaces, Polonia. Se preparó solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Tween-20 (PBST, 10 mM, pH 7,4) disolviendo tabletas de PBS (Sigma Aldrich) en agua ultrapura con Tween-20 al 0,2% v/v añadido y se filtró usando un filtro de membrana de 0,22 µm. Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica. Se obtuvo agua ultrapura (18,2 MΩ/cm) a partir de un sistema Milli-Q y se utilizó en todas partes.

*Aparato*

40 Los experimentos electroquímicos se realizaron en un potenciostato Autolab 12 equipado con un módulo FRA2 (Metrohm Autolab B.V.). Se utilizó un sistema convencional de tres electrodos con electrodos de trabajo de disco de oro (1,6 mm de diámetro, BASi), un contador de alambre de platino y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, relleno con KCl 1,0 M) (CH Instruments). Todos los potenciales informados son relativos al electrodo de referencia Ag/AgCl.

*Preparación de la superficie del sensor.*

50 Los electrodos de oro se pulieron primero secuencialmente con pulverizador de diamante de 3,0, 1,0 y 0,1 µm (Kemet International Ltd) y luego se lavaron por ultrasonidos en agua (aproximadamente 5 minutos) antes de sumergirse en solución piraña caliente (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, v/v 3:1. Precaución: ¡tratar con cuidado!) durante 15 min. Finalmente, los electrodos se pretrataron electroquímicamente de acuerdo con un reporte anterior (Xiao Y, Lai RY, Plaxco KW; 2007 Nature protocols 2: 2875-2880), con algo de alteración. En resumen: se realizaron exploraciones de voltamperometría cíclica (CV) en KOH 0,5 M en el intervalo de potencial de -0,35 V a -1,35 V a una velocidad de exploración de 2 V/s, hasta que las curvas fueron estables. Después de este tratamiento, se realizaron escaneos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M en el intervalo de potencial de -0,35 a 1,5 V (4 V/s) hasta que se obtuvo un pico estable marcado de reducción. La superficie eficaz del electrodo de oro se puede calcular durante este procedimiento (Hoogvliet JC, Dijkstra M, Kamp B, van Bennekom WP; 2000 Anal Chem 72: 2016-2021). Los electrodos de oro pretratados se secaron en un flujo de gas nitrógeno e inmediatamente se sumergieron en una solución de Hs-C<sub>11</sub>-(EG)<sub>3</sub>-OCH<sub>2</sub>-COOH 50 µM en etanol durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la formación de la monocapa, los electrodos se aclararon con etanol, luego con agua y se secaron en un flujo de gas nitrógeno, antes de la incubación en una solución que contenía EDC 0,4 M y NHS 0,1 M para activar los grupos carboxilo terminales (-40 minutos). Los anticuerpos de insulina se inmovilizaron posteriormente sumergiendo el electrodo de oro en una solución de anticuerpo 1,0 µM (PBST, pH 7,4) durante 10 horas a 4 °C. Con el fin de bloquear los sitios activos en la superficie del electrodo, el electrodo modificado se empapó finalmente en BSA 100 µM durante 6 horas a 4° C, después se aclaró con PBST antes de análisis.

*Espectroscopía de impedancia electroquímica*

Las mediciones de EIS se realizaron con un potenciostato Autolab 12 equipado con un módulo FRA2 usando un sistema de tres electrodos y un intervalo de frecuencias de 0,01 Hz a 10 kHz. La amplitud de la onda sinusoidal aplicada fue de 10 mV con el potencial de corriente continua ajustado en 0,22 V (que es el  $E_0$  de la sonda redox utilizada). Todos los análisis se llevaron a cabo en solución de PBST 10 mM que contenía  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M y se representaron en forma de diagramas planos complejos (gráficos de Nyquist) montados posteriormente utilizando un circuito equivalente estándar de Randles.

10 *Funcionamiento del sensor*

Para la detección de insulina, se incubaron las interfases receptoras preparadas en PBST 10 mM pH 7,4 con  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M que contenía concentraciones específicas de insulina a temperatura ambiente durante 30 min, y las respuestas de EIS se registraron en la misma solución. Para evaluar la selectividad de los sensores, se utilizó inicialmente la estreptavidina. Para los ensayos "in situ" en suero (10% v/v con PBST 10 mM,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM, KCl 0,1 M), los electrodos se incubaron en diferentes concentraciones de PBST con insulina añadida durante 30 min antes del análisis por EIS en la misma solución. Los ensayos "ex situ" también se realizaron en suero adicionado (1-80% v/v con PBST 10 mM,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM, KCl 0,1 M) por incubación del electrodo durante 30 min antes de aclarar PBST y análisis por EIS en PBST 10 mM pH 7,4 con  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,0 mM y KCl 0,1 M. Las interfaces de electrodo usadas se regeneraron por inmersión en tampón Gly-HCl 0,2 M a pH 2,0 que contenía DMSO al 1 % durante 5 min para disociar la insulina unida, antes del aclarado con PBST y la reutilización.

*Resultados - Fabricación de biosensores*

Las gráficas de impedancia de Nyquist incluyen una porción semicircular a altas frecuencias y una porción lineal a frecuencias más bajas correspondientes a los procesos de transferencia de carga limitada y de difusión, respectivamente. El primero puede cuantificarse, a través del diámetro del semicírculo, como la resistencia de transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) del electrodo modificado, cuando está montado usando el circuito equivalente estándar de Randles (recuadro en la figura 1) (como se explica, por ejemplo, en (a) Guo XF, Kulkarni A, Doepke A, Halsall HB, Iyer S, Heineman WR; 2012. Anal Chem 84: 241-246 y (b) Vyas RN, Li KY, Wang B; 2010 J Phys Chem B 114: 15818-15824; el contenido de estos documentos se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

Se usaron inicialmente análisis EIS farádicos para caracterizar la construcción de las superficies receptoras, observando, predeciblemente, fuertes aumentos en  $R_{ct}$  en la formación de SAM de PEG (<50  $\Omega$  a -120 k $\Omega$ ) e inmovilización de anticuerpos (-200 k $\Omega$ , figura 1).

*Resultados - Detección de insulina en tampón*

A pesar del peso molecular comparativamente bajo de la proteína diana, se observó que las interfaces preparadas eran sensiblemente sensibles a la insulina en PBST incluso en el intervalo picomolar bajo (figura 2). Puede ser que esta sensibilidad, al menos parcialmente, sea ayudada por la carga negativa de insulina (el punto isoeléctrico de la insulina humana es aproximadamente 5,4) a este pH y la repulsión electrostática resultante de la sonda redox. Análisis más detallados revelan una buena correlación lineal ( $R^2 = 0,994$ ) entre  $R_{ct}$  y el valor logarítmico de la concentración de insulina, un intervalo lineal de 5 pM a 50 nM y un límite de detección de  $1,24 \pm 0,01$  pM (figura 2). La constante de disociación interfacial  $K_D$ , se calculó que era de  $0,11 \pm 0,01$  nM, un valor en muy buen acuerdo con la determinación previa de fluorescencia inducida por láser. Las interfaces preparadas presentan una respuesta insignificante (<5% de cambio en la señal de referencia) a estreptavidina o concentraciones de BSA de hasta 100 nM.

*Resultados - Detección de insulina en suero de sangre*

Los ensayos de suero de insulina se evaluaron de dos maneras. En primer lugar, los ensayos "in situ" se llevaron a cabo con un suero enriquecido al 10% en PBST (figura 3). Bajo tales condiciones, las evaluaciones lineales fiables eran posibles en el rango clínicamente relevante con un límite de detección de  $4,70 \pm 0,64$  pM. Por extrapolación de los datos adquiridos a través de tales análisis, los niveles de insulina presentes en suero nativo (no enriquecidos) podrían determinarse a  $60,1 \pm 3,9$  pM, dentro del rango normal informado.

Los análisis "ex situ" posteriores se llevaron a cabo con suero sanguíneo enriquecido con insulina a una dilución controlable en PBST (figura 4). Los biosensores se incubaron en estas soluciones y luego se midieron después de enjuagar con PBST. Los ensayos fueron eficaces y se mantuvieron fuertes en suero sanguíneo al 50 %, con una respuesta de interferencia de menos del 3 % de la respuesta de ensayo en solución tampón pura. La figura 5 muestra la curva de calibración de ensayo "ex situ" de la detección de insulina en suero sanguíneo al 50 %. Se obtuvo un intervalo lineal similar al de los ensayos en solución tampón pura, con un límite de detección de  $4,77 \pm 0,99$  pM.

*Resultados - Regeneración de biosensores*

La regeneración de biosensores se consiguió mediante inmersión superficial en tampón Gly-HCl 0,2 M que contenía DMSO al 1 % durante 5 min para dissociar el complejo anticuerpo de insulina-antígeno. Posteriormente, los electrodos pueden reutilizarse en ensayos con un mínimo perjuicio a la sensibilidad (<4% de desviación en la sensibilidad a lo largo de 4 evaluaciones y regeneraciones de generaciones repetidas - véase la figura 6).

**Ejemplo 2 - Detección de insulina por EIS no farádica, a través de análisis de fases, en un electrodo modificado con polímero de betaina***Productos químicos y reactivos*

Se adquirieron insulina humana, suero sanguíneo humano, estreptavidina y albúmina de suero bovino (BSA) en Sigma Aldrich. Se adquirió el anticuerpo monoclonal anti-insulina (isotipo IgG1 de ratón) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Se adquirieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en Sigma Aldrich. Se adquirió  $\beta$ -propiolactona en Alfa Aesar. Se adquirieron metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo (DMAEM), acetona anhidra, dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y el fotoiniciador 2-hidroxi-2-metilpropiofenona en Sigma Aldrich.

Se preparó una solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4) disolviendo tabletas de PBS (Sigma Aldrich) en agua ultrapura y se filtró usando un filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m. Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica. Se obtuvo agua ultrapura (18,2 M $\Omega$ /cm) a partir de un sistema Milli-Q y se utilizó en todas partes.

*Aparato*

Los experimentos electroquímicos se realizaron en un potenciostato Autolab 12 equipado con un módulo FRA2 (Metrohm Autolab B.V.). Se utilizó un sistema convencional de tres electrodos con electrodos de trabajo de disco de oro (1,6 mm de diámetro, BASi), un contador de alambre de platino y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl, relleno con KCl 1,0 M) (CH Instruments). Todos los potenciales informados son relativos al electrodo de referencia Ag/AgCl. La polimerización ultravioleta (UV) se realizó con una lámpara UV (CAMAG).

*Preparación de la superficie del sensor.*

El monómero metacrilato de carboxibetaina (CBMA) se sintetizó según métodos conocidos. En resumen: se añadieron gota a gota 10 ml de  $\beta$ -propiolactona 12 mM en acetona a 50 ml de DMAEM 10 mM en acetona anhidra y la mezcla de reacción se agitó bajo protección de nitrógeno a 15 °C durante 5 h. El precipitado blanco se lavó con 50 ml de acetona anhidra y 100 ml de éter anhidro. El producto se secó a presión reducida para obtener el producto monómero CBMA final y el monómero se mantuvo a 2-8 °C antes de la polimerización.

Los electrodos de oro se pulieron primero secuencialmente con pulverizador de diamante de 3,0, 1,0 y 0,1  $\mu$ m y luego se lavaron por ultrasonidos en agua (aproximadamente 5 minutos) antes de sumergirse en solución piraña recién preparada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, v/v 3:1. Precaución: ¡tratar con cuidado!) durante 15 min. Finalmente, los electrodos se pretrataron electroquímicamente, exploraciones de voltamperometría cíclica (CV) en KOH 0,5 M en el intervalo de potencial de 0,35 V a -1,35 V a una velocidad de exploración de 2 V/s, hasta que las curvas fueron estables. Después de este tratamiento, se realizaron escaneos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M en el intervalo de potencial de -0,35 a 1,5 V (4 V/s) hasta que se obtuvo un pico estable marcado de reducción.

Los electrodos de oro pretratados se secaron en un flujo de gas nitrógeno e inmediatamente se sumergieron en una solución de cisteamina 5 mM en etanol durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de la formación de la monocapa, los electrodos se aclararon con etanol, luego con agua y se secaron en un flujo de gas nitrógeno, antes de la incubación en una solución que contenía EDC 0,4 M, NHS 0,1 M y CBMA 0,5 mM para unir el CBMA a los grupos amina terminales (3 horas). Después de la unión de CBMA, se aplicaron gota a gota 1,0  $\mu$ l de solución de fotopolimerización (preparada disolviendo 17,2 mg de CBMA, 0,2 mg de EGDMA y 1,17 mg de fotoiniciador en 0,1 ml de agua) sobre la superficie del electrodo de Au y la reacción de fotopolimerización se llevó a cabo a 25 °C durante 30 minutos bajo una luz UV de 254 nm para formar metacrilato de poli(carboxibetaina) (PCBMA). El electrodo modificado con PCBMA se empapó entonces en PBS 10 mM (cambiar el PBS después de 30 min) durante 12 h para liberar los productos químicos sin reaccionar y equilibrar el polímero tipo hidrogel.

Con el fin de unir el anticuerpo de insulina al electrodo modificado con PCBMA, el electrodo se sumergió en primer lugar en una solución que contenía EDC 0,4 M y NHS 0,1 M durante 30 minutos para activar los grupos carboxilo terminales y después lavando con PBS, se inmovilizaron los anticuerpos de insulina sumergiendo el electrodo en una solución de anticuerpo 1,0  $\mu$ M (PBS 10 mM, pH 7,4) durante 3 horas a temperatura ambiente. Con el fin de desactivar los grupos terminales no reaccionados, el electrodo modificado se empapó finalmente en BSA 100  $\mu$ M durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se aclaró con PBS y se almacenó en PBS antes de análisis.

*Espectroscopía de impedancia electroquímica*

Las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) no farádica se realizaron con un potencióstato Autolab 12 equipado con un módulo FRA2 usando un sistema de tres electrodos y un intervalo de frecuencias de 0,1 Hz a 100 kHz, o 100 Hz si se indica, con el potencial ajustado a 0 V. Todos los análisis se llevaron a cabo en PBS 10 mM pH 7,4, y se representaron en forma de gráficos Bode, y la fase registrada a 0,2 Hz se utilizó para el análisis.

*Funcionamiento del sensor*

Para la detección de insulina, se incubaron las interfases receptoras preparadas en PBS 10 mM pH 7,4 que contenía concentraciones específicas de insulina a temperatura ambiente durante 30 min, y se registraron respuestas de EIS en PBS puro después de aclarado a través de PBS. La figura 7 muestra que los datos de cambio de fase extraídos de las mediciones de EIS no farádica son capaces de determinar la concentración de insulina hasta niveles de sub-pM.

Para evaluar la selectividad de los sensores, se ensayaron de forma similar BSA y PBS que contenían diferentes volúmenes de suero humano (1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 %, 80 % y 100 %). La figura 8 muestra que no existe sustancialmente ningún efecto de interferencia/ensuciamiento sobre la señal EIS de cambio de fase que se origina en las muestras que no contienen insulina.

Las barras de error en los datos informados representan la desviación estándar de tres mediciones.

*Resumen*

El sistema de ensayo del Ejemplo 2, que se basa en un EIS no farádico, analizado a través de datos de cambio de fase y que utiliza la superficie de electrodo modificada con polímero descrita en el presente documento, muestra un rendimiento mejorado (por ejemplo, mejor ajuste lineal, mejor límite de detección y demostración con medios de soporte de suero al 100 %) en comparación con el sistema de ensayo del Ejemplo 1.

**Ejemplo 3 - Datos adicionales relacionados con la detección de insulina por EIS no farádico, a través de análisis de fases, en un electrodo modificado con polímero de betaína**

Se investigaron algunas propiedades adicionales de los electrodos y métodos de la invención. Los electrodos se fabricaron, y se realizó EIS, sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2.

La estabilidad de la interfase de polímero de PCBMA zwitteriónico quimisorbido (antes del acoplamiento de los anticuerpos anti-insulina) se evaluó mediante EIS. La interfaz mostró una excelente estabilidad durante un mes. En particular, tal como se muestra en la figura 10, se registraron gráficos de fase Bode no farádicos del electrodo a diferentes intervalos de tiempo a lo largo de 32 días en PBS (10 nM, pH 7,4). Se encontró que la desviación estándar de la fase registrada a 0,2 Hz era inferior al 0,5 %, indicando una excelente estabilidad interfacial. Obsérvese que el hidrogel y la naturaleza hidrófila extrema de estas películas excluyen cualquier caracterización SEM, TEM, espectroscópica, de ángulo de contacto o elipsométrica.

La figura 11 muestra tanto el cambio de impedancia como la fase obtenida mediante la realización de la presente técnica de EIS no farádica en PBS 10 mM (pH 7,4), en un intervalo de frecuencias de 0,1-100 KHz, en muestras que contienen diferentes cantidades de insulina (0 pM, 1 pM, 10 pM, 100 pM y 2000 pM). Esto último, que es independiente del área de superficie del electrodo, se controló por métodos de impedancia estándar. Ya se puede ver en esta figura que la sensibilidad a los cambios en la concentración de insulina es mucho mayor cuando se evalúa el cambio de fase en lugar de la impedancia, particularmente en la región de baja frecuencia. La figura 12 compara además (A) las curvas de cambio de fase con las curvas de impedancia (B) en frecuencias seleccionadas. La figura 13 muestra con más detalle todavía los cambios de fase limpios registrados en el dominio de baja frecuencia y demuestra cómo la frecuencia de muestreo se puede optimizar fácilmente a la respuesta más sensible a la insulina (aquí 0,2 Hz, que corresponde a un valor  $\log\{\text{frecuencia}\}$  0,7 en el eje x de la figura). Obsérvese que la fluctuación en el centro de las curvas es meramente un artefacto potencióstático y no tiene impacto sobre la validez de las mediciones.

Para confirmar la aplicabilidad del método a la detección cuantitativa en suero sanguíneo puro, se realizaron ensayos de insulina enriquecida en diferentes soluciones de suero y se reveló que la cuantificación estaba consistentemente dentro del 2 % de la de PBS puro (véase la figura 14).

La aplicación de las interfaces para la cuantificación de la insulina en una cohorte de muestras de pacientes (abarcando un amplio intervalo de concentraciones) se resume en la figura 15, donde es evidente que los ensayos se comportan bien y se comparan bien (estando la mayor parte de los resultados dentro del 5 % uno de otro) con cuantificación comparativa de las mismas muestras mediante un ensayo de quimioluminiscencia estándar. En la figura 16 se muestra un análisis más detallado de Bland Altman a través de muestras de pacientes evaluadas tanto

5 en macro electrodos de oro como en matrices de microelectrodos, donde las diferencias de cuantificación entre EIS y quimioluminiscencia están en gran medida dentro del 10 % a lo largo de todo el intervalo de concentración. Esto es muy alentador ya que los niveles actuales del acuerdo entre los métodos comúnmente utilizados en el uso clínico pueden mostrar una variación del 200 % en los resultados a través de diferencias en la sensibilidad y especificidad del ensayo.

El trabajo que conduce a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Acuerdo Marco de la Unión Europea (FP7/2007-2013) con el acuerdo de subvención n.º 271775.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar un electrodo para su uso en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, método que comprende:

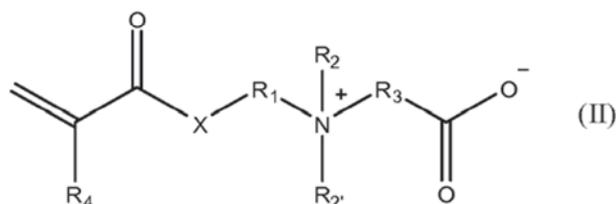
- 5 (a) unir monómeros de betaína fotopolimerizables a la superficie plana de un sustrato, obteniendo de este modo una superficie modificada que tiene una capa de monómeros de betaína fotopolimerizables dispuestos sobre la misma; después  
 10 (b) poner en contacto dicha superficie modificada con monómeros de betaína fotopolimerizables adicionales, y opcionalmente reticular monómeros, y polimerizar fotoquímicamente los monómeros, generando de ese modo un electrodo que comprende polímeros dispuestos sobre dicha superficie plana;

en el que la fijación de la capa de monómeros de betaína fotopolimerizables en la etapa (a) está sustancialmente completa antes de que la superficie modificada entre en contacto con otros monómeros de betaína fotopolimerizables, y opcionalmente reticular monómeros, y la polimerización fotoquímica se lleva a cabo en la etapa (b).

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los monómeros de betaína fotopolimerizables comprenden cada uno un doble enlace carbono-carbono fotopolimerizable.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los monómeros de betaína fotopolimerizables comprenden cada uno un catión de amonio cuaternario y un grupo carboxilato.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los monómeros de betaína fotopolimerizables tienen la fórmula (II)



en la que:

- 30 R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquileo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;  
 R<sub>2</sub> y R<sub>2</sub>' son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>;  
 R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>; y  
 X es O o NH.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los monómeros de betaína fotopolimerizables se seleccionan entre metacrilato de carboxibetaína (CBMA), carboxibetaína acrilamina (CBAA) y etilacrilato de carboxibetaína (CBEA).

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además (c) unir moléculas sonda aptas para unión específica a una especie diana a dichos polímeros.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la especie diana es insulina.

8. Un electrodo que se puede obtener mediante el método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un método para detectar una especie diana en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica, comprendiendo el método: (a) poner en contacto un electrodo como se define en la reivindicación 8 con un medio portador que comprende dicha especie diana; y (b) detectar una señal eléctrica.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, que es un método para detectar insulina en una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica no farádica, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto un electrodo que puede obtenerse mediante un método según la reivindicación 7, con un medio portador que comprende insulina;  
 (b) detectar una señal eléctrica; y y  
 (c) calcular la concentración de insulina de la señal eléctrica,  
 en el que la concentración de insulina se calcula a partir de un cambio de fase en una señal eléctrica que se produce tras la unión de la insulina a las moléculas sonda.

11. Un espectrómetro de impedancia electroquímica que comprende un electrodo como se define en la reivindicación 8.

5 12. Uso de un electrodo según la reivindicación 8 para detectar una especie diana mediante una técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica.

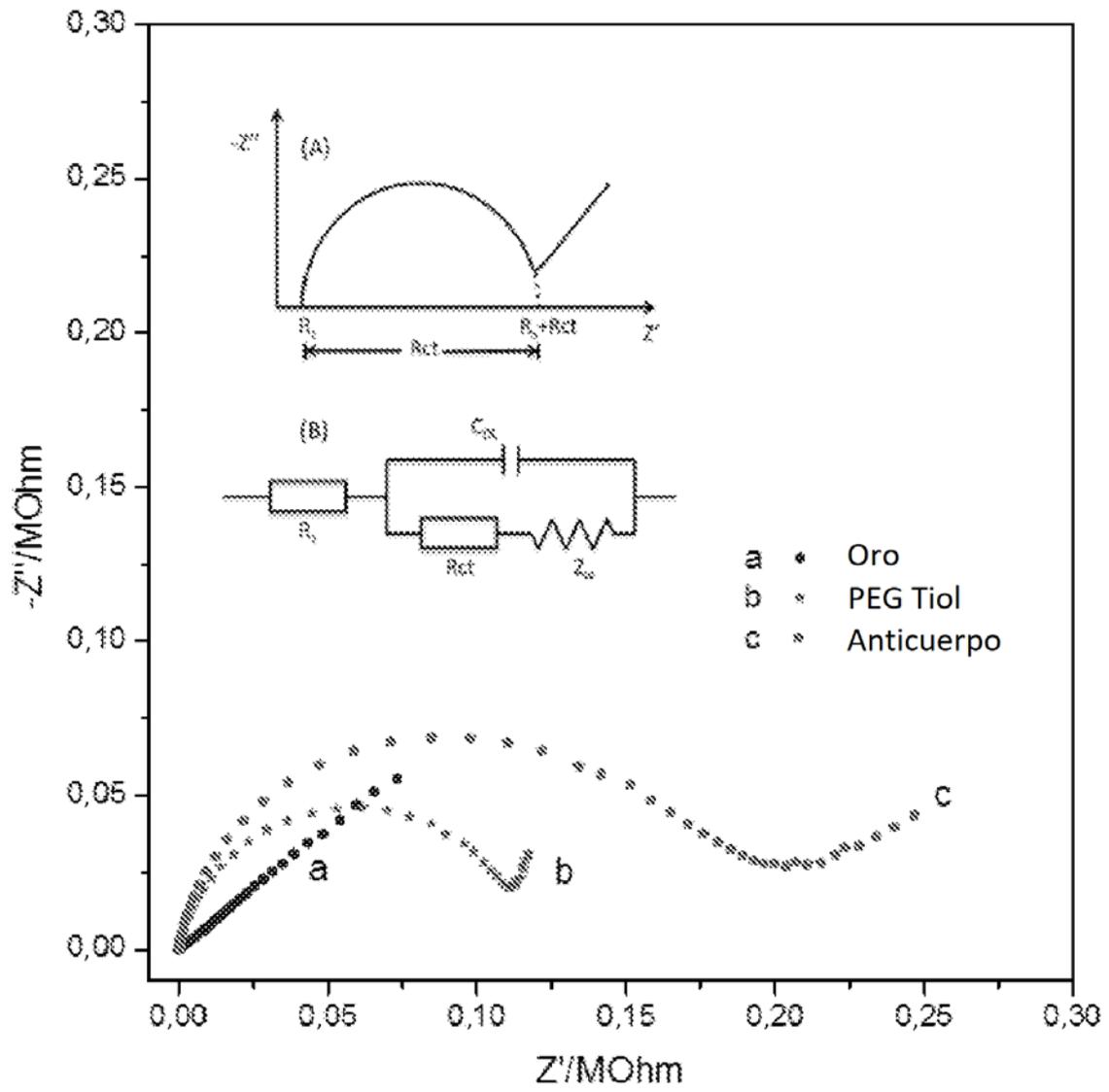


Fig. 1

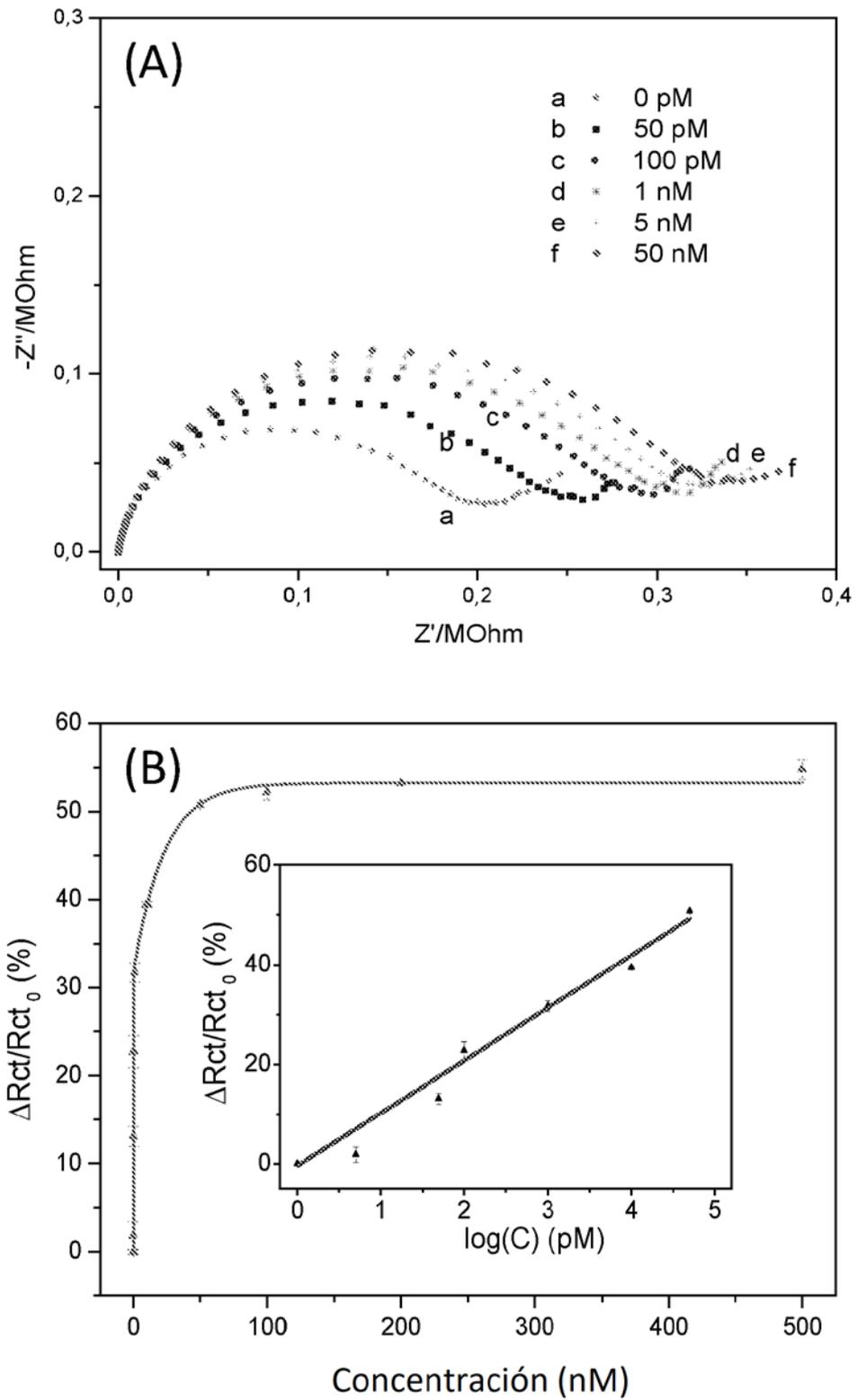


Fig. 2

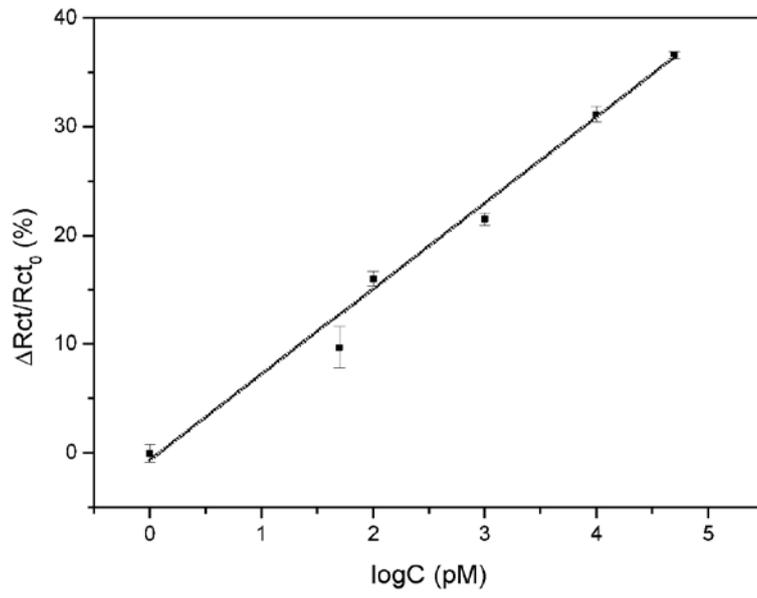


Fig. 3

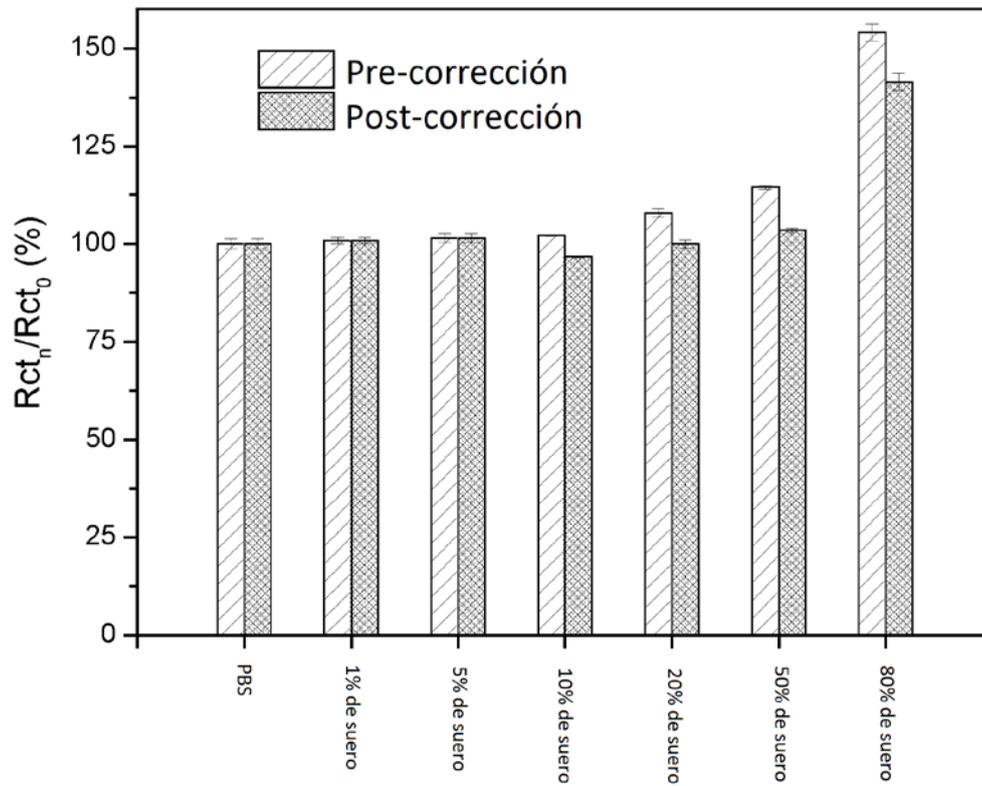


Fig. 4

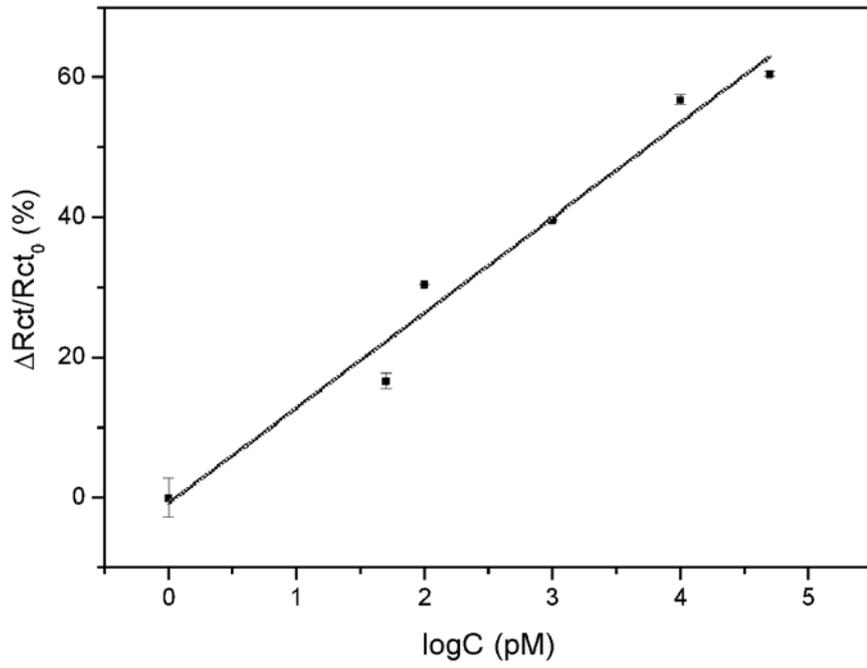


Fig. 5

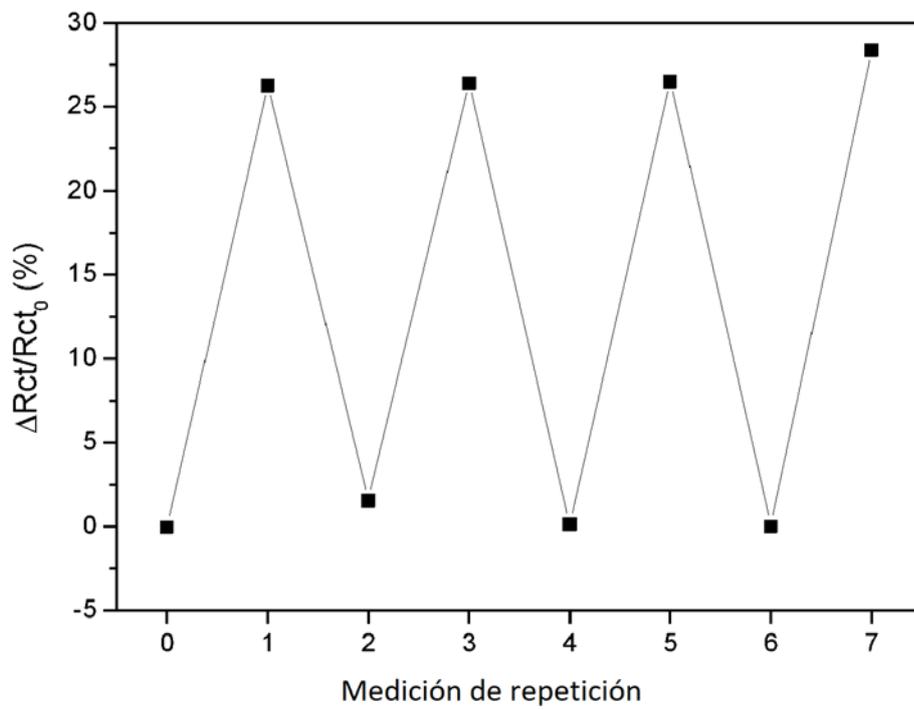


Fig. 6

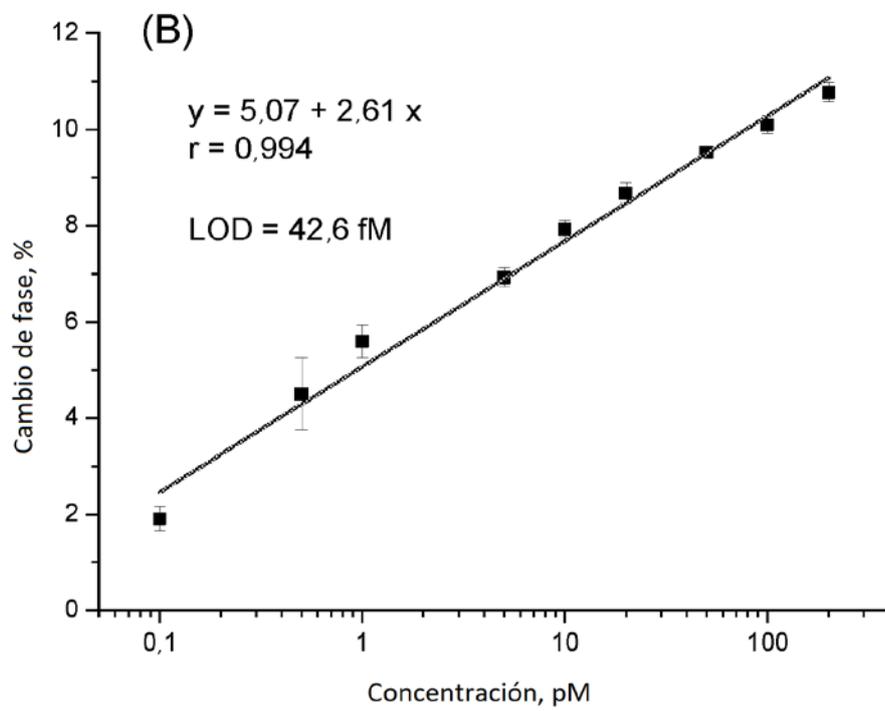
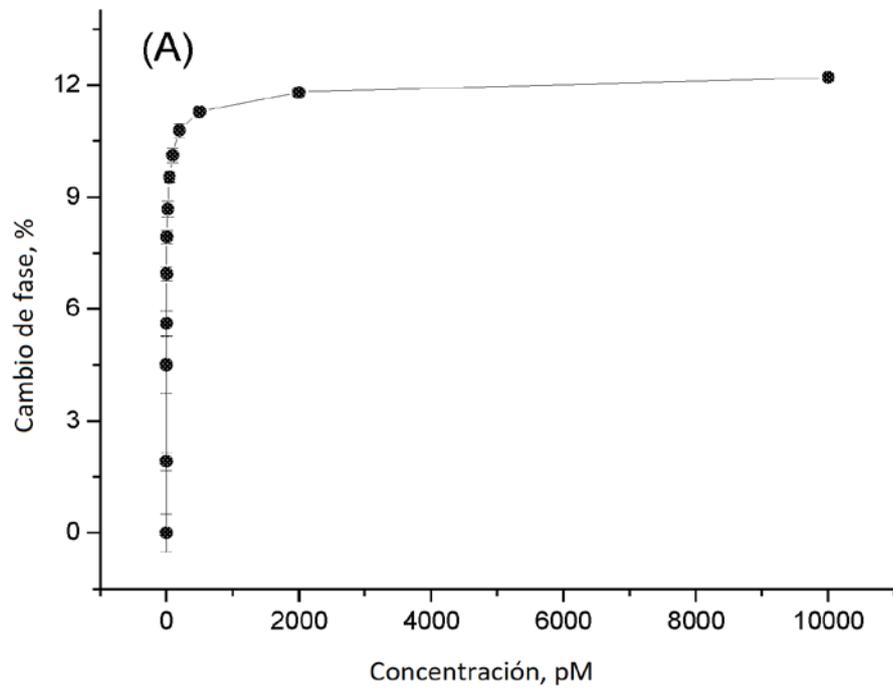


Fig. 7

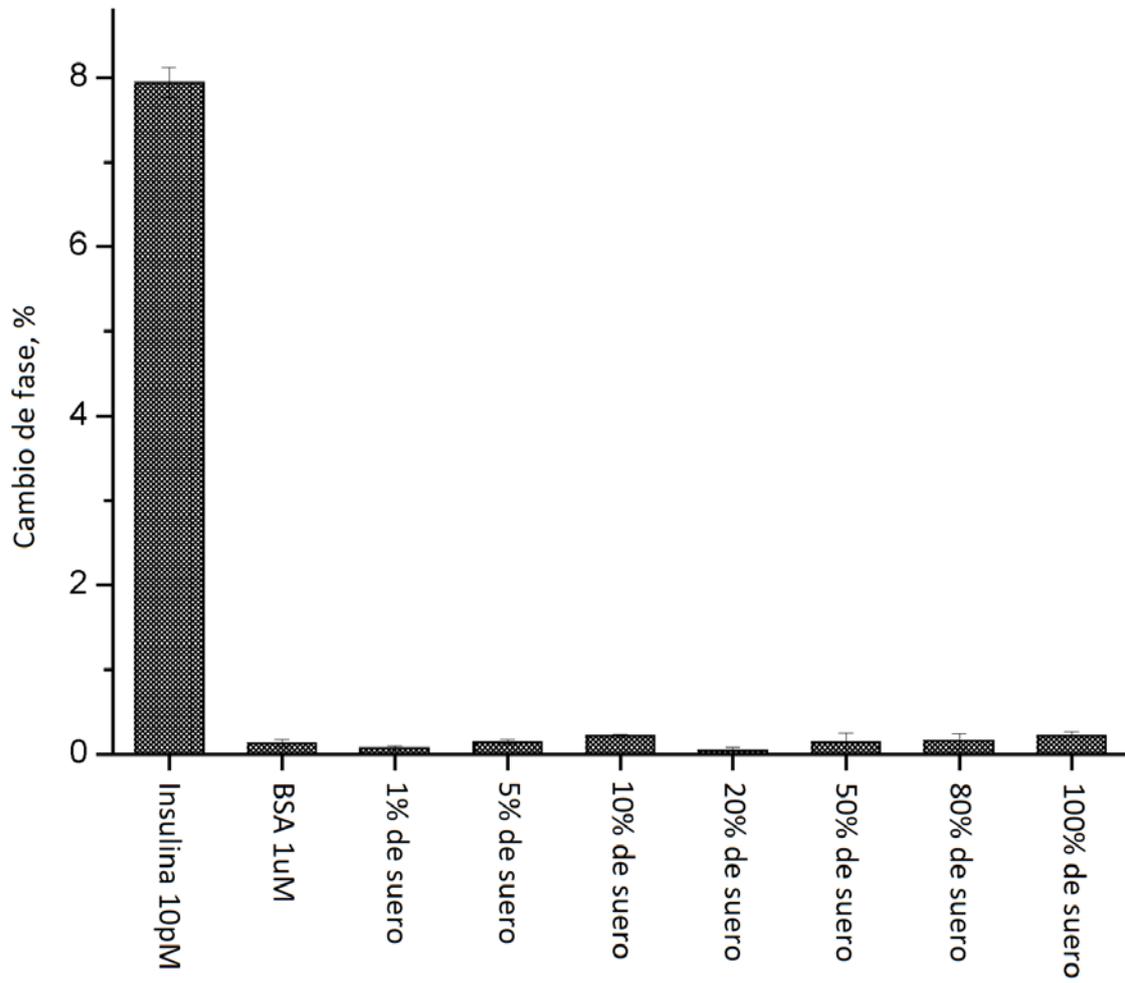


Fig. 8

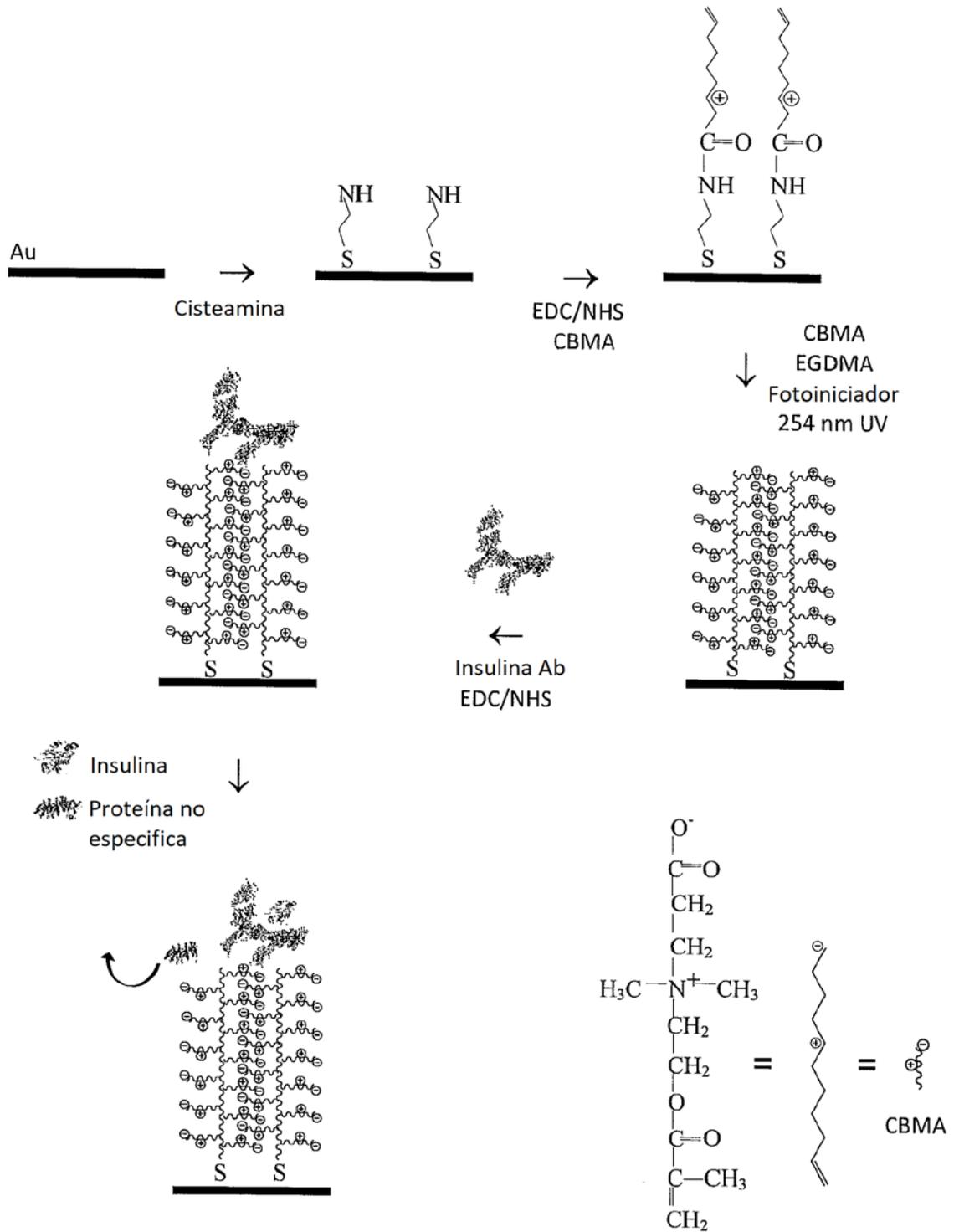


Fig. 9

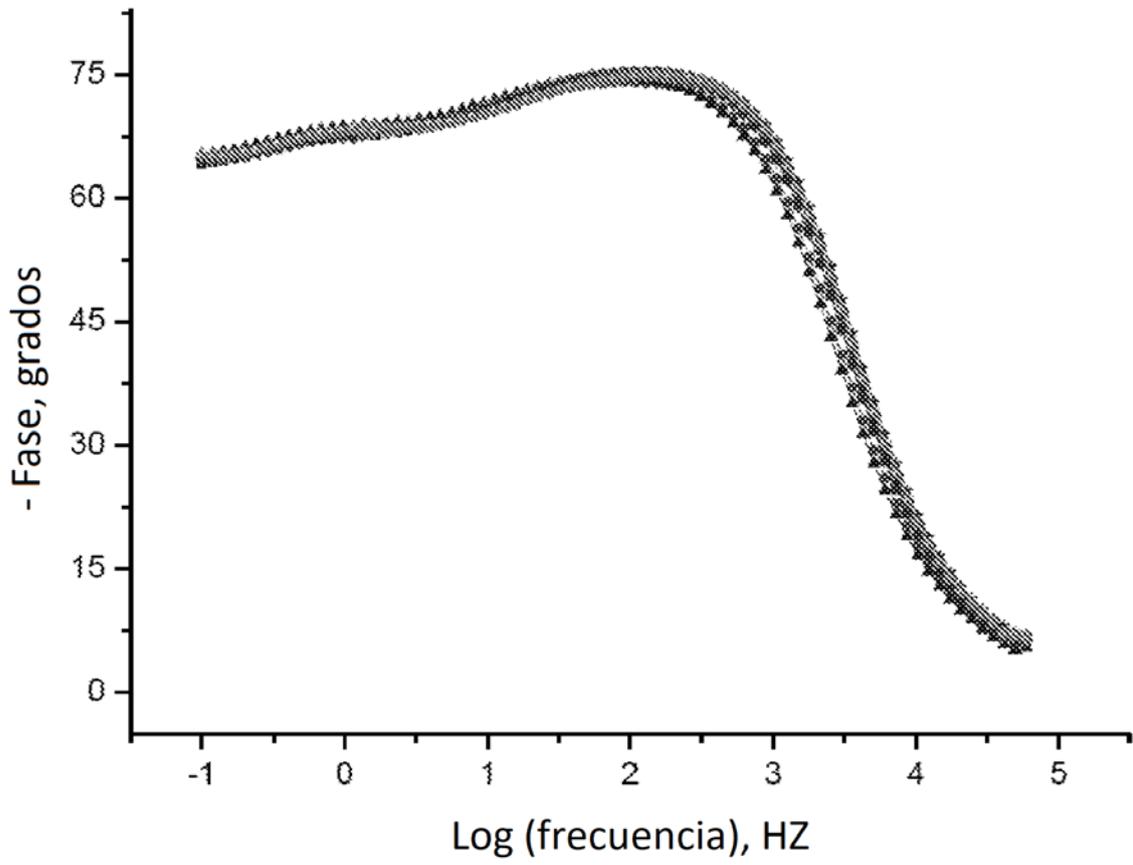


Fig. 10

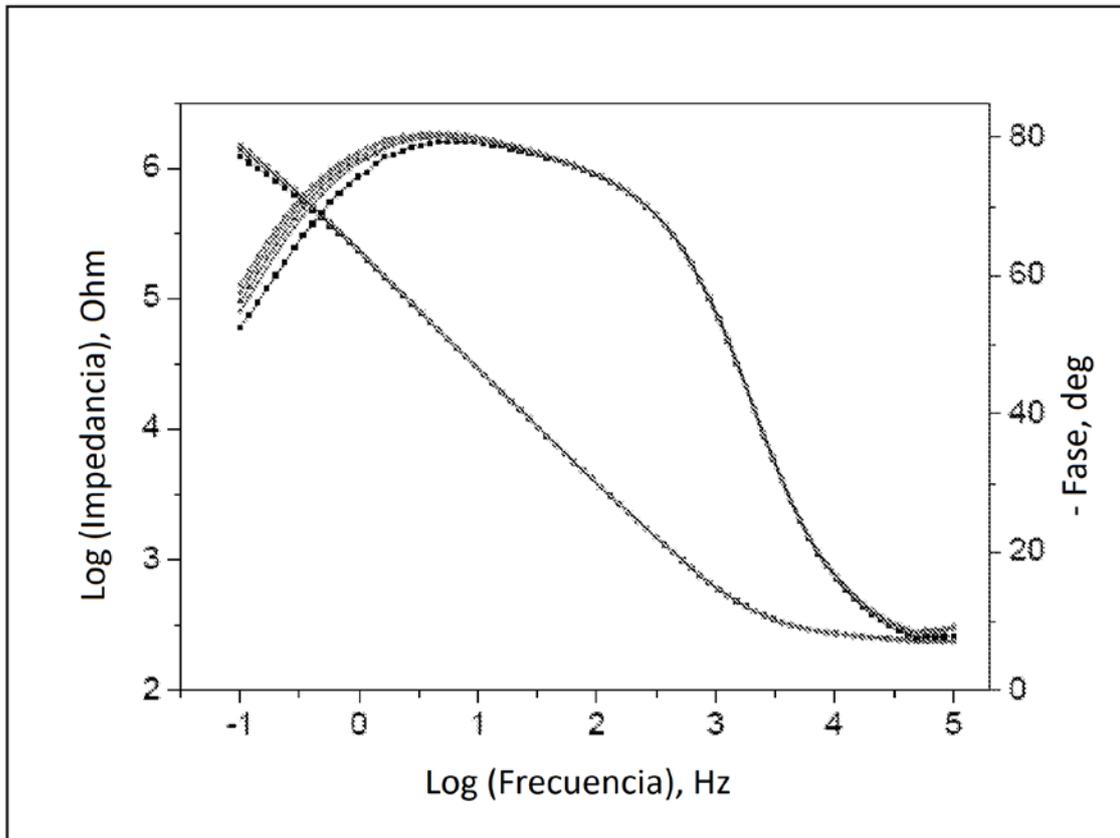


Fig. 11

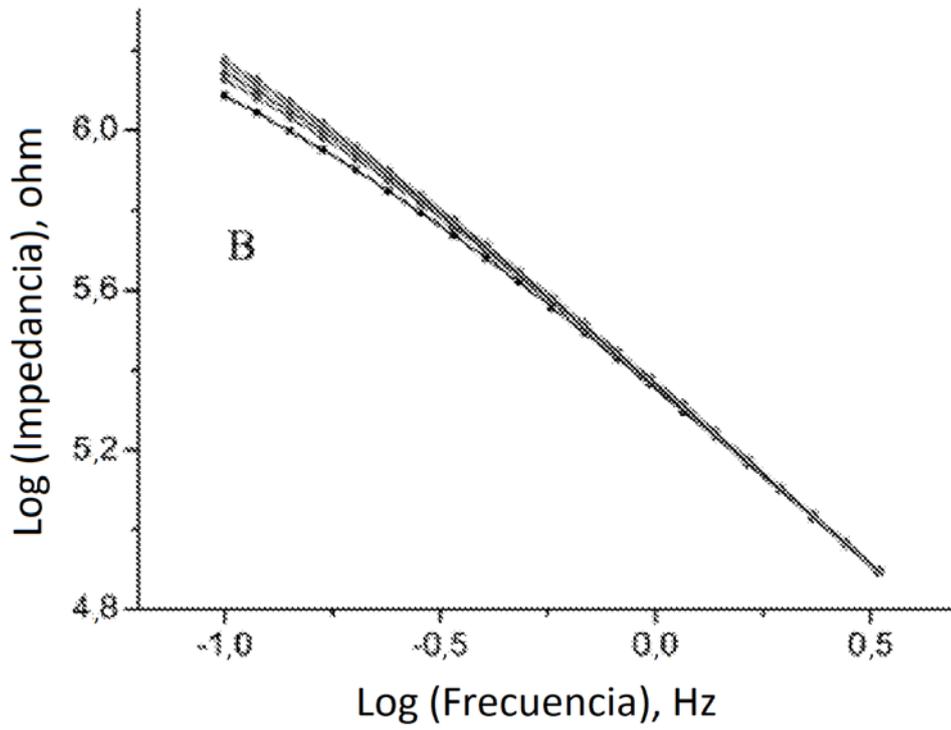
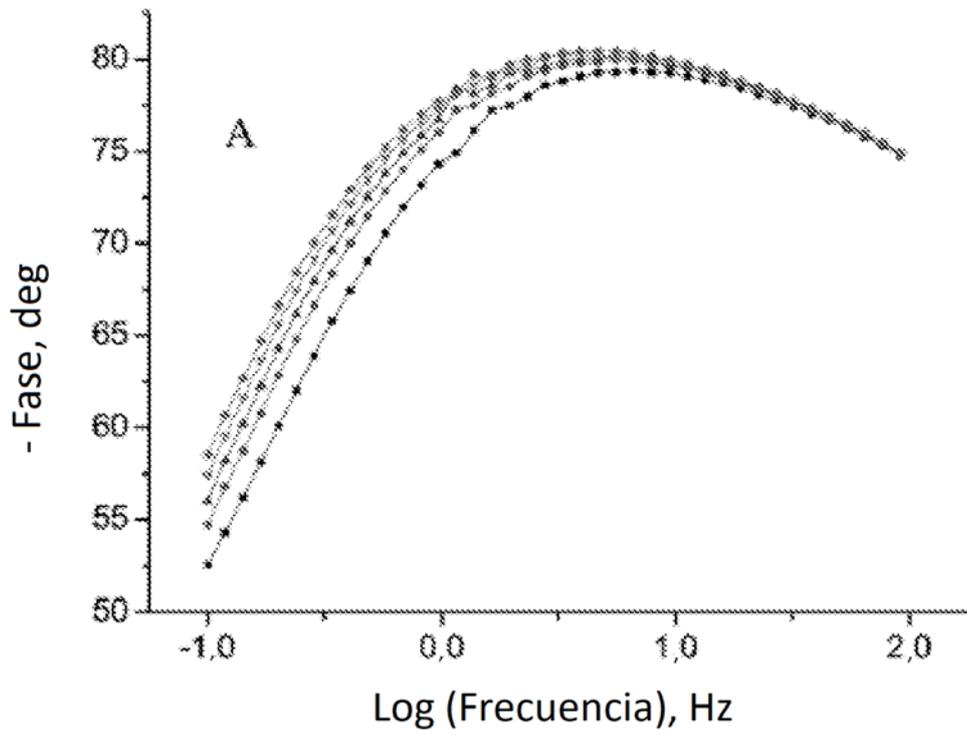


Fig. 12

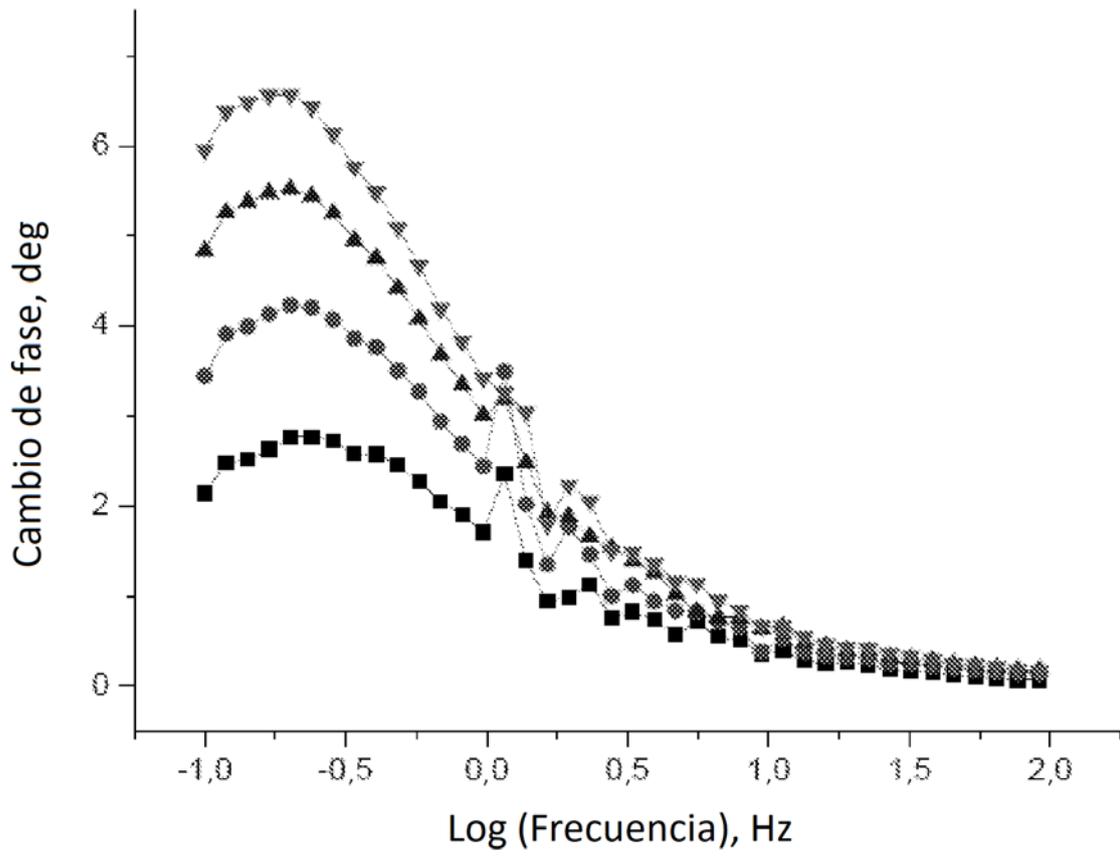


Fig. 13

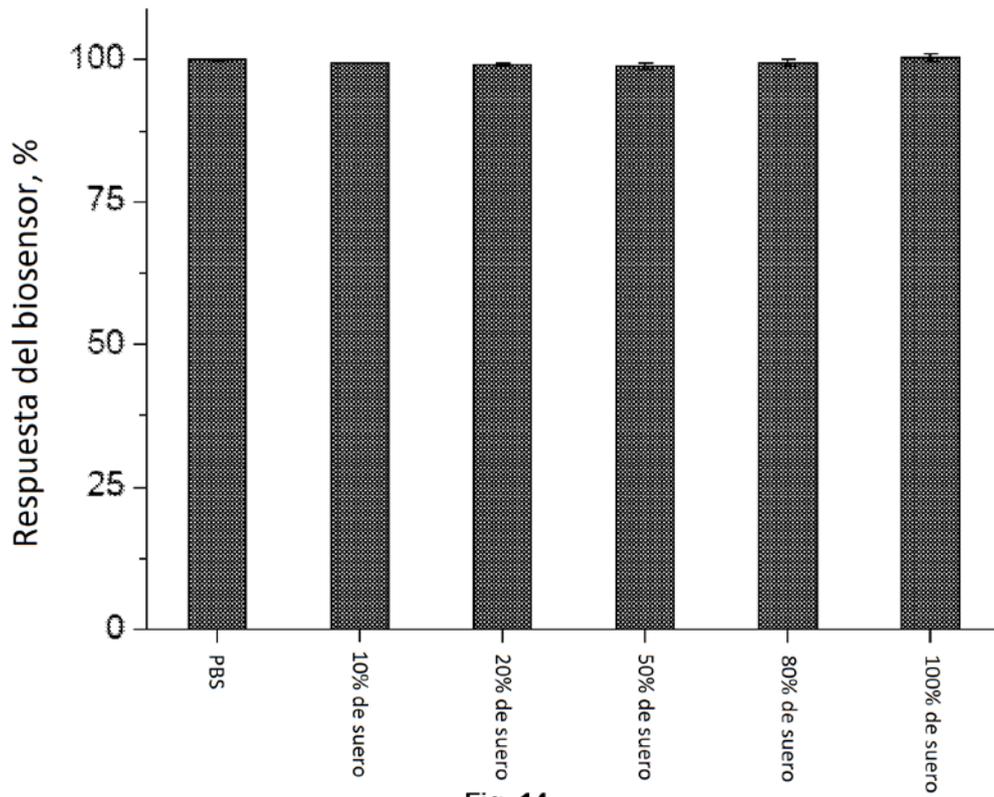


Fig. 14

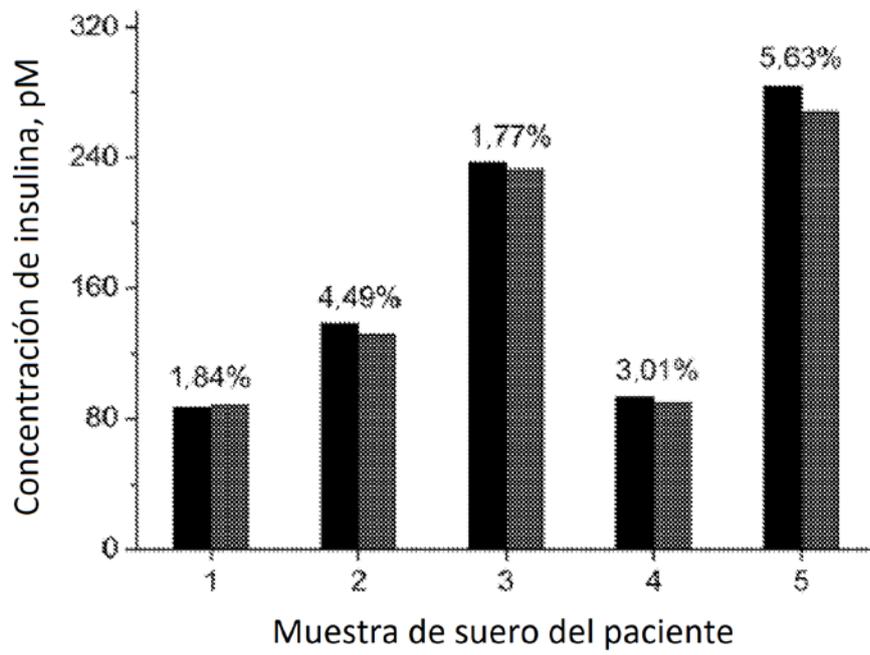


Fig. 15

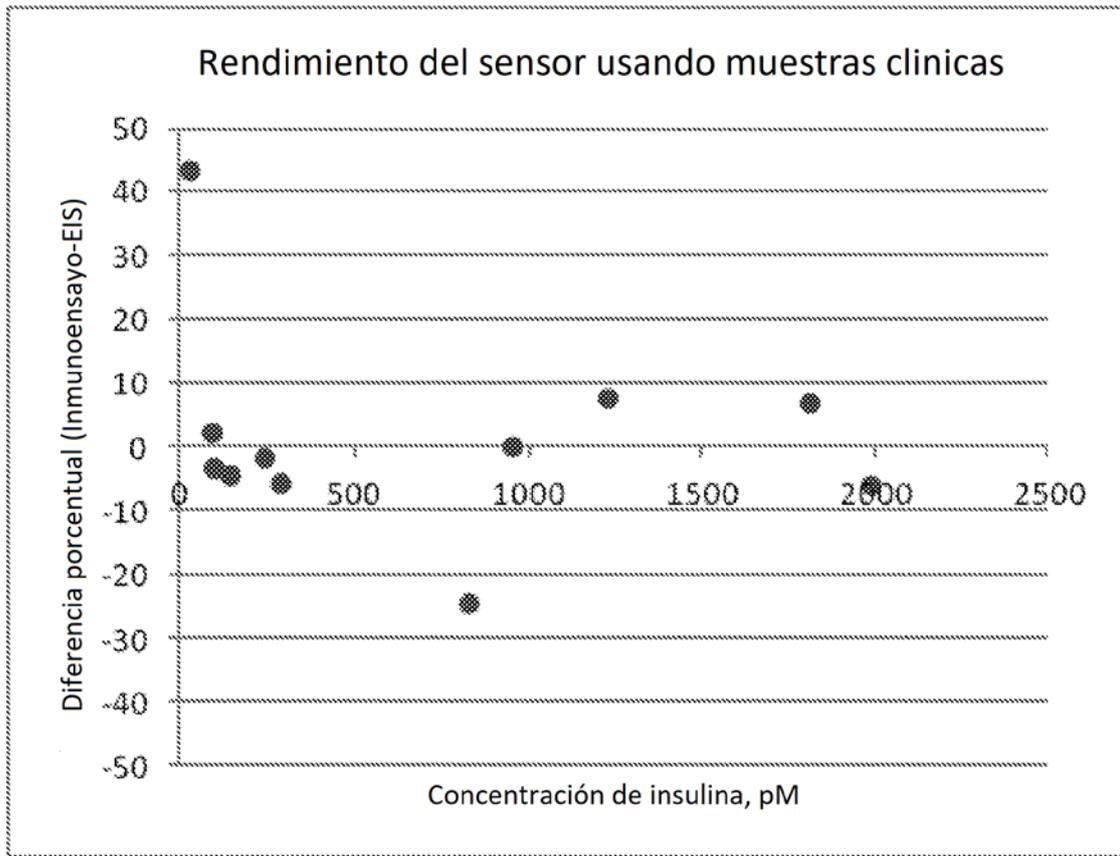


Fig. 16