

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 664**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)  
**G01N 27/30** (2006.01)  
**G01N 27/403** (2006.01)  
**G01N 27/416** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C40B 60/00** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2009 E 14176968 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2803988**

54 Título: **Microelectrodos nanoestructurados y dispositivos de biodetección que los incorporan**

30 Prioridad:

**02.09.2008 US 93667 P**

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

**06.10.2017**

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:

**SOLEYMANI, LEYLA;  
FANG, ZHICHAO;  
KELLEY, SHANA;  
SARGENT, EDWARD y  
TAFT, BRADFORD**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 636 664 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

Microelectrodos nanoestructurados y dispositivos de biodetección que los incorporan

5 **Antecedentes de la invención**

El análisis genómico está revolucionando el diagnóstico temprano de enfermedades y mejorando drásticamente el cuidado del paciente (McGuire *et al.* Science 317:1687, Srinivas *et al.*, Lancet Oncol. 2:698). Las técnicas basadas en micromatrices (Drmanac *et al.*, Science 260:1649, Hacia *et al.*, Nat. Genet. 14:441) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, Science 230:1350), como herramientas, han ayudado a encabezar esta revolución, permitiendo el descubrimiento y el desarrollo inicial de ensayos para las pruebas en pacientes (Morris *et al.*, Curr. Opin. Oncol. 19:547). Sin embargo, extender el alcance de la revolución de la genómica al paciente en el punto de tratamiento requiere herramientas económicas para la obtención de perfiles de biomarcadores individuales evaluados en relación con un estado patológico planteado. Específicamente, herramientas que permitan el cuidado rutinario del paciente serán preferiblemente más sencillas, más transportables y menos costosas que los métodos basados en PCR, aunque deben mantener un alto grado de selectividad y sensibilidad.

El análisis de biomarcadores basándose en lectura electrónica se ha mencionado desde hace mucho tiempo como un enfoque prometedor que permitiría una nueva familia de dispositivos basados en chips con un coste y una sensibilidad apropiados para las pruebas médicas (Drummond *et al.*, Nat. Biotechnol. 21:1192, Katz *et al.*, Electroanalysis 15: 913). La sensibilidad de la lectura electrónica en principio es suficiente para permitir la detección directa de pequeños números de moléculas de analito con instrumentación sencilla. Sin embargo, a pesar de los grandes avances en esta área así como en campos relacionados que trabajan para lograr nuevos diagnósticos (Clack *et al.*, Nat. Biotechnol. 26:825, Geiss *et al.*, Nat. Biotechnol. 26:317, Hahm *et al.*, Nano Lett. 4:51, Munge *et al.*, Anal. Chem. 77:4662, Nicewamer-Pena *et al.*, Science 294:137, Park *et al.*, Science 295:150, Sinensky *et al.*, Nat. Nano. 2:653, Steemers *et al.*, Nat. Biotechnol. 18:91, Xiao *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 129:11896, Zhang *et al.*, Nat. Nano. 1:214, Zhang *et al.*, Anal. Chem. 76:4093, Yi *et al.*, Biosens. Bioelectron. 20:1320, Ke *et al.*, Science 319:180, Armani *et al.*, Science 317:783), los chips multiplexados actuales aún tienen que lograr la detección electrónica directa de biomarcadores en muestras celulares y clínicas. Los retos que han limitado la implementación de tales dispositivos residen principalmente en la dificultad de obtener límites de detección muy bajos en presencia de niveles de ruido de fondo altos presentes cuando se someten a ensayo muestras biológicas complejas, y el reto de generar sistemas multiplexados que sean altamente sensibles y específicos.

La miniaturización de los sistemas electroquímicos sigue siendo un foco principal de la química analítica y bioanalítica (Matysik, Miniaturization of Electroanalytical Systems (Springer-Verlag, 2002)), ya que el logro de una sensibilidad potenciada puede alcanzarse con sistemas que presentan dimensiones en la escala micro a nanométrica (Szamocki *et al.*, A. Anal. Chem. 2007, 79, 533-539). Se ha llevado a cabo una gran cantidad de trabajo con electrodos con dimensiones en la escala micrométrica o submicrométrica. Estos sistemas ofrecen muchas ventajas con respecto a los macroelectrodos convencionales tales como carga más rápida de la doble capa, pérdida óhmica reducida, tasas de transporte de masa altas y densidad de corriente alta (Bond *et al.* Anal. Chim. Acta 1989m 216, 177-230, Heinze, Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 32, 1268-1288). De hecho, tales electrodos se han convertido en herramientas bien establecidas en una amplia gama de aplicaciones analíticas (Bard, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications (Wiley, Nueva York, 2001), Reimers, Chem. Rev. 2007 107, 590-600, Zosic, Handbook of electrochemistry (Elsevier, 2007)). Sin embargo, trabajar con electrodos a escala nanométrica es significativamente más difícil, ya que la fabricación es normalmente laboriosa, insuficientemente reproducible y las corrientes obtenidas a partir de tales estructuras normalmente son difíciles de medir con precisión.

Se ha investigado el uso de electrodos de nanoalambres para la detección de ácidos nucleicos y proteínas ultrasensible (Gasparac *et al.* J Am Chem Soc 126:12270). El uso de esta plataforma de electrodos permite la detección electroquímica de niveles picomolares de analitos, un nivel de sensibilidad que no es posible usando materiales a macroescala. Aunque se ha notificado que los nanoalambres pueden detectar niveles atomolares de analitos, esto corresponde realmente a niveles picomolares cuando se trabaja con los volúmenes usados normalmente para el análisis. También se ha demostrado que los electrodos modificados con nanopartículas pueden presentar varias ventajas con respecto a macroelectrodos convencionales tales como potenciación del transporte de masa, catálisis, alta área de superficie eficaz y control sobre el microentorno del electrodo (Katz *et al.* Electroanalysis 2004, 16, 19-44, Welch *et al.* Anal. Bioanal. Chem. 2006, 384, 601-619). Sin embargo, la fabricación de matrices de electrodos de nanoalambres no es trivial.

Se han usado microelectrodos de diamante dopado con boro modificados mediante electrodeposición de nanopartículas de platino para la determinación oxidativa de As (III) a niveles por debajo de 1 ppb (Hrapovic *et al.* Anal. Chem. 2007, 79, 500-507). Sin embargo, este tipo de electrodo no puede incorporarse en un formato basado en matriz para experimentos multiplexados.

El análisis de paneles de biomarcadores de ácido nucleico o proteína ofrece información de diagnóstico y pronóstico valiosa para la toma de decisiones clínicas. Los métodos existentes que ofrecen la especificidad y sensibilidad para obtener perfiles de muestras clínicas son normalmente costosos, lentos y en serie. Por tanto existe una necesidad

de un dispositivo ultrasensible para detectar biomarcadores de un modo multiplexado.

R. Gasparac, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 12270-12271 y S1-S5, dan a conocer un enfoque a nanoescala para la biodetección de ADN que usa conjuntos de nanoelectrodos de oro funcionalizados con oligonucleótidos bi o tridimensionales, en los que se generó una plataforma de nanoelectrodos para la detección de ADN que presentaba nanocables de oro moldeados por una membrana de policarbonato.

S. Hrapovic, *et al.*, Anal. Chem. 2007, 79, 500-507, dan a conocer macro y microelectrodos de diamante dopado con boro modificados por electrodeposición de nanopartículas de platino y usados para la determinación oxidativa de arsenito, As (III), y un sistema electroquímico para procesar muestras de agua de grifo y de río.

### Sumario de la invención

Según un aspecto, un dispositivo de biodetección comprende un sustrato, al menos un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato, una capa aislante que cubre el cable, teniendo la capa aislante una abertura que define un espacio en el que se expone una parte del cable, y un microelectrodo nanoestructurado depositado dentro de la abertura, en el que el microelectrodo está adaptado por medio de un sistema de indicador electrocatalítico para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular, en el que el microelectrodo nanoestructurado puede presentar una sonda biomolecular en la superficie del mismo, y el microelectrodo nanoestructurado está en contacto eléctrico con la parte expuesta del cable.

Los microelectrodos nanoestructurados (NME) son electrodos, que están nanotexturizados y por tanto tienen un área de superficie aumentada. Los NME preferidos están compuestos por un metal noble, (por ejemplo oro, platino, paladio, plata, osmio, indio, rodio, rutenio); aleaciones de metales nobles (por ejemplo oro-paladio, plata-platino, etc.); polímeros conductores (por ejemplo polipirrol (PPY)); metales no nobles (por ejemplo cobre, níquel, aluminio, estaño, titanio, indio, tungsteno, platino); óxidos de metal (por ejemplo óxido de zinc, óxido de estaño, óxido de níquel, óxido de indio y estaño, óxido de titanio, óxido de titanio dopado con nitrógeno (TiOxNy); siliciuros de metal (siliciuro de níquel, siliciuro de platino); nitruros de metal (nitruro de titanio (TiN), nitruro de tungsteno (WN) o nitruro de tantalio (TaN)), carbono (nanotubos, fibras, grafeno y amorfo) o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Los NME de los materiales descritos anteriormente son altamente conductores y forman enlaces fuertes con sondas (por ejemplo ácidos nucleicos y péptidos). Los NME preferidos tienen una altura en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 micrómetros (µm), por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 micrómetros (por ejemplo 10 micrómetros); un diámetro en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micrómetros; y tienen morfología a escala nanométrica (por ejemplo están nanoestructurados en una escala de longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 nanómetros y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nanómetros). Los NME pueden ser de cualquiera de una variedad de formas, incluyendo semiesférica, irregular (por ejemplo puntiaguda), cíclica (similar a alambre) o fractal (por ejemplo dendrítica). La superficie de un NME puede estar recubierta además con un material, que mantiene la alta conductividad del electrodo, pero que facilita la unión con una sonda. Por ejemplo, los NME que contienen nitrógeno (por ejemplo TiN, WN o TaN) pueden unirse con un grupo funcional amina de la sonda. De manera similar, la química de silicio/sílice como parte del NME puede unirse con un grupo silano o siloxano en la sonda.

En una realización, la sonda es un ácido nucleico (por ejemplo un ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o análogo de los mismos, incluyendo, por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (PNA), que contiene una estructura principal compuesta por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas mediante péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados u oligómeros de fosfordiamidato-morfolino. En condiciones apropiadas, la sonda puede hibridarse con un ácido nucleico complementario para proporcionar una indicación de la presencia del ácido nucleico en la muestra. En otra realización, la sonda es un péptido o una proteína (por ejemplo anticuerpo) que puede unirse a o interactuar con otra manera con una diana de biomarcador (por ejemplo receptor o ligando) para proporcionar una indicación de la presencia del ligando o receptor en la muestra. La sonda puede incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un NME. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones bicatenarias y/o monocatenarias, ligadores de poliT, dúplex bicatenarios como ligadores rígidos y espaciadores de PEG.

Este aspecto también puede proporcionar un método para llevar a cabo un procedimiento de biodetección usando un microelectrodo nanoestructurado, comprendiendo el método proporcionar dicho dispositivo de biodetección, polarizar el microelectrodo con respecto a un electrodo de referencia; medir un flujo de carga de referencia o corriente de referencia entre el microelectrodo y el electrodo de referencia; exponer el microelectrodo a un estímulo biomolecular (por ejemplo hibridación entre una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico complementario o unión entre una sonda de péptido y una pareja de unión presente en una muestra biológica); medir, por medio del sistema de indicador electrocatalítico, un flujo de carga o corriente generado en el microelectrodo en respuesta al estímulo biomolecular; y determinar la cantidad de estímulo biomolecular presente comparando el flujo de carga medido o de corriente medido frente al flujo de carga de referencia o de corriente de referencia.

El dispositivo puede presentar una pluralidad de NME en matriz sobre un sustrato. Los sustratos preferidos están compuestos por un material semiconductor, tal como silicio, sílice, cuarzo, germanio, arsenuro de galio, carburo de silicio y compuestos de indio (por ejemplo arsenuro de indio, antimonio de indio y fosfuro de indio), sulfuro de selenio, material cerámico, vidrio, plástico, policarbonato u otro polímero o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los sustratos pueden incluir opcionalmente una capa de pasivación, que está compuesta por un material que ofrece alta resistencia y mantiene una pequeña área de superficie activa. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen: dióxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de silicio dopado con nitrógeno (SiOxNy) o paralieno. En determinadas realizaciones, la pluralidad de NME en matriz sobre el sustrato incluyen sondas junto con espaciadores de monocapa, que minimizan la densidad de sondas, maximizando de ese modo la eficacia de complejación. Los espaciadores de monocapa preferidos tienen una afinidad por metal y pueden estar compuestos, por ejemplo, por un alcohol tiólico, tal como mercaptohexanol, alcanotioles, cisteína, cistamina, tiolaminas, tioles aromáticos (por ejemplo bencenotiol, ditio), ácidos fosfónicos o ácidos fosfínicos.

El estímulo biomolecular puede ser, por ejemplo, hibridación de ácido nucleico o unión de proteína a proteína.

En otro aspecto, un método para fabricar un dispositivo de biodetección comprende proporcionar un sustrato y un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato, estando el cable recubierto por una capa aislante; grabar con ácido una abertura en la capa aislante para exponer una parte del cable; y electrodepositar un material conductor sobre la parte expuesta del cable para formar un microelectrodo nanoestructurado.

El uso de electrodeposición para hacer crecer microelectrodos nanoestructurados a partir de simientes de NME permite que se controlen con precisión el tamaño y las morfologías de estas estructuras, y la fabricación versátil de electrodos compuestos por una o una variedad de sustancias. Pueden prepararse NME sobre un dispositivo de biodetección, tal como un formato basado en chip, de manera que puede producirse una serie de NME sobre un único chip para permitir experimentos multiplexados. Este sistema de NME puede ser particularmente útil y versátil, permitiendo el ajuste de varios parámetros, incluyendo: el control a escala micrométrica del tamaño y la forma del NME, el control a escala nanométrica de la nanotexturización del NME y la selección del material del NME.

Los NME son versátiles, robustos y es fácil trabajar con ellos. Además, pueden fabricarse usando procedimientos de fabricación en fundición de CMOS de silicio existentes para la fabricación de metal de cubierta, o extrapolaciones sencillas de los mismos, tales como deposición sin corriente eléctrica o electrodeposición sobre capas de metal de cubierta a partir de fundición de CMOS, lo que permite que la fabricación de NME se integre fácilmente en las instalaciones de fabricación existentes. Además, los NME pueden unirse de manera consistente a moléculas de sonda. Además, los NME promueven una fácil accesibilidad de moléculas diana de manera que, cuando una molécula diana que es complementaria a la molécula de sonda unida a NME entra en la proximidad con esa sonda, se produce la hibridación o la unión de proteína a proteína con alta probabilidad. Los NME son compatibles además con la realización de electroquímica electrocatalítica empleada en la lectura del acontecimiento de hibridación.

Otras características y ventajas de las invenciones dadas a conocer en el presente documento resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

la figura 1(A) es un esquema de un dispositivo de biodetección de NME; la figura 1(B) es una vista en sección transversal esquemática de una abertura para formar un NME; y la figura 1(C) es una vista esquemática de la formación de un NME en una abertura;

la figura 2 es un esquema de un dispositivo de biodetección de NME;

la figura 3 es un esquema de un NME con sondas, que muestra además la presencia de espaciadores en la monocapa de sonda y entre el electrodo y la sonda;

la figura 4 son imágenes de SEM de NME con grados crecientes de nanoestructuración;

la figura 5 ilustra las etapas implicadas en la detección de secuencias específicas usando un NME;

la figura 6 es una vista en sección transversal de un circuito integrado que tiene un NME;

la figura 7 es un diagrama de circuito de un circuito que puede usarse con un NME;

la figura 8 es una ilustración de un dispositivo de biodetección que tiene una matriz de NME;

la figura 9 es una ilustración de un dispositivo de biodetección que tiene diferentes NME;

la figura 10 es una ilustración esquemática de un cartucho de biodetección; y

la figura 11 es una ilustración esquemática de una estación de trabajo de biodetección.

### Descripción detallada de la invención

- 5 La presente divulgación describe microelectrodos nanoestructurados (NME), que pueden usarse en un dispositivo de biodetección, tal como un chip de biodetección.

#### NME

- 10 La figura 1A muestra un diagrama esquemático de un dispositivo a modo de ejemplo que incorpora NME. En el ejemplo mostrado, el dispositivo es un chip que tiene una matriz de ocho cables. En este ejemplo, el NME está formado por cables de oro que se estrechan hasta una anchura de 5 micrómetros. El cable se proporciona sobre un sustrato de Si y SiCte, aunque pueden usarse otros materiales de sustrato adecuados. Sobre el cable, se deposita una capa aislante, tal como SiO<sub>2</sub>, para aislar eléctricamente y pasivar el cable. Se crea una abertura, en este caso un orificio de 500 nm, en la capa aislante para exponer una parte del cable.

- 15 La figura 1B es una vista lateral de la parte del chip en la que se ubica la abertura, mostrando las capas del dispositivo. Las técnicas de fotolitografía conocidas más comúnmente pueden ser adecuadas para crear una abertura, tal como aberturas de 100 nm a 1 µm de diámetro. Esto puede lograrse normalmente en instalaciones de fabricación existentes con alta robustez y reproducibilidad. Dado que sólo esta superficie expuesta es activa electroquímicamente, puede usarse electrodeposición (Menke *et al.* Nature Mater. 2006, 5, 914-919) para hacer crecer un NME dentro de este espacio.

- 20 La figura 1C es un esquema en sección transversal de un ejemplo de deposición de NME, usando Pd para el NME. Este procedimiento se describirá en mayor detalle a continuación.

- 25 Se hace referencia ahora a la figura 2, que también ilustra la formación de un NME sobre un chip. Como en la figura 1A, se proporcionan electrodos pequeños *in situ* sobre un chip, definiéndose la posición y el contacto eléctrico de los NME fotolitográficamente. Como en la figura 1, este chip es un chip pasivo multiplexado 8 veces. Sobre un sustrato de silicio, se crea un patrón de una capa de oro de ~350 nm de grosor, usando técnicas de fotolitografía convencionales, para conectar ocho cables de Au de 5 µm de ancho a zonas de metal grandes para la conexión a instrumentación fuera del chip. Se deposita una capa de SiO<sub>2</sub> aislante sin perforar y se crea un patrón para crear aberturas de ~500 nm (por ejemplo, mediante grabado con ácido) en el extremo de cada uno de los cables de Au, para exponer una sección del cable. Entonces se galvaniza un NME de metal en esta abertura usando electrodeposición.

- 30 El NME puede comprender diferentes materiales conductores. Algunos ejemplos de NME se han formado tal como sigue, aunque son posibles variaciones y se describirán en mayor detalle a continuación: Se depositaron NME de Pd fractales ramificados en una disolución acuosa que contenía 5 mM de H<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> y 0,5 M de HClO<sub>4</sub> usando amperimetría de potencial de CC a -250 mV durante 15 s. Se depositaron NME de Pd semiesféricos con rugosidad a escala nanométrica en una disolución acuosa que contenía 5 mM de H<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> y 0,5 M de HCl usando amperimetría de potencial de CC a -100 mV durante 300 s. Se fabricaron NME de Pd semiesféricos lisos en la misma disolución a 0 mV durante 300 s. Se fabricaron NME de Au en un baño de oro que contenía una disolución 0,01 M de HAuCl<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M a -100mV durante 40 segundos. Se fabricaron NME de Pt en un baño de platino que contenía una disolución 5 mM de H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M a -100 mV durante 500 s. Pueden controlarse el tamaño y la morfología de NME variando la concentración de sal de metal, el tipo y la concentración del electrolito de soporte y el potencial y la duración de la electrodeposición.

- 35 La figura 3 es un esquema de un NME con sondas con espaciadores en la monocapa de sonda y entre el electrodo y la sonda. Puede ponerse en comunicación una disolución química que contiene un catión metálico con la superficie del NME y un electrodo de referencia. El electrodo de referencia puede ser un NME o un electrodo convencional sobre el mismo cable. Puede proporcionarse una polarización eléctrica entre el NME y el electrodo de referencia. Entonces puede eliminarse la disolución química y lavarse los electrodos. Entonces puede ponerse en comunicación una disolución que contiene la molécula de sonda con la superficie del NME. Puede modificarse o funcionalizarse la molécula de sonda de manera que se une a la superficie del NME. Por ejemplo, puede funcionalizarse la molécula de sonda con un grupo tiol, amina o carboxilato.

- 40 En la figura 4 se muestran NME con nanoestructuración creciente. Inesperadamente, la variación de las condiciones de electrodeposición permitieron el crecimiento de microelectrodos semiesféricos extremadamente lisos (izquierda); estructuras fractales a escala nanométrica altamente ramificadas (derecha); o semiesferas con rugosidad a escala nanométrica (centro). La estructura a la izquierda se produjo con HCl como electrolito de soporte con un potencial aplicado de 0 mV. Las estructuras del centro también se produjeron con HCl como electrolito de soporte pero con un potencial aplicado de -100 mV. La estructura a la derecha se realizó con HClO como electrolito de soporte y un potencial aplicado de -250 mV. La barra de escala en la figura corresponde a 5 µm a menos que se indique lo contrario.

65

- La figura 5 ilustra etapas implicadas en la detección de secuencias específicas (Lapierre *et al.*, Anal. Chem. 75:6327, Ratilainen *et al.*, Biochemistry 39:7781, Tomlins *et al.*, Science 310:644). En este ejemplo, en primer lugar se modifican NME de Pd con secuencias de sonda derivatizadas con tiol y entonces se hibridan las secuencias diana.
- 5 Entonces se transduce la presencia de la diana usando un sistema de indicador electrocatalítico. La electrocatálisis proporciona amplificación electrónica, o aumento, facilitando una lectura de sensibilidad alta: pueden resultar cientos de electrones de cada acontecimiento de complejación biomolecular. El enfoque usado en el presente documento se basa en el aceptor de electrones primario  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , que se atrae electrostáticamente hacia las superficies del electrodo a niveles que se correlacionan con la cantidad de ácido nucleico unido. La inclusión de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  durante
- 10 la lectura electroquímica sirve para regenerar el sustrato de Ru (III), ya que la especie Fe (III) es incluso más fácil de reducir, pero se repele electrostáticamente desde el electrodo y por tanto sólo experimenta reducción química mediante Ru (II). Este método también es libre de marcador y no requiere que se procese la muestra de ninguna manera.
- 15 El dispositivo de biodetección puede proporcionarse en forma de un chip, tal como un chip de circuito integrado (IC). En general, un IC que incorpora el NME puede tener un sustrato con un cable eléctricamente conductor que está recubierto por una capa aislante. La capa aislante tiene una abertura que expone una parte del cable, y el NME se proporciona en la parte expuesta del cable. El NME es sensible a un estímulo biomolecular. En particular, el NME puede funcionalizarse con moléculas de sonda que experimentan una reacción de hibridación con una biomolécula
- 20 diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico), dando como resultado una carga generada en el NME. El IC también tiene un almacenamiento de carga (por ejemplo, un condensador o una batería) en comunicación eléctrica con el cable para almacenar esta carga generada. En un uso típico, el NME puede estar expuesto a una muestra durante una duración de tiempo o un periodo de integración conocidos, y la carga almacenada a lo largo de ese tiempo sería entonces indicativa de la presencia y/o cantidad de la biomolécula diana.
- 25 La carga almacenada puede comunicarse con un dispositivo de cálculo para su análisis, o puede presentarse (por ejemplo, a través de un componente de presentación digital) para la lectura directa de la carga almacenada tras el periodo de integración.
- 30 Un IC de este tipo puede fabricarse usando equipo de fabricación de IC común, permitiendo que se fabrique este dispositivo fácilmente y que sea menos costoso que otras formas de microelectrodos de biodetección. Los materiales usados pueden ser aquéllos que ya se usan comúnmente en la fabricación de IC. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de silicio, cuarzo, vidrio, cerámica, sílice, zafiro, arsenuro de galio u otros materiales usados actualmente para IC. Los sustratos o soportes pueden incorporar material conductor para que sirva como electrodo.
- 35 También pueden usarse soportes conductores con una superficie de oro. Los soportes comprenden habitualmente una superficie lisa (plana), o al menos una estructura en la que las sondas o p que van a estudiarse están aproximadamente en el mismo plano. El soporte puede ser un electrodo o puede estar unido a un electrodo.
- 40 El cable puede estar hecho de Au, Al, W, TiN, polisilicio u otros materiales para cable usados comúnmente. El IC puede incluir un transistor, tal como un transistor de efecto de campo (FET) incluyendo FET de canal de silicio de tipo n y FET de canal de silicio de tipo p, o un transistor bipolar que incluye transistores de unión bipolar n-p-n y transistores de unión bipolar p-n-p.
- 45 El IC puede proporcionarse con, sumergirse en o exponerse de otra manera a una disolución electrocatalítica en comunicación química y eléctrica con el NME. Esto puede ayudar a la generación de carga en el NME.
- Se hace referencia ahora a la figura 6. Esta figura muestra una sección transversal de un circuito integrado adecuado para detectar la presencia de biomoléculas en una muestra biológica. El sustrato (1) es un sustrato de dispositivo semiconductor convencional tal como silicio. Se muestran el canal de un transistor (2), un óxido (3) de compuerta y un electrodo (4) de compuerta de polisilicio para ilustrar el uso de electrónica de CMOS convencional para formar los transistores del circuito integrado. Se usa un metal (5) para poner en contacto el electrodo de compuerta. Un óxido (6) de pasivación separa los niveles de transistor de silicio por debajo de la superficie superior del chip anterior. Una serie de viales (7) de metal e interconexiones proporcionan caminos selectivos para la comunicación eléctrica entre la capa de transistor y el/los electrodo(s) superior(es). Una superficie superior
- 50 sustancialmente plana es una combinación heterogénea de electrodos (9) superiores y material (8) aislante superior. La figura ilustra un NME (10) proporcionado sobre el electrodo, por ejemplo usando los métodos descritos anteriormente. La figura ilustra biomoléculas (11) de sonda tales como ácidos nucleicos terminados en tiol que se presentan para una hibridación eficaz con moléculas diana complementarias. Puede emplearse una disolución (12) electrocatalítica para proporcionar una lectura catalítica de la hibridación con las biomoléculas (11). Los potenciales eléctricos se transportan, y las corrientes fluyen, de un modo continuo desde el NME (10) a través de los contactos
- 60 (9) (7) (5) (4) eléctricos hasta el circuito electrónico que se encuentra debajo.
- Se hace referencia ahora a la figura 7, que muestra un diagrama de circuito de un circuito de ejemplo que puede usarse con el NME dado a conocer. En este ejemplo, el circuito puede proporcionar las siguientes funciones:
- 65 polarización del NME funcionalizado con sonda; integración de la corriente que fluye a través del NME al interior de un almacenamiento de carga que tiene una capacidad de almacenamiento de carga conocida; lectura del voltaje en

el almacenamiento de carga; y selección del almacenamiento de carga o NME de interés cuando se proporciona una matriz bidimensional de almacenamientos y electrodos en el contexto de un chip de matriz altamente multiplexado.

5 A continuación se describen los componentes del circuito de ejemplo. Se proporciona un voltaje de polarización a  
 5 Vpolarización; una elección típica de polarización puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 2,8 V. Se  
 proporciona un voltaje de polarización VpolarizaciónD en el drenaje del seguidor de la fuente; una elección típica  
 puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 - 2,8 V. Se proporciona un voltaje de polarización  
 10 VpolarizaciónR en el nodo de reinicio; una elección típica puede ser un valor ajustable entre aproximadamente -2 V y  
 2,8 V. Los voltajes de señal son Vsrc que normalmente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1,5 - 2,5 V.  
 El voltaje de columna Vcol puede estar en el intervalo de aproximadamente 1,5 V - 0,5 V. Las señales de control de  
 la sincronización incluyen la de la selección de fila (por ejemplo, el intervalo puede ser de aproximadamente 0-2,8 V)  
 y la de reinicio (por ejemplo, en intervalo puede ser de aproximadamente 0-4 V). Los transistores pueden ser el  
 transistor de reinicio Tr(reinicio), el transistor de acumulador intermedio de lectura TR(seguidor de la fuente) y el  
 transistor de selección de fila TR(selección de fila).

15 Las polarizaciones, los voltajes de señal y las señales de control de la sincronización anteriores son sólo ejemplos y  
 pueden usarse otros valores. Estas polarizaciones, voltajes y señales pueden seleccionarse o ajustarse para  
 adecuarse a determinadas aplicaciones o condiciones de fabricación, tal como se conoce comúnmente en la técnica.  
 20 En este ejemplo, el NME funcionalizado con sonda puede incluir un NME funcionalizado usando una sonda de ácido  
 nucleico tiolado, por ejemplo una sonda descrita anteriormente. Vsrc se aplica al electrodo funcionalizado con sonda  
 y se aplica VpolarizaciónR a un segundo electrodo, que puede ser un NME o cualquier otro electrodo común, en  
 comunicación eléctrica con la disolución electrocatalítica. Esto da como resultado una diferencia de voltaje entre el  
 electrodo funcionalizado con sonda y la disolución electrocatalítica. Por tanto, puede fluir una corriente como  
 consecuencia de esta diferencia de potencial. La cantidad de corriente que fluye puede depender normalmente de la  
 25 cantidad de hibridación en el NME funcionalizado con sonda, es decir la corriente puede ser indicativa de la cantidad  
 de diana así detectada por el NME.

A continuación se describe el funcionamiento del circuito de ejemplo. Con el fin de capturar la corriente que fluye,  
 30 Isentido, el transistor de reinicio se enciende fijando el "reinicio" del nodo lo suficientemente alto (por ejemplo, hasta  
 4 V, que puede ser a través de un circuito regulador o bomba de carga en el chip tal como se conoce comúnmente  
 en la técnica) de manera que el nodo 11 se cargará hasta un voltaje igual a Vpolarización (nodo 6) que normalmente  
 puede ajustarse al carril de suministro: por ejemplo, 2,8 V. Esta es la fase de reinicio. Una vez se completa la  
 operación de "reinicio", puede fijarse el nodo 5 a 0 V para apagar el transistor de reinicio Tr(reinicio) (1). Al hacer  
 35 esto, la inyección de carga y los efectos de alimentación directa capacitiva parásita provocarán que el nodo 11, que  
 ahora se ha convertido en un nodo oscilante, disminuya en aproximadamente 300 mV. Por tanto, tras la operación  
 de "reinicio" el valor del voltaje de "reinicio" real en el nodo 11 es de aproximadamente 2,5 V. En este momento, la  
 corriente Isentido que fluye depende del voltaje aplicado (es decir, Vsrc-VpolarizaciónR). Pudiendo fijarse  
 VpolarizaciónR arbitrariamente a cualquier nivel de voltaje desde -2 V hasta 2,8 V, puede ajustarse la diferencia de  
 40 potencial aplicado. La corriente Isentido descarga la capacitancia parásita en el nodo (11) de Vsrc y su nivel de  
 voltaje disminuye a una velocidad que depende del valor de la capacitancia parásita en Vsrc (nodo 11) así como la  
 Isentido que fluye durante el tiempo de integración. Tras un tiempo de integración específico, el voltaje integrado  
 resultante en el nodo 11 se leerá mediante los transistores TR(seguidor de la fuente) y TR(selección de fila), el  
 transistor de acumulador intermedio de seguidor de la fuente y el transistor de selección de fila, fijando el nodo SEL  
 (8) a un nivel alto (2,8 V).

45 El almacenamiento de carga que se descarga en el nodo 11 puede comprender capacitancia parásita de uno o más  
 de los transistores que están en comunicación eléctrica con el electrodo de la región de píxel en Vsrc (nodo 11). El  
 electrodo en Vsrc (nodo 11) puede estar en comunicación eléctrica con la compuerta de un transistor, tal como  
 Tr(seguidor de la fuente) 2, que proporciona una capacitancia parásita. En un realización de ejemplo, el  
 50 almacenamiento de carga puede proporcionarse, al menos en parte, mediante una capacitancia parásita entre la  
 compuerta y el drenaje del transistor de seguidor de la fuente, Tr(seguidor de la fuente) 2, y una capacitancia  
 parásita entre la fuente y el sustrato del transistor de reinicio, Tr(reinicio) 1. Estas son capacitancias parásitas entre  
 las estructuras en el sustrato semiconductor (por ejemplo, el poli, n pocillos y sustrato) sobre el que o en el que se  
 forma el circuito de píxel. En una realización de ejemplo, estas capacitancias parásitas pueden estar en el intervalo  
 55 de aproximadamente 1-2 femtofaradios o más generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 3  
 femtofaradios o cualquier intervalo incluido en los mismos. Los contactos con el NME funcionalizado con sonda  
 pueden formarse en diferentes capas por encima de regiones del sustrato semiconductor usado para formar los  
 transistores. En una realización alternativa, la polaridad de las polarizaciones puede invertirse y la capacitancia  
 parásita en Vsrc puede cargarse en lugar de descargarse durante el periodo de integración.

60 Se hace referencia ahora a la figura 8, que muestra una vista desde arriba de un IC de ejemplo que tiene una matriz  
 multiplexada de NME funcionalizados con sonda tratables individualmente. Por tratables individualmente, quiere  
 decirse que puede accederse a cada NME eléctricamente de manera individual, de manera que la corriente o carga  
 generadas por cada NME pueden medirse individualmente. En este ejemplo, los NME están dispuestos en matriz en  
 un modo de filas y columnas. Hay n filas y m columnas para un total de m x n NME independientes. Si sólo hubiera  
 65 una única fila o columna de NME, entonces podría no ser necesario tener un sistema de circuitos de tratamiento de

fila/columna. Sin embargo, cuando se desean grandes números totales de NME en un único dispositivo, puede ser más eficaz disponerlos en matriz en una rejilla bidimensional o similar, y por tanto puede ser útil el acceso eléctrico independiente a cada NME. Esto puede lograrse eficazmente usando el sistema de circuitos ilustrado en la figura 7. En este enfoque, la carga asociada con la corriente que fluye a través de cada NME se integra en un almacenamiento de carga, tal como un condensador; y puede leerse un voltaje proporcional a la carga almacenada para el NME en una fila particular ajustando el nodo SEL (8) a un nivel alto y monitorizando el voltaje en esa columna Vcol.

La figura ilustra que, para cada columna, puede existir una señal dependiente del tiempo (cuya dependencia del tiempo puede determinarse mediante el cronometrado del sistema de circuitos de tratamiento de fila) que, en algunas realizaciones, puede alimentarse, en casos con la ayuda de amplificación o almacenamiento electrónico, en un convertidor de analógico a digital. El convertidor de analógico a digital puede aceptar señales que tienen una oscilación del voltaje predeterminada (tal como 0-1 V, normalmente) y, para cada canal de entrada, puede realizar una operación de cuantificación en la que se estima una representación digital del nivel analógico en esa señal. La salida del convertidor A/D es una secuencia digital que combina paralelismo (por ejemplo, múltiples alambres en paralelo, cada uno correspondiente a una cifra significativa en la representación binaria de los valores) y sincronización en serie (por ejemplo, una representación sincronizada de elementos de datos secuenciales que corresponden, por ejemplo, a diferentes NME funcionalizados con sonda).

A continuación se hace referencia a la figura 9, que muestra tres NME adyacentes a lo largo de una única fila, en una configuración que puede proporcionarse sobre un dispositivo de biodetección o IC descrito anteriormente. Estos tres NME se leen usando tres columnas diferentes  $j$ ,  $j+1$  y  $j+2$ . Esta figura ilustra varias características con respecto a las diferencias entre NME.

Los NME  $E_{i,j}$  y  $E_{i,j+1}$  pueden funcionalizarse ambos con la misma clase de sondas (por ejemplo PNA funcionalizados con tiol), pero las secuencias pueden ser diferentes. Es decir, cada NME puede funcionalizarse con sondas similares que tienen diferentes biomoléculas diana. En este ejemplo, los electrodos  $E_{i,j}$  y  $E_{i,j+1}$  responden a diferentes secuencias presentes en la muestra en estudio. En suma, el uso de diferentes funcionalizaciones permite la detección de biomoléculas dentro de una sola clase, pero que tienen una secuencia, conformación o funcionalidad diferente.

Se muestra que los NME  $E_{i,j}$ ,  $E_{i,j+1}$  y  $E_{i,j+2}$  tienen morfologías y/o tamaños diferentes y grados diferentes de nanoestructuración. Tal como se comentó anteriormente, morfologías y/o tamaños diferentes pueden proporcionar tanto límites de detección diferentes como intervalos dinámicos diferentes, en la detección de moléculas diana. Incorporando NME que tienen morfologías y/o grados de nanoestructuración diferentes sobre un dispositivo, puede ser posible expandir el intervalo dinámico de concentraciones diana que pueden detectarse usando un único dispositivo. En suma, el uso de morfologías, tamaños y/o nanoestructuraciones de NME diferentes puede permitir la detección de un intervalo más amplio de concentraciones de una especie diana dada que el que se lograría si se proporcionasen sólo una morfología/nanoestructuración en un dispositivo de biodetección.

También se representa que los NME  $E_{i,j+1}$  y  $E_{i,j+2}$  se funcionalizan usando clases diferentes de moléculas de sonda. Por ejemplo,  $E_{i,j+1}$  puede funcionalizarse usando un ácido nucleico tal como PNA, y  $E_{i,j+2}$  puede funcionalizarse usando anticuerpos que se unen al electrodo. En suma, el uso de clases diferentes de moléculas de sonda puede permitir la detección de clases diferentes de biomoléculas diana, por ejemplo que oscilan entre ADN, ARN, microARN y proteínas, usando un único dispositivo de biodetección.

#### Cartucho de biodetección y estación de trabajo

El dispositivo de biodetección tal como se describió anteriormente puede incorporarse en un cartucho de biodetección. Un cartucho de este tipo puede contener cámaras para el procesamiento de muestra tal como alteración y purificación de ácidos nucleicos basada en resina o perla, así como una cámara para el dispositivo de biodetección. El cartucho puede ser autónomo, por ejemplo, todos los reactivos necesarios pueden estar contenidos en la tapa del cartucho. El cartucho puede ser reutilizable o puede ser desechable. Un cartucho desechable puede minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.

El cartucho puede usarse en una estación de trabajo de biodetección para coordinar y llevar a cabo el procedimiento de biodetección. Los componentes de la estación de trabajo pueden incluir soportes de muestra, puntas de instrumento tales como pipetas para la manipulación de la muestra, un módulo de identificación de muestra, un mecanismo de selección para seleccionar una prueba que va a llevarse a cabo, una presentación electrónica para indicar los resultados de una prueba de biodetección y un procesador para gestionar estos componentes y llevar a cabo las pruebas seleccionadas. La estación de trabajo puede albergar varios cartuchos diferentes al mismo tiempo (por ejemplo, diez o más). La estación de trabajo puede permitir acceso aleatorio a los cartuchos, es decir, pueden ejecutarse pruebas independientes en cualquier momento en cualquier cartucho en la estación de trabajo. La estación de trabajo puede tener puntas de instrumento desechables, que será la única parte de la estación de trabajo que entra en contacto directo con la muestra y los reactivos. Las puntas desechables, junto con los cartuchos desechables, puede minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras sometidas a prueba en la estación

de trabajo.

En general, un cartucho de biodetección puede tener una primera cámara para contener la muestra que va a someterse a prueba y una segunda cámara que contiene el dispositivo de biodetección tal como se describió anteriormente. Puede haber cámaras adicionales para realizar otras acciones en la muestra, tales como purificación y/o subdivisión (por ejemplo, a través de medios químicos, mecánicos o vibracionales). Parte del procesamiento y alteración de la muestra puede llevarse a cabo en la propia primera cámara. La muestra puede introducirse desde la primera hasta la segunda cámara para la detección mediante el dispositivo de biodetección en la segunda cámara. Puede haber un intervalo de tiempo prefijado desde la activación del dispositivo o inicio de la prueba hasta la introducción de la muestra en la segunda cámara. Este intervalo de tiempo puede permitir polarizar adecuadamente o preparar de otra manera el dispositivo de biodetección para la prueba. El flujo de corriente o carga generado en el dispositivo de biodetección puede medirse tras un periodo de integración, tal como se describió anteriormente.

A continuación se hace referencia a la figura 10, que muestra un ejemplo de un cartucho de biodetección y las etapas de uso de un cartucho de este tipo. En este ejemplo, el cartucho tiene tres cámaras, una cámara de muestra que contiene la muestra, una cámara de purificación para purificar la muestra y un biodetector para realizar la biodetección. Tal como se muestra en este ejemplo, la tapa del cartucho está dotada de cápsulas que contienen reactivos para cada cámara y a través de las cuales puede insertarse una punta de instrumento. Esto permite que el cartucho sea autónomo, conteniendo ya los reactivos adecuados para llevar a cabo la operación de biodetección y adaptado a las sondas y/o biomoléculas diana particulares del dispositivo de biodetección que está usándose. En este ejemplo, la cámara de muestra tiene una cápsula, para acceder a la muestra. La cámara de purificación tiene tres cápsulas, dos contienen un reactivo de lavado y una contiene un tampón de elución. La cámara de biodetección tiene tres cápsulas, cada una contiene una mezcla electroquímica que contiene analitos para el dispositivo de biodetección. La punta de instrumento puede insertarse secuencialmente en cada cápsula, con el fin de llevar a cabo la operación de biodetección. Por ejemplo, la cápsula en la cámara de muestra puede contener un tampón de lisis que contiene desnaturalizantes químicos (por ejemplo, urea o formamida); la cápsulas en la cámara de purificación pueden tener dos cápsulas que contienen un tampón de lavado y el tampón de elución puede ser un tampón convencional, tal como uno que contiene niveles bajos de sal de sodio, cloruro y tris; las cápsulas en la cámara de biodetección pueden contener grupos indicadores redox tales como hexamina de rutenio, ferricianuro y un tampón que contiene sodio, fosfato, cloruro y magnesio.

En su uso, en primer lugar se extrae la muestra de la cámara de muestra a través de su única cápsula. Entonces se introduce la muestra en la cámara de purificación, en la que se lava dos veces introduciendo la punta de instrumento a través de las dos cápsulas de lavado y se introduce el tampón de elución. A través de este procedimiento, puede prepararse la muestra para la biodetección mediante el dispositivo de biodetección. Por ejemplo, en el caso de una muestra de ácido nucleico, el procedimiento en la cámara de purificación puede aislar el ARN o ADN en la muestra. Entonces se introduce la muestra purificada en la cámara de biodetección, a través de cada cápsula electroquímica. El dispositivo de biodetección en la cámara de biodetección puede detectar entonces cualquier biomolécula diana presente en la muestra, y puede medirse la corriente o carga generada. Cuando se usa el cartucho en una estación de trabajo, el procesador de la estación de trabajo puede leer esta corriente o carga generada y determinar la presencia de la biomolécula diana basándose en esta lectura.

A continuación se hace referencia a la figura 11, que muestra un ejemplo de una estación de trabajo de biodetección. Esta estación de trabajo incluye un lector de código de barras, que permite la identificación de muestras usando códigos de barras únicos previstos en cada cartucho. La estación de trabajo tiene un mecanismo de selección, en este ejemplo una pantalla táctil que permite la selección de una prueba particular que va a llevarse a cabo. También hay un recipiente para residuos para desechar cualquier residuo generado por el procedimiento de biodetección. El procesador de la estación de trabajo puede estar conectado a un dispositivo de cálculo externo, tal como otra estación de trabajo, para un análisis adicional. Esta conexión puede ser a través de una red inalámbrica. La estación de trabajo puede ser relativamente pequeña (por ejemplo, una superficie ocupada de 1,5 x 1 ft), permitiendo la conveniencia y la facilidad de uso.

#### Métodos de uso

A continuación se describen métodos para usar NME y dispositivos que comprenden los mismos. Puede proporcionarse un dispositivo con el NME ya funcionalizado con una molécula de sonda, o puede unirse la molécula de sonda al NME cuando se prepara el dispositivo para su uso. Entonces se polariza el dispositivo para su uso, por ejemplo añadiendo un indicador electrocatalítico y esperando un intervalo de tiempo determinado. Además del NME, puede haber un electrodo de referencia, que puede o no ser un NME, en contacto con el indicador electrocatalítico pero no en contacto con la muestra. La polarización de flujo de corriente o voltaje generada a lo largo de este intervalo de tiempo entre el NME y el electrodo de referencia puede medirse y registrarse como el punto de referencia. Entonces se expone el NME a una muestra de interés, y puede medirse el flujo de corriente o carga generado a lo largo de un intervalo de tiempo determinado (también denominado periodo de integración). Comparando la diferencia del flujo de corriente o carga entre el intervalo de tiempo de exposición y el intervalo de tiempo de polarización, puede determinarse la concentración, unión y/o cantidad de biomolécula diana en la muestra.

Los dispositivos que comprenden NME, tal como se describen en el presente documento, pueden usarse junto con sondas apropiadas para detectar la presencia o ausencia de biomarcadores particulares en una muestra. Una "muestra" o "muestra biológica" como en el presente documento se refiere a cualquier material natural (por ejemplo vegetal, animal, de algas, bacteriano o viral) o sintético que contiene ADN, ARN y/o proteínas, incluyendo, por ejemplo, muestras clínicas, tales como tejidos, cultivos celulares o fluidos aislados de un individuo (incluyendo sin limitación sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, linfa, lágrimas, orina, saliva, mucosa, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo y secciones de tejido), entorno (por ejemplo, muestras de agua, alimento o aire). Las muestras biológicas pueden procesarse adicionalmente a través de una variedad de medios, incluyendo lisis (eléctrica, mecánica y química), electroforesis, digestión enzimática. Lo más a menudo, la muestra se ha extraído de un organismo, pero el término "muestra biológica" también puede referirse a células o tejido analizados *in vivo*, es decir, sin extracción. Normalmente, una "muestra biológica" contendrá células, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina. "Una muestra biológica" se refiere además a un medio, tal como un caldo de nutrientes o gel en el que se ha propagado un organismo, que contiene componentes celulares, tales como proteínas o moléculas de ácido nucleico.

Las sondas para su uso con los presentes NME descritos pueden estar compuestas por ácidos nucleicos. Una "sonda de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo un ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o un análogo de los mismos, incluyendo, por ejemplo, un ácido péptido-nucleico (PNA), que contiene una estructura principal compuesta por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas mediante péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa unidas mediante uniones de fosfodiesterasa, que pueden unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, habitualmente a través de la formación de puentes de hidrógeno. Tal como se usa en el presente documento, una sonda de ácido nucleico puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C, o T) o estar modificada en bases (7-desazaguanosina, inosina, etc.) o en restos de azúcar. Además, las bases en una sonda pueden unirse mediante una unión distinta de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Un experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Evaluando para determinar la presencia o ausencia de la sonda, puede detectarse la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. Se describen métodos para detectar ácidos nucleicos diana usando sondas de ácido nucleico, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.361.470 titulada "Electrocatalytic Nucleic Acid Hybridization Detection" y el documento US 2005/0084881 del mismo nombre.

"Hibridación" se refiere a cualquier procedimiento mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de apareamiento de bases. "Condiciones de hibridación" se refiere a condiciones convencionales a las que se usan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas ácido nucleico similares. Tales condiciones convencionales se dan a conocer, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 (véanse específicamente las páginas 9.31-9.62). Además, se dan a conocer fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr hibridación que permite grados variables de apareamiento erróneo de nucleótidos, por ejemplo, en Meinkoth *et al.*, 1984, Anal. Biochem. 138, 267-284. Los ejemplos no limitativos de condiciones de hibridación incluyen condiciones de hibridación de baja rigurosidad, condiciones de hibridación de rigurosidad media y condiciones de hibridación de alta rigurosidad.

En otra realización, la sonda es un péptido (compuesto, por ejemplo, por 4-40 aminoácidos) o proteínas (por ejemplo anticuerpo) que puede unirse a, o interactuar de otra manera con, una diana de biomarcador (por ejemplo receptor o ligando) para proporcionar una indicación de la presencia del ligando o receptor en la muestra. Se describen métodos para detectar analitos usando sondas de péptido o proteína, por ejemplo en la solicitud de patente internacional WO 2007/094805 (PCT/US2006/013771) titulada "Method for Electrocatalytic Protein Detection".

Las sondas pueden incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un NME. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones bicatenarias y/o monocatenarias, ligadores de poliT, dúplex bicatenarios como ligadores rígidos y espaciadores de PEG.

Tal como se describió anteriormente, la nanoestructura de superficie del NME puede estar controlada, y puede influir en la sensibilidad y/o eficacia de un dispositivo que tiene el NME. En el ejemplo 1, se investigó la influencia de la nanoestructura de superficie sobre la eficacia de detección para ácidos nucleicos. Se compararon dos tipos diferentes de NME, se comparó un NME nanoestructurado más finamente obtenido con un potencial de deposición bajo con uno texturizado de manera más gruesa obtenido con un potencial de deposición más alto.

Mientras que pudieron detectarse concentraciones de tan sólo 1 pM con el NME nanoestructurado más finamente obtenido con un potencial de deposición bajo, el límite de detección aumentó hasta 10 pM para el texturizado de manera más gruesa obtenido con un potencial de deposición más alto. Estos resultados demuestran que el aumento de la nanoestructuración contribuye a capacidades de biodetección más sensibles en una plataforma de electrodo. Este análisis reveló que los NME estructurados más finamente mostraron mayor capacidad de respuesta a

concentraciones sub-nM de secuencias diana.

La sensibilidad de 10 aM observada en este caso con los NME dados a conocer y el sistema de indicador electrocatalítico proporciona un límite de detección bajo para un sensor libre de marcador y PCR; el límite de detección corresponde a la detección de < 100 copias de la secuencia diana. Aunque se ha logrado anteriormente la medición de 60-1000 copias de la secuencia diana con detectores electroquímicos que emplean una lectura catalítica de múltiples etapas (Munge *et al.*, Anal. Chem. 77: 4662, Nicewamer-Pena *et al.*, Science 294:137, Park *et al.*, Science 295 :1503, Sinensky *et al.*, Nat. Nano. 2: 653, Steemers *et al.*, Nat. Biotechnol. 18:91, Xiao *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 129:11896, Zhang *et al.*, Nat. Nano. 1: 214, Zhang *et al.*, Anal. Chem. 76:4093), el dispositivo dado a conocer proporciona esta medición en una plataforma basada en chip con lectura en una sola etapa.

El ejemplo 2 describe el uso de una plataforma de electrodos multiplexados, tal como se describe en el presente documento, para leer directamente un panel de biomarcadores de cáncer en muestras relevantes clínicamente usando señales electrónicas. El sistema combina electrodos nanotexturizados con lectura catalítica rápida para lograr un objetivo que viene de largo: el análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer usando una plataforma económica y práctica.

El ejemplo 3 describe el uso de un chip basado en NME para detectar microARN, una de las dianas de detección más difíciles. La lectura electrónica de perfiles de microARN ofrece un método rápido, aunque altamente preciso, para someter a ensayo directamente muestras de ARN para determinar secuencias específicas sin la necesidad de amplificación de diana.

Aunque los ejemplos proporcionados se refieren a la detección de biomarcadores cáncer, pueden ser posibles otras aplicaciones para el dispositivo de NME, que puede implicar detectar ADN, ARN y/o proteínas. Los ejemplos incluyen la obtención de perfiles de genes de cáncer de mama (por ejemplo, detectando marcadores de ARN); la obtención de perfiles de genes relacionados con leucemia (por ejemplo, detectando marcadores de ARN); la obtención de perfiles de mutaciones de citocromo P450 que afectan al metabolismo de fármacos (por ejemplo warfarina) (por ejemplo, detectando marcadores de ADN y ARN); la obtención de perfiles de mutaciones asociadas con enfermedades genéticas (por ejemplo fibrosis quística) (por ejemplo, detectando marcadores de ADN); la detección y tipaje de virus (por ejemplo VPH y VIH) (por ejemplo, detectando marcadores de ADN y ARN); la detección de proteínas relacionadas con cáncer usando un formato de inmunoensayo electroquímico (por ejemplo antígeno específico de próstata (PSA)) (por ejemplo, detectando marcadores proteicos); y la detección de microARN para identificar cáncer. Los dispositivos de biodetección que incorporan estos NME pueden adaptarse para detectar estas otras biomoléculas uniendo sondas adecuadas al NME y/o seleccionado una reacción electrocatalítica adecuada que va a detectarse, tal como se conoce comúnmente en la técnica.

Un experto en la técnica entenderá que son posibles variaciones sin apartarse de la presente divulgación. Todos los ejemplos y las realizaciones descritas se proporcionan sólo con fines de ilustración y no pretenden ser limitativas.

#### 40 **Ejemplo 1. Parámetros para fabricar NME**

En este ejemplo, se usó Pd como material de electrodo. Para investigar la dependencia del tiempo de la electrodeposición, se monitorizaron las estructuras de los NME de Pd que estaban electrodepositándose en función del tiempo. Se realizaron experimentos de electrodeposición dependiente del tiempo a -100 mV usando HCl 0,5 M como electrolito de soporte. Se formaron estructuras de Pd durante (a) 25, (b) 50, (c) 125, (d) 250 y (e) 500 s. Tras 50 s, se observaron estructuras con diámetros promedio de 1,3 µm y alturas de 0,5 µm, y tras 500 s los electrodos de Pd tenían normalmente 8 µm y 5 µm de diámetro y altura. Las estructuras más pequeñas producidas con tiempos de deposición más cortos presentaban normalmente depresiones en el centro de los microelectrodos, lo que puede indicar que la nucleación se produce preferentemente en el límite de la abertura.

Otro parámetro controlable que puede influir en la estructura final del NME es el potencial de deposición. Específicamente, el tamaño y la morfología de otro parámetro controlable que puede influir en la estructura final del NME es el potencial de deposición. Específicamente, el tamaño y la morfología de superficie de los NME pueden controlarse de este modo. Los fractales dendríticos son fenómenos generalmente observados en crecimiento no en equilibrio tal como el crecimiento de copos de nieve, la agregación de partículas de hollín y la solidificación de metales. Tales estructuras fractales también se obtienen mediante electrodeposición no en equilibrio de metales y se usan como sistemas modelo para el estudio de procesos de ramificación y de crecimiento fractal (Fleury, Nature 1997, 390, 145-148). Generalmente se cree que la morfología de cristales depende fuertemente de la "distancia" de sus condiciones de formación con respecto al equilibrio termodinámico: condiciones cercanas al equilibrio conducen a cristales poliédricos rodeados por caras cristalinas termodinámicamente estables, pero el aumento de esta "distancia" hace que el crecimiento de los frentes de cristales con superficies planas sea inestable formando dendritas (Fukami *et al.* J. Phys. Chem. C 2007, 111, 1150-1160). En el caso de electrodeposición de metales, tal "distancia" puede ajustarse de manera continua y reversible simplemente cambiando el potencial de deposición y un potencial más negativo puede ejercer una fuerza impulsora superior y por tanto aumentar la "distancia" con respecto al equilibrio para la electrocristalización. Por tanto, la electrodeposición puede controlarse espacial y cinéticamente para producir NME en matriz con morfologías bien definidas variadas.

Se formaron estructuras de Pd a (a) 0 mV, (b) -100 mV, (c) -250 mV y (d) -400 mV durante 250 s con el uso de HCl 0,5 M como electrolito de soporte. Se encontró que potenciales de deposición más negativos conducían normalmente a microestructuras más grandes, pero menos compactas. A un potencial de deposición de 0 mV, se obtuvo una estructura con forma de torta de 3,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,7  $\mu\text{m}$  de altura. Cuando se cambió el potencial aplicado a -100 mV, se obtuvo una microestructura más tosca que también era de mayor tamaño (diámetro promedio = 5  $\mu\text{m}$  y altura = 2,5  $\mu\text{m}$ ). La nanotexturización obtenida es un agregado irregular de nanopartículas muy pequeñas. Cuando se aplicó un potencial más negativo de -250 mV, se obtuvo una microestructura fractal dendrítica y se encontró que su diámetro y altura aumentaban adicionalmente 11 y 6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Si el potencial se aumentaba adicionalmente (por ejemplo hasta -400 mV), la estructura de microelectrodo se hizo más abierta y la estructura ya no es continua.

Se estudió el comportamiento electroquímico de los NME de Pd formados en función del potencial mediante voltametría cíclica (CV). Se monitorizó la respuesta electroquímica de los NME en una disolución que contenía  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  3 mM y fosfato de sodio 0,09 M, a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Tal como se esperaba, se observaron voltamogramas en estado estacionario para cada electrodo, compatibles con las dimensiones a escala micrométrica de los electrodos. Para los electrodos producidos usando potenciales de deposición de 0, -100 o -250 mV, las corrientes observadas se correlacionan bien con el tamaño del electrodo. Es decir, cuanto mayor es el diámetro del NME (es decir, formado a un potencial aplicado mayor), mayor es la corriente de respuesta observada. Sin embargo, para estructuras producidas a -400 mV, las corrientes observadas eran inferiores a las esperadas basándose en el tamaño del microelectrodo, lo que indica que la discontinuidad de la estructura del electrodo puede conducir a una mala conectividad eléctrica y a una pérdida de área de trabajo.

Por tanto, potenciales de deposición moderados parecen proporcionar la nanotexturización más pronunciada al mismo tiempo que mantienen la integridad del NME resultante, ya que se forman nanopartículas pequeñas sobre la superficie de los microelectrodos. Parece que proporcionar un potencial de impulsión demasiado grande para la reacción de deposición acelera la cinética hasta un punto en el que se forman nanopartículas de metal sin conectividad fuerte con el núcleo del NME.

La morfología del NME también puede controlarse por medio de los efectos del electrolito. Se formaron NME de Pd a -100 mV durante 250 s usando (a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M y (b)  $\text{HClO}_4$  0,5 M como electrolito de soporte. Se formaron estas estructuras en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, en las que se usó HCl como electrolito de soporte. Las estructuras formadas en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HClO}_4$  eran significativamente más grandes que las formadas en HCl, y de manera interesante, las tres presentaban diferentes tipos de nanoestructuración. NME producidos en  $\text{HClO}_4$  mostraban la nanoestructuración más fina, con características de tan sólo 10-20 nm presentes. En HCl, el electrodo era más compacto, y la nanoestructuración era del orden de 100 nm. Se obtuvo la nanoestructuración más gruesa en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , en la que las partículas que comprendían el electrodo eran mayores de 200 nm. Estas observaciones indican que la morfología del NME también puede controlarse variando del electrolito de soporte usado para la electrodeposición.

Normalmente, las estructuras dendríticas para el NME dependen de las condiciones durante la fabricación, incluyendo las concentraciones de la disolución de electrodeposición, la elección del metal que va a electrodeponerse y el potencial aplicado durante la electrodeposición. Estos parámetros pueden controlarse fácilmente. Por ejemplo, puede ser deseable controlar la concentración y pureza de los reactivos usados en la electrodeposición para que estén dentro del 5%. La elección del metal es sencilla de controlar siempre que la pureza de los reactivos sea alta, simplemente obteniendo el material correcto. El potencial durante la electrodeposición puede controlarse fácilmente para que esté dentro de unos pocos mV, lo que es suficiente para controlar el tamaño y la morfología del NME resultante.

## **Ejemplo 2. Obtención del perfil directo de biomarcadores de cáncer de próstata en tejido tumoral usando un circuito integrado de microelectrodo nanoestructurado multiplexado**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Fabricación de los chips. Se fabricaron los chips en el Canadian Photonics Fabrication Center. Se pasivaron obleas de silicio de 3" usando una capa gruesa de dióxido de silicio hecho crecer térmicamente. Se depositó una capa de oro de 350 nm sobre el chip usando evaporación de oro asistida por haz de electrones. Se creó un patrón en la película de oro usando fotolitografía convencional y un procedimiento de despegue. Se depositó una capa de 500 nm de dióxido de silicio aislante usando deposición química en fase de vapor. Se imprimieron aberturas de 500 nm sobre los electrodos usando fotolitografía convencional, y se expusieron zonas de conexión de 2 mm x 2 mm usando fotolitografía convencional.

Fabricación de microelectrodos nanoestructurados. Se limpiaron los chips enjuagándolos en acetona, IP A y agua DI durante 30 s y se secaron con un flujo de nitrógeno. Se realizó toda la electrodeposición a temperatura ambiente con un potenciostato Epsilon de Bioanalytical Systems con un sistema de tres electrodos que presentaba un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Se usaron aberturas de 500 nm sobre los

electrodos fabricados como electrodo de trabajo y se pusieron en contacto usando las zonas de conexión expuestas. Se fabricaron NME de platino en un baño de platino que contenía una disolución 5 mM de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  y  $\text{HClO}_4$  0,5 M a -250 mV durante 10 s usando amperimetría de potencial de CC.

5 Preparación y purificación de oligonucleótidos. Se purificaron rigurosamente todos los oligonucleótidos sintéticos mediante HPLC de fase inversa. Se usaron las siguientes secuencias diana y de sonda en los experimentos. Sec. P1., sonda de fusión de tipo III (PNA):  $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-ATA AGG CTT CCT GCC GCG CT-CONH}_2$  (SEQ ID NO. 1),  
 10 sec. P2., sonda de fusión de tipo I (PNA):  $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-CTG GAA TAA CCT GCC GCG CT-CONH}_2$  (SEQ ID NO. 2),  
 sec. P3., sonda de fusión de tipo VI (PNA):  $\text{NH}_2\text{-Cys-Gly-ATA AGG CTT CTG AGT TCA AA-CONH}_2$  (SEQ ID NO.  
 3), sec. T1 (diana de ADN de fusión de TMPRSS2:ERG de tipo III):  $5'\text{AGC GCC GCA GGA AGC CTT AT}3'$  (SEQ ID  
 NO. 4), sec. T2 (diana de ADN de TMPRSS2 WT):  $5'\text{AGC GCC GCC GGT CAT 10 ATT GA}3'$  (SEQ ID NO. 5), sec.  
 T3 (diana de ADN de ERG WT):  $5'\text{TCA TAT CAA GGA AGC CTT AT}3'$  (SEQ ID NO. 6), sec. T4 (diana de ADN no  
 complementario):  $5'\text{TTT TTT TTT TTT TTT TT}3'$  (SEQ ID NO. 7). Se cuantificaron los oligonucleótidos midiendo  
 la absorbancia a 260 nm y se calcularon los coeficientes de ext. usando:  
 15 <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Modificación de NME con sondas de PNA. Se calentó una disolución que contenía PNA monocatenario tiolado 500 nM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y cloruro de sodio 25 mM a 50°C durante 10 minutos. Entonces se añadió una cantidad adecuada de MCH 10 mM para preparar la concentración de MCH final de 100 nM. Se depositaron 0,5-10  
 20  $\mu\text{l}$  (dependiendo del grado de multiplexación) de esta mezcla sobre los NME en una cámara de humedad oscura durante la noche a 4°C. Se enjuagaron los NME en fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y tampón de NaCl 25 mM antes de la medición.

Mediciones electroquímicas. Se midieron las señales electroquímicas en disoluciones que contenía  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  10  
 25  $\mu\text{M}$ , fosfato de sodio 25 mM (pH 7), cloruro de sodio 25 mM y  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  4 mM. Se midieron señales de voltametría de pulso diferencial (DPV) antes y después de la hibridación usando un escalón de potencial de 5 mV, una amplitud de pulso de 50 mV, una anchura de pulso de 50 ms y un periodo de pulso de 100 ms. Se recogieron señales de voltametría cíclica antes y después de la hibridación con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Se cuantificó la corriente reductora limitante (I) restando el fondo a 0 mV de la corriente catódica a -300 mV en una señal de voltametría cíclica. Se calcularon cambios en la señal correspondientes a la hibridación de la siguiente manera:  $\text{AI} = (\text{I}_{\text{ds}} - \text{I}_{\text{ss}}) / \text{I}_{\text{ss}} \times 100\%$  (ss = antes de la hibridación, ds = después de la hibridación).  
 30

Protocolo de hibridación. Las disoluciones de hibridación contenían normalmente secuencias diana en fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y NaCl 25 mM. Se incubaron los electrodos a 37°C en una cámara de humedad en la oscuridad durante 60 minutos y se lavaron extensamente con tampón antes del análisis electroquímico.  
 35

Aislamiento de ARNm. Se extrajeron los ARNm de líneas celulares y muestras de tejido de pacientes con el kit directo de ARNm Dynabeads (Invitrogen). Se obtuvieron dos muestras de tejido de cáncer de próstata típico de prostatectomías radicales recogidas por la Cooperative Human Tissue Network. Se almacenó el tejido a -85°C hasta que se seleccionó tejido rico en tumor para la extracción de ARNm. Se midieron las concentraciones de dianas de ARNm mediante NanoDrop ND-1000 de Thermo Fisher Scientific (EE.UU.). Se confirmaron todas las secuencias de fusión mediante RT-PCR y secuenciación directa.  
 40

Mediciones cinéticas de la hibridación de ADN en NME. Se prepararon NME modificados con PNA (sec. 2) tal como se describió anteriormente. Se sumergieron NME enjuagados en una disolución que contenía  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  4 mM, diana de ADN 100 fM (sec. 4 a 7), fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y NaCl 25 mM. Se obtuvieron las señales de CV electrocatalíticas tal como se describió anteriormente. Se realizaron todas las mediciones a 37°C.  
 45

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

50 Se buscó generar una plataforma basada en nanomateriales para análisis ultrasensible que es i) altamente robusta y sencilla de fabricar; ii) multiplexada y escalable; y iii) sensible y específica cuando se presentan muestras biológicas heterogéneas. Para satisfacer los requisitos i) y ii) se requirió un medio para lograr la colocación reproducible de cada elemento de detección individual usando un protocolo escalable. Para abordar el requisito iii), se buscó incorporar características a escala nanométrica en la matriz de detección. Sin embargo, la producción de elementos de detección nanoestructurados en matriz puede ser laboriosa y propensa a baja reproducibilidad. La litografía de haz de electrones proporciona el control necesario sobre las características a escala nanométrica y su colocación; sin embargo, es una técnica en serie no adecuada actualmente para la producción de chips de bajo coste, de alto volumen. El presente enfoque era en su lugar usar fotolitografía convencional económica para colocar y situar los electrodos; y entonces encontrar un medio para provocar, con un alto grado de reproducibilidad, la nanoestructuración de estos microelectrodos.  
 55  
 60

Se construyó un chip multiplexado 8 veces creando un patrón con una capa de oro de 350 nm de grosor sobre un chip de silicio para crear ocho alambres de Au de 5  $\mu\text{m}$  de ancho unidos a zonas de metal grandes que servirán como contactos externos. Entonces se depositó  $\text{SiO}_2$  como capa de pasivación y se creó un patrón para crear aberturas con diámetros de 500 nm en el extremo de cada uno de los alambres de Au. Se crearon estas aberturas  
 65

para servir como moldes individuales para el crecimiento controlado, local, de nanoestructuras. Entonces se usó electrodeposición de paladio para depositar metal en las aberturas creadas como patrón. Se encontró que se podía regular el tamaño de las nanoestructuras variando el tiempo de deposición. Pudo confinarse fácilmente el diámetro de las estructuras al régimen de ultramicroelectrodo (<10  $\mu$ ). En condiciones que permitían una deposición de metal rápida, las superficies de los microelectrodos presentaban un alto nivel de nanoestructuración, con tamaños de características de aproximadamente 20 nm. Estas estructuras presentaban un comportamiento de microelectrodo ideal, presentando bajas corrientes capacitivas y altas corrientes de meseta en estado estacionario.

Con el fin de producir estos microelectrodos nanoestructurados (NME) funcionales como biosensores de ácidos nucleicos, se modificaron con sondas de ácidos peptidonucleicos (PNA) tiolados. Se ha mostrado previamente que el uso de PNA como molécula de sonda aumenta la sensibilidad de ensayos de biodetección y es particularmente ventajoso en ensayos electroquímicos porque produce corrientes de fondo reducidas. Para transducir la hibridación de ácidos nucleicos en una señal eléctrica, se empleó un sistema de indicador electrocatalítico desarrollado previamente en el laboratorio. (Lapierre, M. A. *et al.*, *Anal. Chem.* 2003, 75. 6327-6333). Este sistema de indicador se basa en la acumulación de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  en las superficies del electrodo cuando se unen especies polianiónicas como ácidos nucleicos, y la catálisis de la reducción de Ru(III) por medio de la inclusión de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , que regenera Ru(III) y permite múltiples reducciones por centro de metal. Cuando se expusieron NME modificados con PNA a una secuencia complementaria, pudieron detectarse claramente cambios detectables en la señal a lo largo del intervalo de concentración femtomolar. Se observaron cambios insignificantes en la señal con secuencias completamente no complementarias.

Los biomarcadores de cáncer seleccionados para su análisis en esta plataforma son un grupo de fusiones génicas específicas para cáncer de próstata. Estas fusiones, que resultan de una translocación cromosómica que une los genes de ERG y TMPRSS2, se descubrieron recientemente y aparecen en al menos el 50% de los tumores de próstata. Además, hay ~20 tipos de secuencia que presentan diferentes tipos de fusión, y el tipo exacto de fusión presente en un tumor parece correlacionarse con su agresividad y potencial metastásico. Por tanto estas secuencias no sólo son marcadores de diagnóstico prometedoros, sino que también son factores con valor de pronóstico.

Para determinar si los sensores de NME podían diferenciar secuencias de fusión génica de las secuencias de tipo natural que podrían ser complementarias a la mitad, se expuso un sensor modificado con una sonda complementaria al sitio de corte y empalme de la fusión de tipo III a: (1) la diana de fusión (sec. T1), (2) la secuencia correspondiente al gen de TMPRSS2 de tipo natural (sec. T2), y (3) una secuencia correspondiente al gen de ERG de tipo natural (sec. T3). También se sometió a ensayo un control completamente no complementario (sec. T4). Con un tiempo de hibridación de 60 minutos, se observaron aumentos en la señal grandes con la diana completamente complementaria, mientras que se observó una señal mucho más baja con la diana de TMPRSS2. La diana de ERG produjo un cambio en la señal incluso más bajo, y el observado con la secuencia completamente no complementaria era insignificante. La diana de TMPRSS2 se une a la parte de la sonda ubicada en el extremo de la secuencia no unido al electrodo, mientras que la diana de ERG se une a la parte de la sonda ubicada en el extremo anclado en la superficie del electrodo. Los diferentes niveles de señal observados indican que el lado más accesible de la sonda puede unirse mejor a moléculas diana entrantes, mientras que la hibridación con la parte más enterrada de la secuencia es ineficaz.

Para determinar si la hibridación de las diferentes dianas requería el periodo de tiempo de 60 minutos completo sometido a prueba originalmente para lograr una lectura precisa, se monitorizaron las señales electrocatalíticas a una variedad de intervalos dentro de la ventana sometida a prueba originalmente. De manera interesante, la elevación de las señales es muy rápida, con cambios en la corriente significativos observados en el plazo de 2 minutos. Sin embargo, a lo largo del periodo de 60 minutos total, las señales para las secuencias no complementarias y complementarias a la mitad descienden de manera perceptible; desvaneciéndose el 20-50% de la señal de 2 minutos a los 60 minutos. Parece que para secuencias que no son completamente complementarias, se produce algo de unión no específica en los primeros pocos minutos de exposición del sensor de NME a la disolución de diana, pero estos complejos no permanecen estables y no permanecen inmovilizados sobre el electrodo. Por tanto, aunque las secuencias no complementarias pueden distinguirse de las secuencias complementarias con tiempos de hibridación cortos, tiempos más prolongados aumentan los cambios diferenciales en la señal, y por tanto el grado de especificidad.

El rendimiento de estos microelectrodos nanoestructurados como detectores de ácidos nucleicos indicó que las estructuras creadas con patrón eran de hecho sensibles y específicas cuando se usaban en condiciones de hibridación apropiadas. Por tanto, se buscó demostrar que los NME basados en chips multiplexados podían usarse para someter a ensayo biomarcadores de cáncer presentes en muestras biológicas heterogéneas. Para explorar esta capacidad, se evaluaron extractos de células y muestras tumorales de pacientes con cáncer de próstata para determinar si la sensibilidad y especificidad del sistema eran lo suficientemente robustas para pruebas clínicas.

Para determinar si podían detectarse fusiones génicas asociadas con cáncer de próstata usando el chip de NME, se analizó en primer lugar ARNm aislado de dos líneas celulares de cáncer de próstata: VCaP y DU145. La primera línea celular es positiva para fusión de tipo III, y la última es negativa para la fusión. No se produjeron cambios apreciables en la señal cuando se incubaron 10 ng de ARNm de la línea celular que carece de esta secuencia con

un NME que presentaba una sonda complementaria a la fusión de tipo III (sec. P1), mientras que se observaron grandes aumentos en la señal en presencia de 10 ng de ARNm de la línea celular que contiene la fusión de tipo III. Además, la modificación de NME con una sonda complementaria a una fusión diferente (sec. P2) no produjo una señal significativa con muestra de ARNm positiva. La detección del gen fusionado es por tanto altamente específica.

5 Estos resultados son significativos, ya que la eficacia en el uso de muestra (10 ng) y el tiempo total requerido para el análisis (menos de 1,5 horas) mejoran significativamente con respecto a otros métodos de detección como hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y secuenciación.

La aplicación final del chip de NME es el análisis directo, multiplexado de un panel de biomarcadores de cáncer en muestras de paciente relevantes. Para someter a prueba el rendimiento del dispositivo para este tipo de aplicación, se analizó un panel de muestras de ARNm recogidas de líneas celulares y muestras de tumores clínicos para detectar una serie de fusiones génicas. Se obtuvo un grupo de muestras que permitirían la detección de los tres tipos más comunes de fusiones génicas de cáncer de próstata: tipo I, tipo III y tipo VI. Se asocian diferentes desenlaces clínicos con estas secuencias, siendo la fusión de tipo III las más comunes pero que se correlacionan con bajas tasas de recidiva del cáncer, mientras que las fusiones de tipo I y VI se correlacionan con cánceres agresivos con altos niveles de recidiva. Por tanto, resulta de gran interés poder diferenciar estas fusiones en tumores, y un método que permita que evaluar su presencia o ausencia de manera rápida y sencilla tendría valor en su estudio y validación adicionales como biomarcadores de diagnóstico.

Se depositaron sondas complementarias a cada una de las tres fusiones sobre sus respectivos electrodos en chips de NME, y se obtuvo el perfil de 5 muestras de ARNm diferentes para determinar la presencia de diferentes fusiones génicas en un formato multiplexado. Se sometieron a prueba tres líneas celulares: VCap (positiva para tipo III),<sup>28</sup> NCI-H660 (positiva para tipo III y VI) y DU145 (negativa para fusión).<sup>28</sup> Además, se sometieron a prueba dos muestras tumorales (tejidos recogidos mediante prostatectomías radicales), una que era positiva para la fusión de tipo I y una que era positiva para la fusión de tipo III, tal como se confirmó mediante secuenciación convencional. En cada caso, todos los experimentos tardaron menos de 2 horas y requirieron sólo 10 ng de ARNm. Analizando las señales electroquímicas recogidas en NME que presentaban diferentes sondas, se determinó la identidad de los genes fusionados presentes en cada muestra. Por ejemplo, en la muestra de paciente que contenía la fusión de tipo I (tal como se verificó mediante secuenciación), los valores de corriente observados en cada NME modificado con sonda disminuyeron en el siguiente orden: I >>>> III > VI. En la muestra de paciente que contenía la fusión de tipo III, las señales electrónicas apuntaron de nuevo a la identidad correcta de la fusión con la sonda III >>>> I > VI. Estos resultados, y los obtenidos con ARN celular de DU145, VCaP y H660, en los que la obtención del perfil electrónico indicó correctamente la ausencia o presencia de fusiones génicas, indican que los chips de NME pueden obtener el perfil de estos importantes biomarcadores en muestras complejas y distinguir perfiles de biomarcadores asociados con diferentes desenlaces clínicos.

La plataforma de detección descrita en el presente documento no sólo es específica, sensible y robusta, también es práctica y escalable. El método de fabricación reproducible que se eligió es propenso a la producción de chips modificados con sondas usando las mismas tecnologías fotolitográficas en uso extendido en la fabricación de microchips de electrónica de consumo; y sólo es necesaria una instrumentación sencilla y económica para la lectura. No se requieren microfluidos para el análisis automatizado, ya que la hibridación puede realizarse y leerse en un único recipiente de reacción. Este sistema representa una alternativa atractiva a métodos basados en PCR que son sensibles pero difíciles de automatizar en un entorno clínico.

En resumen, la nueva plataforma de electrodos multiplexados que se describe en el presente documento es la primera en leer directamente un panel de biomarcadores de cáncer en muestras clínicamente relevantes usando señales electrónicas. La matriz que permite estas mediciones presenta microelectrodos que poseen una nanotexturización controlable y versátil esencial para su sensibilidad. El sistema combina estos electrodos nanotexturizados con una lectura catalítica rápida para lograr un objetivo que viene de largo: el análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer usando una plataforma económica y práctica.

### **Ejemplo 3. La detección de microARN directa, electrónica, revela perfiles de expresión diferencial en 30 minutos.**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Materiales. Se adquirieron 6-mercaptop-1-hexanol (MCH al 97%), cloruro de hexamina-rutenio (99,9+%), ferricianuro de potasio (99%) y cloruro de paladio (II) (99,9+%) de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON). Se obtuvieron ácido perclórico (70%), acetona (calidad de ACS) y alcohol isopropílico (IPA, calidad de ACS) de EMD (Gibbstown, NJ). Se obtuvieron oligómeros de PNA tiolados de Biosynthesis Inc (Lewisville, TX) con calidad purificada por HPLC. Las sondas de PNA llevan un dipéptido Cys-Gly en su extremo N-terminal. Gly actúa como espaciador, mientras que Cys proporciona un tiol libre para la inmovilización sobre la superficie del electrodo. Se obtuvieron microARN sintéticos (extremo 5' fosforilado y purificados por HPLC) de Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL). Se muestran todas las secuencias de PNA y ARN en la tabla S1 proporcionada en la información de apoyo.

Fabricación de los chips. Se fabricaron los chips en el Canadian Photonics Fabrication Center. Se pasivaron obleas

de silicio de 3" usando una capa gruesa de dióxido de silicio hecho crecer térmicamente. Se depositó una capa de oro de 350 nm sobre el chip usando evaporación de oro asistida por haz de electrones. Se creó un patrón en la película de oro usando fotolitografía convencional y un procedimiento de despegue. Se depositó una capa de 500 nm de dióxido de silicio aislante usando deposición química en fase de vapor. Se imprimieron aberturas de 500 nm sobre los electrodos usando fotolitografía convencional, y se expusieron zonas de conexión de 2 mm x 2 mm usando fotolitografía convencional.

Fabricación de microelectrodos nanoestructurados. Se limpiaron los chips enjuagándolos en acetona, IPA y agua DI durante 30 s y se secaron con un flujo de nitrógeno. Se realizó toda la electrodeposición a temperatura ambiente con un potenciostato Epsilon de Bioanalytical Systems con un sistema de tres electrodos que presenta un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Se usaron aberturas de 500 nm sobre los electrodos fabricados como electrodo de trabajo y se pusieron en contacto usando las zonas de conexión expuestas. Se sumergió una parte de 2 mm del chip en el baño de galvanización que contenía cloruro de paladio (II) 5 mM y ácido perclórico 0,5 M, y se incubó durante aproximadamente 5 min antes de la galvanización. Se mantuvieron las zonas de conexión libres de disolución. Se fabricaron NME de Pd usando amperimetría de potencial de CC a un potencial aplicado de -100 mV durante 6 s.

Modificación de NME con sondas de PNA. Se disolvieron sondas de PNA tiolado monocatenario en una disolución tampón (pH 7) que contenía fosfato de sodio 25 mM y cloruro de sodio 25 mM a una concentración de 500 nM. Entonces se calentó la disolución a 50°C durante 10 minutos para disolver completamente las moléculas de PNA. Entonces se añadió una cantidad adecuada de MCH 10 mM para preparar la concentración de MCH final de 100 nM. Se depositaron rápidamente 10 µl de esta mezcla sobre un chip que presentaba NME de Pd usando una micropipeta manual. Entonces se incubó este chip cubierto con la disolución de sondas de PNA en una cámara de humedad oscura durante la noche a 4°C. Se enjuagaron vigorosamente los NME de Pd modificados con sondas con la disolución tampón anterior antes de las mediciones. Para experimentos multiplexados, se usaron chips con ocho cables tratables individualmente.

Hibridación con dianas. Las disoluciones de hibridación contenían diversas concentraciones de dianas en fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0) y NaCl 25 mM. Se incubaron los NME de Pd con 10 µl de disolución de diana a 37°C en una cámara de humedad durante 30 min para permitir que las moléculas de sonda inmovilizadas se hibridaran con las moléculas diana. Entonces se enfrió el chip y se lavó vigorosamente con tampón antes del análisis electroquímico.

Mediciones electroquímicas. Se realizaron mediciones electroquímicas con un analizador electroquímico (BASi, West Lafayette, EE.UU.) en una disolución que contenía  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  10 mM,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  4 mM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7,0) y NaCl 25 mM. Se realizó voltametría cíclica (CV) antes y después de la adición de disoluciones de diana a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Se realizó voltametría de pulso diferencial (DPV) con un escalón de potencial de 5 mV, una amplitud de pulso de 50 mV, una anchura de pulso de 50 ms y un periodo de pulso de 100 ms. Se recogieron señales de voltametría cíclica antes y después de la hibridación con una velocidad de barrido de 100 mV/s. Se cuantificó la corriente reductora limitante (I) restando el fondo a 0 mV de la corriente catódica a -300 mV en una señal de voltametría cíclica. Se calcularon los cambios en la señal correspondientes a la hibridación de la siguiente manera:  $\Delta I = (I_{ds} - I_{ss}) / I_{ss} \times 100\%$  (ss = antes de la hibridación, ds = después de la hibridación). Se determinó el límite de detección como la primera concentración en la que la señal de la que se restó el fondo ( $\Delta I$  no complementaria) era 2 veces más alta que la desviación estándar de muestra control no complementaria 10 fM.

Obtención de imágenes de SEM. Se empleó un instrumento de SEM HITACHI S-3400 (Hitachi High Technologies America, Inc., Pleasanton, CA) para estudiar la morfología y dimensión de los NME electrodepositados. Se fijó el chip sobre un adaptador de SEM de acero inoxidable usando cinta adhesiva de doble cara de carbono negro. Se adquirió la imagen de SEM usando el modo electrónico secundario a 20 kV.

Extracción de ARN para análisis de PCR y protocolo de amplificación. Se extrajo el ARN total de las líneas celulares con el kit mirVana (Ambion). Se evaluó la calidad de las muestras mediante análisis de RT-PCR del control endógeno RNU44 usando el ensayo de microARN TaqMan® de Applied Biosystems. Este ensayo incluye una etapa de transcripción inversa (RT) usando el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.) en el que un cebador de RT de tallo-bucle se hibrida específicamente con una molécula de mir y entonces se somete a transcripción inversa con una transcriptasa inversa MultiScribe. En resumen, la mezcla de transcripción inversa incluye cebadores de RT de tallo-bucle 50 nM, 1x tampón RT, 0,25 mM de cada uno de los dNTP, transcriptasa inversa MultiScribe 3,33 U/µl e inhibidor de ARNasa 0,25 U/µl. Entonces se incubó la reacción de 7,5 µl en un termociclador 7900 de Applied Biosystems durante 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y entonces se mantuvo a 4°C. Posteriormente se amplificaron los productos de RT con cebadores específicos de secuencia (cebador de hsa-mir-21 4373090 y cebador de hsa-mir-205 4373093 de Applied Biosystems) usando el sistema de PCR en tiempo real 7900 HT de Applied Biosystems. La mezcla de PCR de 10 µl contiene 0,67 µl producto de RT, 1x4 mezcla maestra de PCR universal TaqMan®, sonda TaqMan® 0,2 µM, cebador directo 1,5 µM y cebador inverso 0,7 µM. Se incubaron las reacciones en una placa de 384 pocillos a 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Clonación y expresión de pre-miRNA-21. Se produjo ADNc sometiendo a transcripción inversa 500 ng de ARN total a partir de células FaDu usando el kit de transcripción inversa de ADNc High-Capacity (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Se usaron 50 ng de ADNc como molde para la amplificación por PCR del tallo-bucle de premiRNA-21 con 1 *HM* de los cebadores MIR-F (CCT ACC ATC GTG ACA TCT CCA TGG) y MIR-R (ATG AGA ACA TTG GAT ATG GAT GGT). Las condiciones para la PCR fueron: 95°C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Se purificó en gel el producto de PCR (kit de extracción en gel, Qiagen) y se clonó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen). Se recogieron colonias y se hicieron crecer en medio LB. Se purificó ADN de plásmido con el kit Plasmid Mini (Qiagen), y se comprobó que el producto era el correcto, la orientación y la ausencia de mutaciones no deseadas con secuenciación (ACGT corporation). Se digirió el ADN de plásmido con NotI que no genera extremos en 3' sobresalientes que producen ARN de vector de fondo alto durante la transcripción *in vitro*. Se usó 1 µg de ADN de plásmido linealizado como molde para la transcripción *in vitro* con el kit de transcripción de alto rendimiento AmpliScribe™ T3 (Epicentre Biotechnologies). Tras la finalización de la transcripción inversa, se añadió ADNasa I para digerir el ADN de molde y se purificó el ARN con el kit de purificación de ARN total PureLink Micro to Midi (Invitrogen). Se determinó la concentración de ARN leyendo la absorbancia a 260 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se intentó desarrollar un nuevo método para la obtención del perfil de microARN que presenta la conveniencia de análisis basado en matriz, pero que aumenta el poder de tal multiplexación con la sensibilidad excepcional requerida para someter a ensayo muestras biológicas pequeñas para detectar microARN de baja abundancia. Dado que los métodos basados en fluorescencia convencionales son insuficientemente sensibles para monitorizar la hibridación de pequeños números de moléculas con secuencias de sondas unidas a la superficie con instrumentación sencilla, en su lugar se intentó un enfoque que empleaba una lectura electrónica.

Con el fin de proporcionar una plataforma para la detección electrónica de microARN, se preparó un chip multiplexado que presentaba un patrón de electrodo generado mediante fotolitografía. Se preparó este chip usando una oblea de silicio como base, y se depositó un patrón de oro sobre su superficie para proporcionar un conjunto multiplexado de cables y contactos externos. Se depositó una capa de SiO sobre la parte superior del oro para pasivar el metal, y entonces, en la etapa de fabricación final, se abrieron aberturas de 500 nanómetros en el extremo de cada cable para exponer el oro. Para generar microelectrodos que sobresalen, se electrodepositó paladio en las aberturas. Se diseñó la etapa de electrodeposición para producir microelectrodos altamente nanoestructurados (NME). Estudios previos han indicado que elementos de detección nanoestructurados pueden presentar sondas biomoleculares más eficazmente que materiales a granel y facilitar reacciones de complejación en superficie, pero esta ventaja nunca se ha explotado para la obtención directa del perfil biológico.

Para someter a prueba el chip electrónico para determinar la sensibilidad y especificidad en la detección de microARN, se modificaron NME de Pd con sondas de PNA y se expusieron a ARN para su hibridación. Se sometió a ensayo la complejación usando un sistema de indicador redox, que se mostró previamente que mostraba sensibilidad femtomolar cuando se usaba conjuntamente con electrodos nanoestructurados y sondas de PNA. (R. Gasparac, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 12270; Z. Fang, S. O. Kelley, Anal. Chem. 2009, 81, 612; M. A. Lapierre, *et al.*, Anal. Chem. 2003, 75, 6327; M.A. Lapierre-Devlin, *et al.*, Nano Lett. 2005, 5, 1051). Este sistema de indicador se basa en la acumulación de Ru(III) cuando se hibridan ácidos nucleicos en la superficie de un electrodo, y las señales obtenidas a partir de este indicador se amplifican mediante la inclusión de ferricianuro, que puede regenerar Ru(III) químicamente tras su reducción electroquímica. Titulaciones de la secuencia de miR-21 mostraron cambios detectables en la señal en relación con secuencias control no complementarias cuando se expusieron disoluciones que contenían tan sólo 10 aM de la diana a los NME basados en chips. Esto corresponde a 10 moléculas por microlitro de muestra. El nivel de sensibilidad muy alto va acompañado por un intervalo dinámico limitado de sólo 10<sup>2</sup>, pero para la detección de microARN, este compromiso es meritorio dada la baja abundancia de estas secuencias.

Se demandan específicamente dos criterios de detección adicionales cruciales en la detección de microARN. En primer lugar, deben distinguirse de manera precisa secuencias estrechamente relacionadas (diferentes en tan sólo una base). En segundo lugar, deben diferenciarse apéndices de secuencia como los encontrados en microARN maduro frente a precursor. Se buscó exponer el sistema a cada uno de estos requisitos. Se investigó en primer lugar la especificidad del ensayo para secuencias de microARN maduro. Se realizó esto analizando cambios en la señal observados cuando se expuso el chip a disoluciones que contenían o bien la forma de longitud completa, bicatenaria, precursora de miR-21, o bien la secuencia de miR-21 significativamente más corta, monocatenaria, madura. La señal obtenida para la estructura del precursor en horquilla se aproximaba a los niveles de fondo, mientras que se observó un cambio de señal robusto para miR-21 madura.

Se evaluó la sensibilidad del enfoque de detección frente a mutaciones puntuales monitorizando la respuesta de elementos de detección modificados con sondas a dos secuencias estrechamente relacionadas, miR-26a y miR-26b. Se dispusieron en matrices sobre el chip sondas complementarias a cada secuencia, y se monitorizó la respuesta de estos elementos a las secuencias complementarias. La señal obtenida cuando se introdujo miR-26a era aproximadamente 4 veces para la sonda de miR-26a completamente coincidente con respecto a la sonda miR-26b

apareada erróneamente, y de manera similar, la señal obtenida cuando se introdujo miR-26b era aproximadamente 4,5 veces superior para la sonda miR-26b completamente coincidente con respecto a su sonda homóloga apareada erróneamente. Estos resultados indican que este chip multiplexado puede diferenciar satisfactoriamente secuencias de microARN estrechamente relacionadas.

5 Se ha mostrado anteriormente que la derivación de una "huella" de expresión de microARN a partir de líneas celulares que representan un tipo de tumor particular en relación con células normales es un enfoque potente para identificar microARN que pueden servir como biomarcadores en pacientes. Habiendo confirmado la especificidad y sensibilidad del chip frente a dianas de microARN, entonces se sometió a prueba usando muestras de ARN  
10 extraídas de células normales humanas y las derivadas de líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello humano hechas crecer en cultivo. Por ejemplo, se tituló el ARN total extraído de la línea celular FaDu de cáncer escamoso hipofaríngeo humano y una línea celular epitelial bucal normal sobre un microelectrodo nanoestructurado que presentaba una sonda complementaria a miR-205. Se obtuvo una señal positiva con tan sólo 5 ng de ARN derivado de las células FaDu, mientras que células epiteliales normales no produjeron ningún cambio en la señal  
15 con hasta 20 ng de ARN. Esto indica que la respuesta de señal corresponde a un marcador único presente a niveles significativamente superiores en las líneas celulares de cáncer.

Se obtuvo el perfil de dos microARN diferentes, miR-21 y miR-205, y también se incluyó un ARN control, RNU-44 en un panel de muestras de ARN total. Se emplearon tres líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello  
20 diferentes, y se comparó la respuesta del chip de microelectrodo a estas muestras de ARN total en relación con ARN aislado de células epiteliales bucales normales. Tal como se esperaba, los niveles de RNU-44, tal como se determina mediante la respuesta electroquímica medida para cada muestra de ARN total expuesta a un elemento de detección modificado con una sonda complementaria, permanecieron constantes en las cuatro líneas celulares. Sin embargo, las señales de miR-21 y miR-205 estaban ambas significativamente elevadas en las líneas celulares de  
25 cáncer. De hecho, se determinó que los niveles de estos microARN estaban presentes a niveles > 100 veces superiores en las líneas celulares de cáncer en relación con las células epiteliales normales. Se confirmó la sobreexpresión de estas dianas usando PCR cuantitativa convencional (véase la información de apoyo). Se ha observado anteriormente que tanto miR-21 como miR-205 están elevados en carcinomas escamosos de cabeza y cuello humanos primarios, lo que indica un potencial significativo de que estos micro-ARN sirvan como  
30 biomarcadores de diagnóstico para este tumor maligno.

En conclusión, el chip de detección de microARN descrito en el presente documento ofrece la sensibilidad y especificidad para el análisis de una clase novedosa de biomarcadores de ácidos nucleicos que representan una de  
35 las dianas de detección más difíciles. La lectura electrónica de los perfiles de microARN ofrece un método rápido, aunque altamente preciso, para someter a ensayo directamente muestras de ARN para detectar secuencias específicas, y la falta de marcaje o amplificación hace que este enfoque sea extremadamente sencillo y eficaz, características que no pueden lograrse con otros enfoques basados en PCR o hibridación.

**Lista de secuencias**

- 40 <110> THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO TAFT, BRADFORD SOLEYMANI, LEYLA FANG, ZHICHAO SARGENT, EDWARD KELLEY, SHANA
- 45 <120> MICROELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS Y DISPOSITIVOS DE BIODETECCIÓN QUE LOS INCORPORAN
- <130> Documento 109904-0004-EP1
- 50 <140> Documento EP09810953.1
- <141> 01-09-2009
- <150> Documento PCT/CA2009/001212
- 55 <151> 01-09-2009
- <150> Documento 61/093.667
- <151> 02-09-2008
- 60 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1

## ES 2 636 664 T3

<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética  
10 <220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (1)..(20)  
<223> PNA  
<400> 1  
20 ataaggctc ctgccgcgct 20  
<210> 2  
25 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética  
35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
40 <223> PNA  
<400> 2  
45 ctggaataac ctgccgcgct 20  
<210> 3  
<211> 20  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética  
<220>  
60 <221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
65 <223> PNA

## ES 2 636 664 T3

<400> 3  
ataaggcttc tgagttcaaa 20

5 <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial  
<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 4  
agcgcggcag gaagccttat 20

20 <210> 5  
<211> 20  
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial  
<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 5  
agcgcggcag gtcattatga 20

35 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial  
<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 6  
tcatatcaag gaagccttat 20

50 <210> 7  
<211> 20  
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial  
<220>

60 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
<400> 7

65

## ES 2 636 664 T3

tttttttt tttttttt 20

<210> 8

5 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

15

<400> 8

cctaccatcg tgacatctcc atgg 24

<210> 9

20

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

30

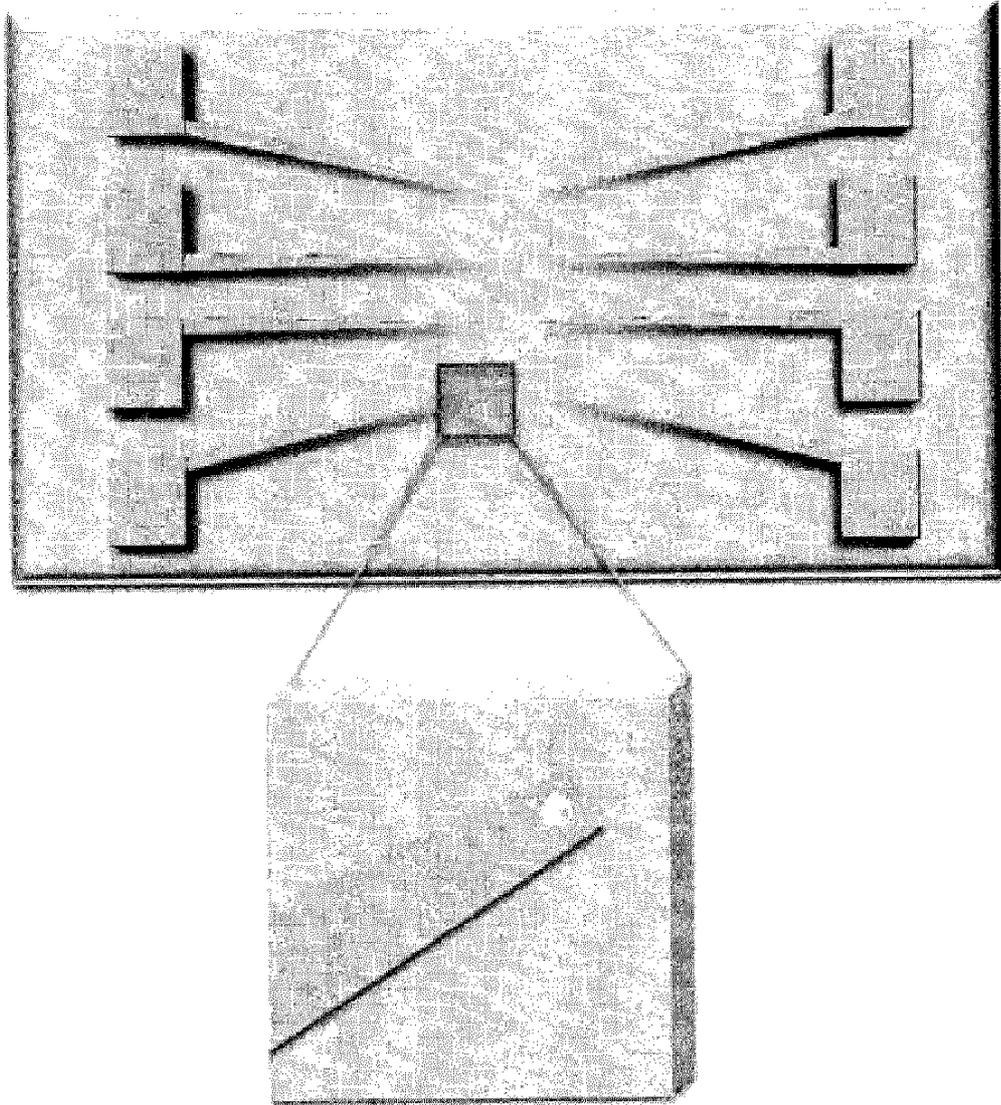
<400> 9

atgagaacat tggatgga tgg 24

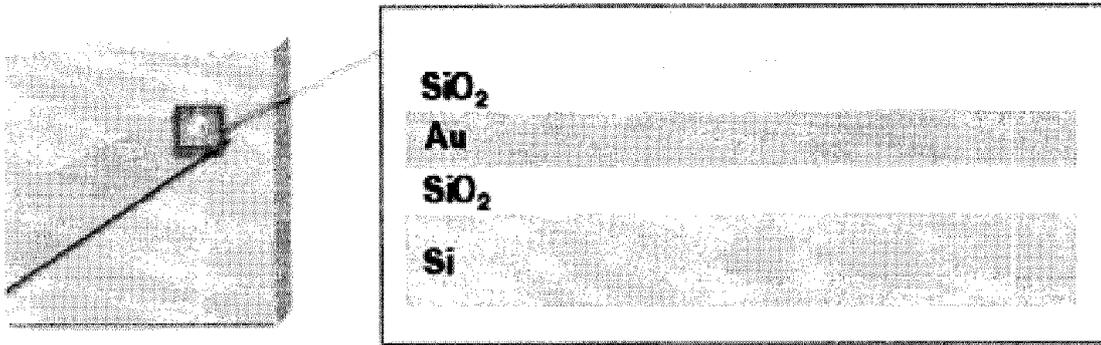
**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo de biodetección que comprende:
- 5 un sustrato;
- al menos un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato;
- 10 una capa aislante que recubre el cable, teniendo la capa aislante una abertura que define un espacio en el que se expone una parte del cable; y
- un microelectrodo nanoestructurado depositado dentro de la abertura, en el que el microelectrodo está adaptado por medio de un sistema de indicador electrocatalítico para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular;
- 15 en el que:
- el microelectrodo nanoestructurado puede presentar una sonda biomolecular en la superficie del mismo, y
- 20 el microelectrodo nanoestructurado está en contacto eléctrico con la parte expuesta del cable.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que se proporciona una pluralidad de microelectrodos en una matriz, y cada microelectrodo puede tratarse individualmente.
3. Método para fabricar un dispositivo de biodetección, comprendiendo el método:
- 25 proporcionar un sustrato y un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato, estando el cable recubierto por una capa aislante;
- 30 grabar con ácido una abertura en la capa aislante para exponer una parte del cable; y
- electrodepositar un material eléctricamente conductor sobre la parte expuesta del cable para formar un microelectrodo nanoestructurado.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la electrodeposición comprende controlar un potencial aplicado con el fin de obtener una morfología seleccionada del grupo que comprende: semiesférica, irregular, cíclica o fractal.
- 35 5. Método según la reivindicación 4, en el que la morfología del microelectrodo nanoestructurado fractal es dendrítica.
- 40 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la región grabada con ácido se define fotolitográficamente.
7. Método según la reivindicación 3, en el que se proporciona una pluralidad de cables eléctricamente conductores sobre el sustrato, y el método comprende además grabar con ácido una abertura en la capa aislante para exponer una parte de cada cable y electrodepositar un material conductor sobre la parte expuesta de cada cable para formar una pluralidad de microelectrodos nanoestructurados que pueden tratarse individualmente.
- 45 8. Método según la reivindicación 7, en el que cada uno de la pluralidad de microelectrodos nanoestructurados que pueden tratarse individualmente comprende diferentes materiales conductores, morfologías, tamaños y/o nanoestructura.
- 50 9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que los microelectrodos nanoestructurados se funcionalizan usando la misma clase de moléculas de sonda que tienen diferentes secuencias.
- 55 10. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que los microelectrodos nanoestructurados se funcionalizan usando clases diferentes de moléculas de sonda.
11. Cartucho de biodetección que comprende una cámara de muestra para contener una muestra biológica y una cámara de biodetección para contener el dispositivo de biodetección según la reivindicación 1 ó 2.
- 60 12. Cartucho según la reivindicación 11, en el que el cartucho está adaptado para subdividir la muestra biológica mediante medios químicos, mecánicos o de vibración.
13. Método para llevar a cabo un procedimiento de biodetección que usa un microelectrodo nanoestructurado, comprendiendo el método:
- 65

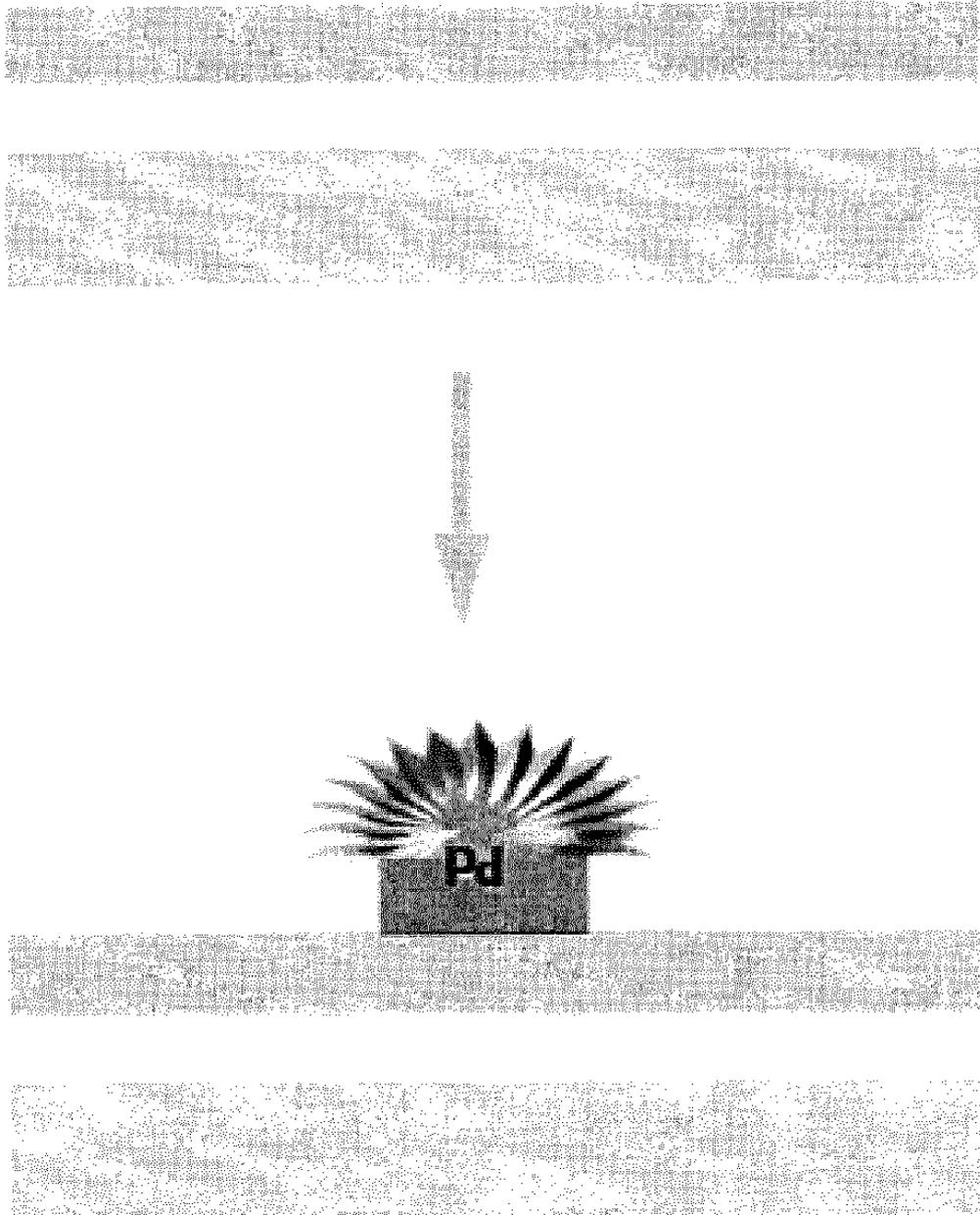
- proporcionar el dispositivo de biodetección según la reivindicación 1;
- polarizar el microelectrodo con respecto a un electrodo de referencia;
- 5 medir un flujo de carga de referencia o corriente de referencia entre el microelectrodo y el electrodo de referencia;
- exponer el microelectrodo a un estímulo biomolecular;
- 10 medir, por medio de un sistema de indicador electrocatalítico, un flujo de carga o corriente generado en el microelectrodo en respuesta al estímulo biomolecular; y
- determinar la cantidad de estímulo biomolecular comparando el flujo de carga medido o de corriente medido frente al flujo de carga de referencia o de corriente de referencia.
- 15 14. Método según la reivindicación 13, en el que se proporciona una pluralidad de microelectrodos nanoestructurados en una matriz, y cada uno de los microelectrodos nanoestructurados puede tratarse individualmente.
- 20 15. Método según la reivindicación 14, en el que la matriz se usa para análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer en una muestra biológica.



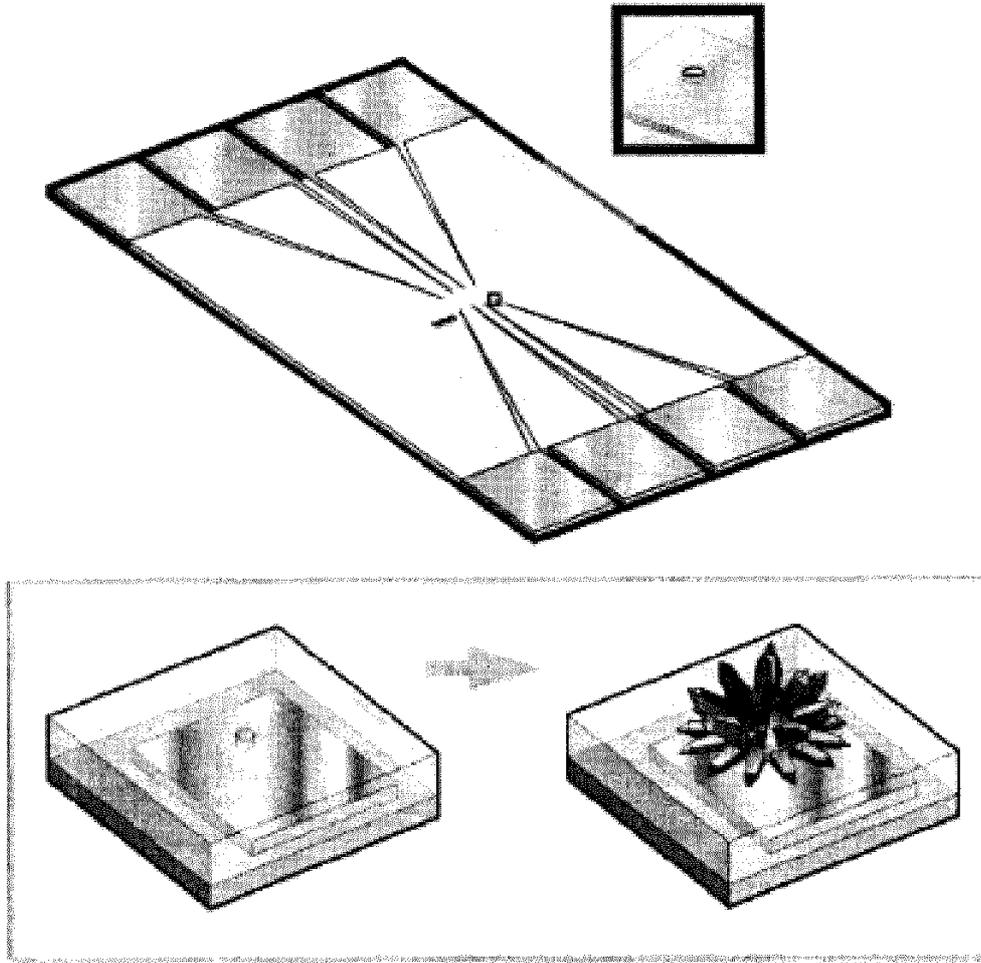
**FIG. 1A**



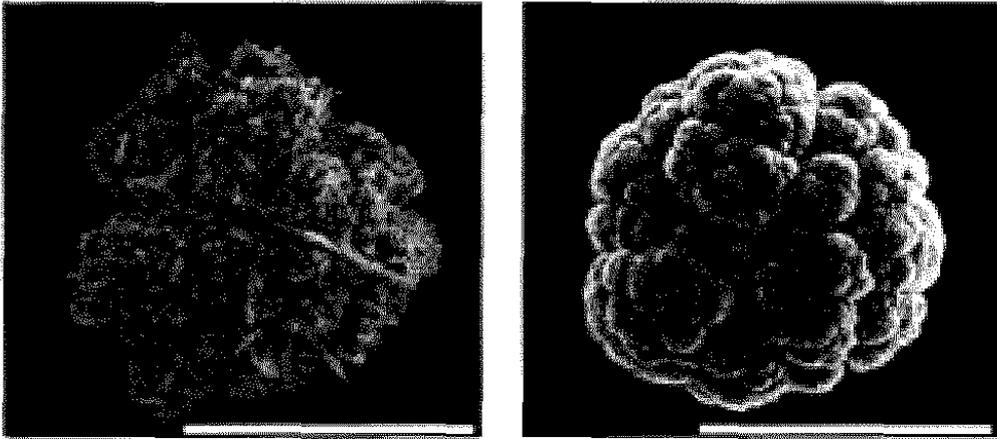
**FIG. 1B**



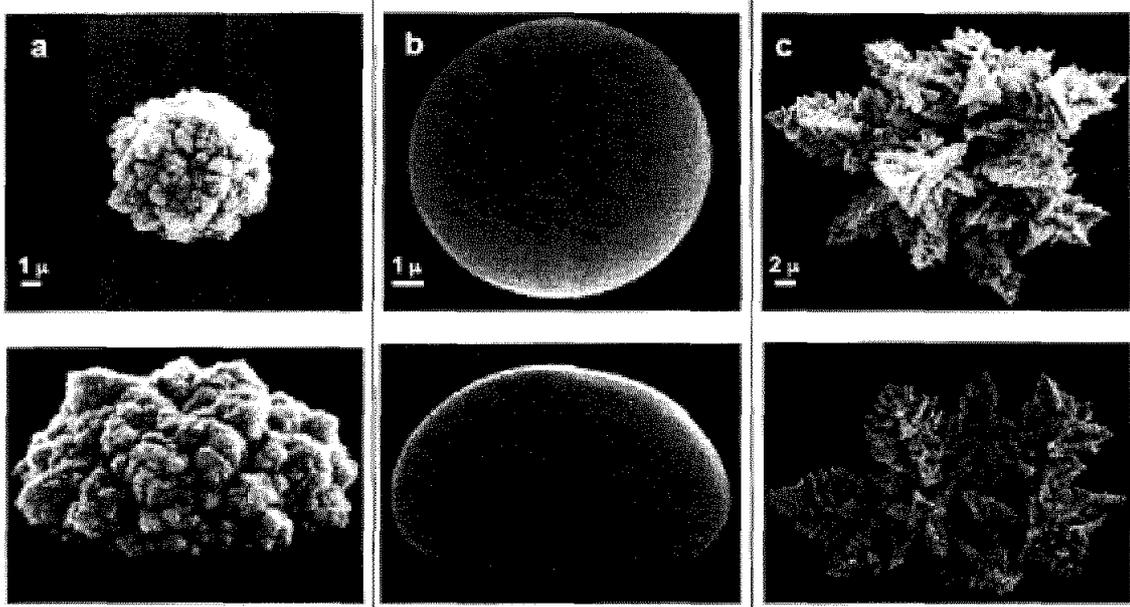
**FIG. 1C**



**FIG. 2**

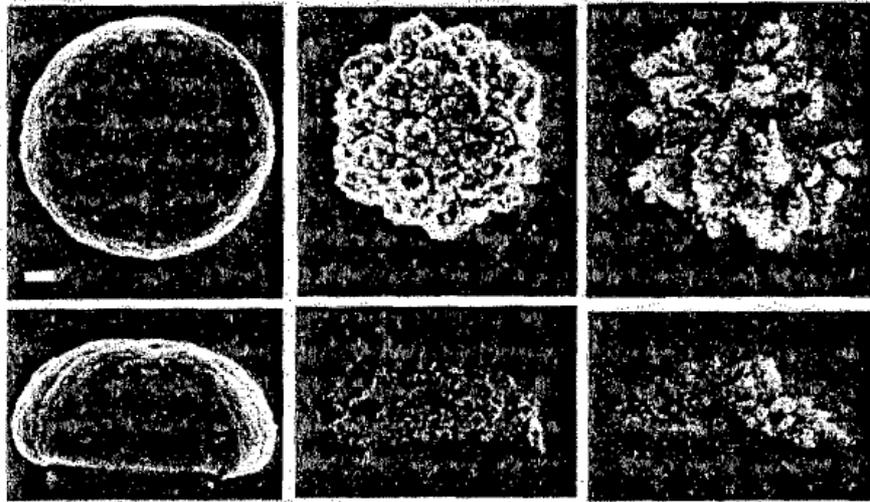


**FIG. 2B**



**FIG. 3**

*Nanoestructuración creciente*



**FIG. 4**

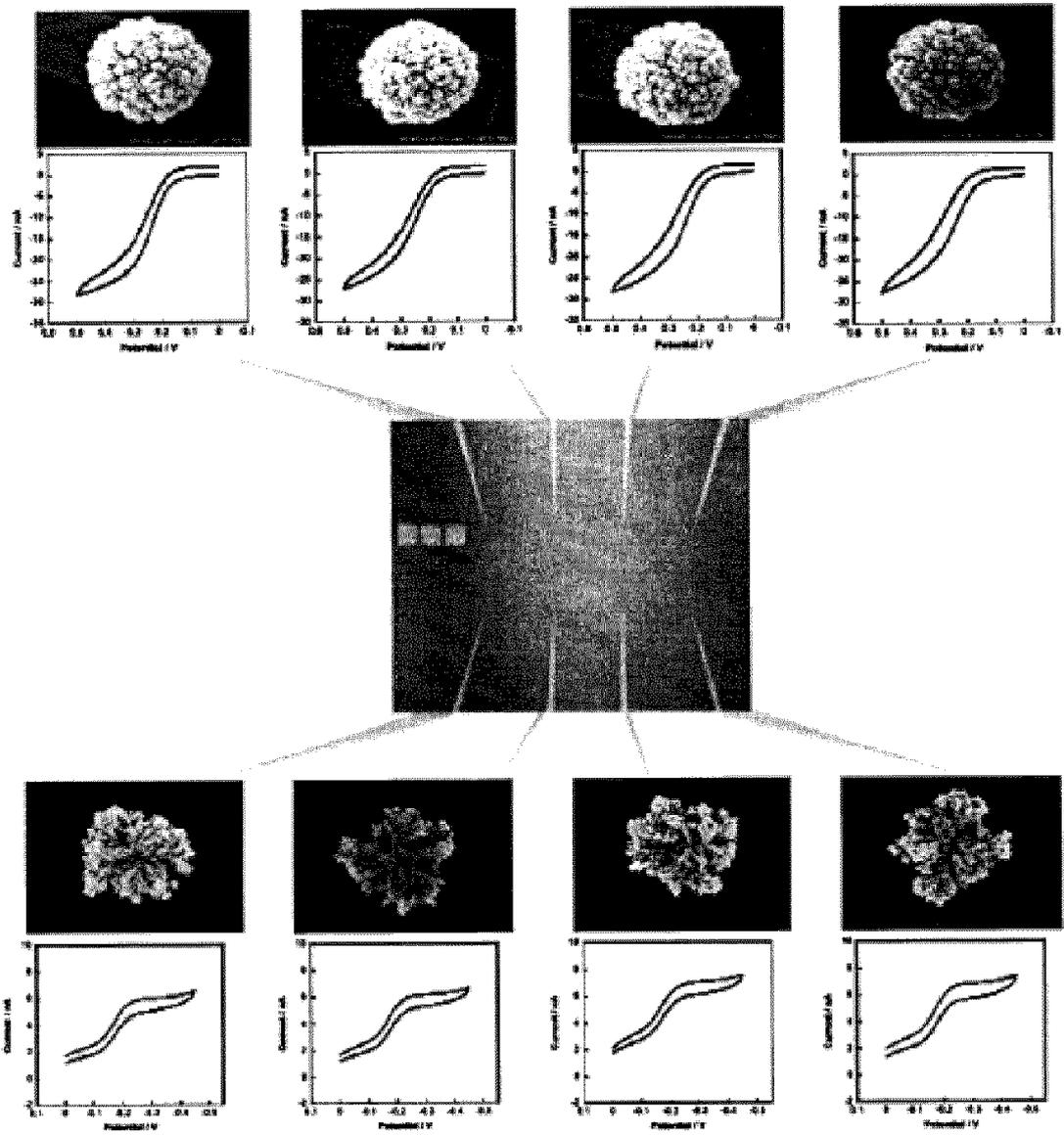


FIG. 5

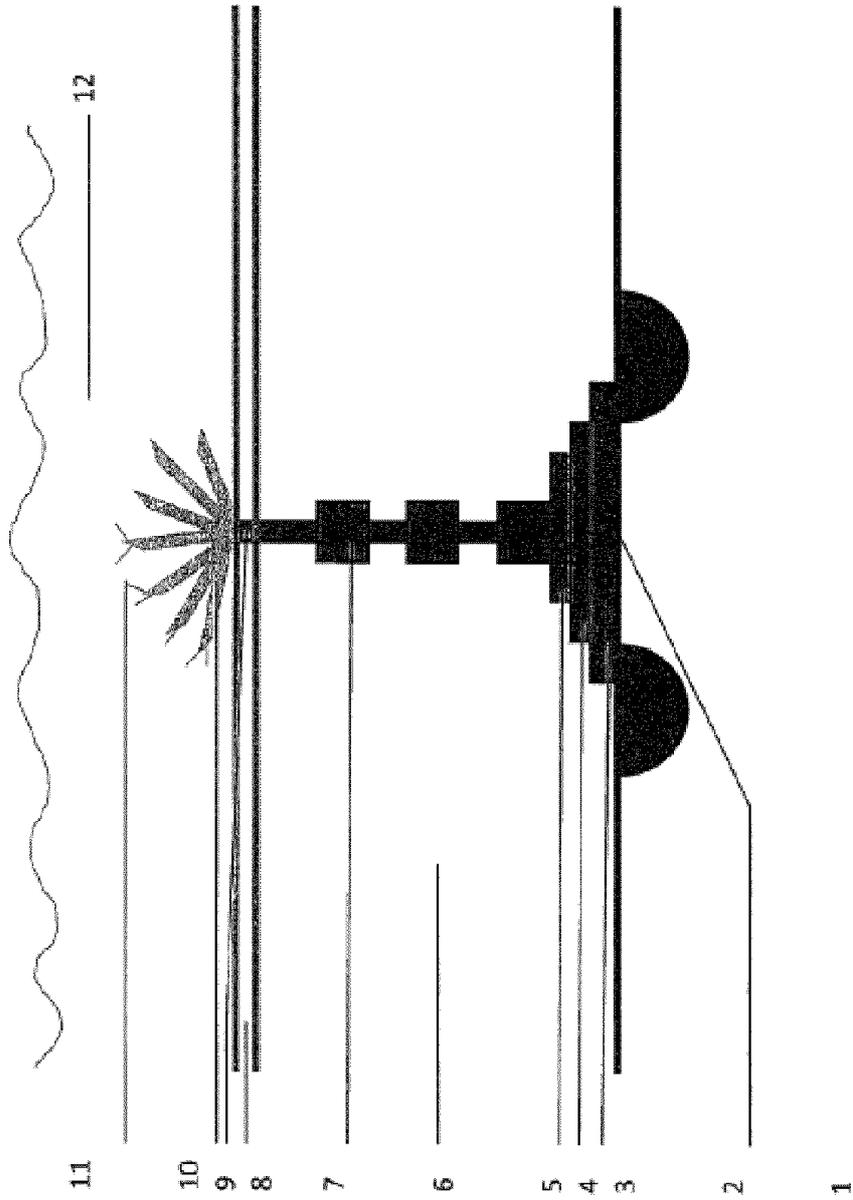


FIG. 6

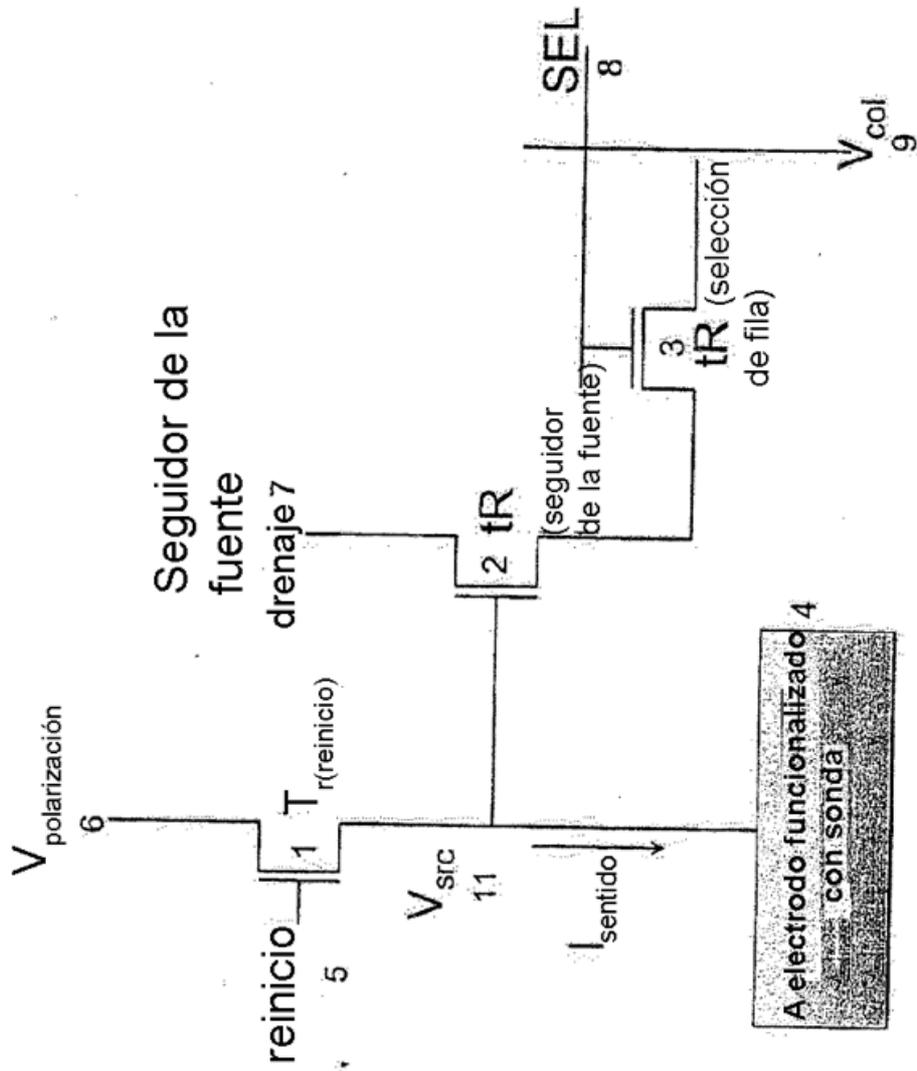


FIG. 7

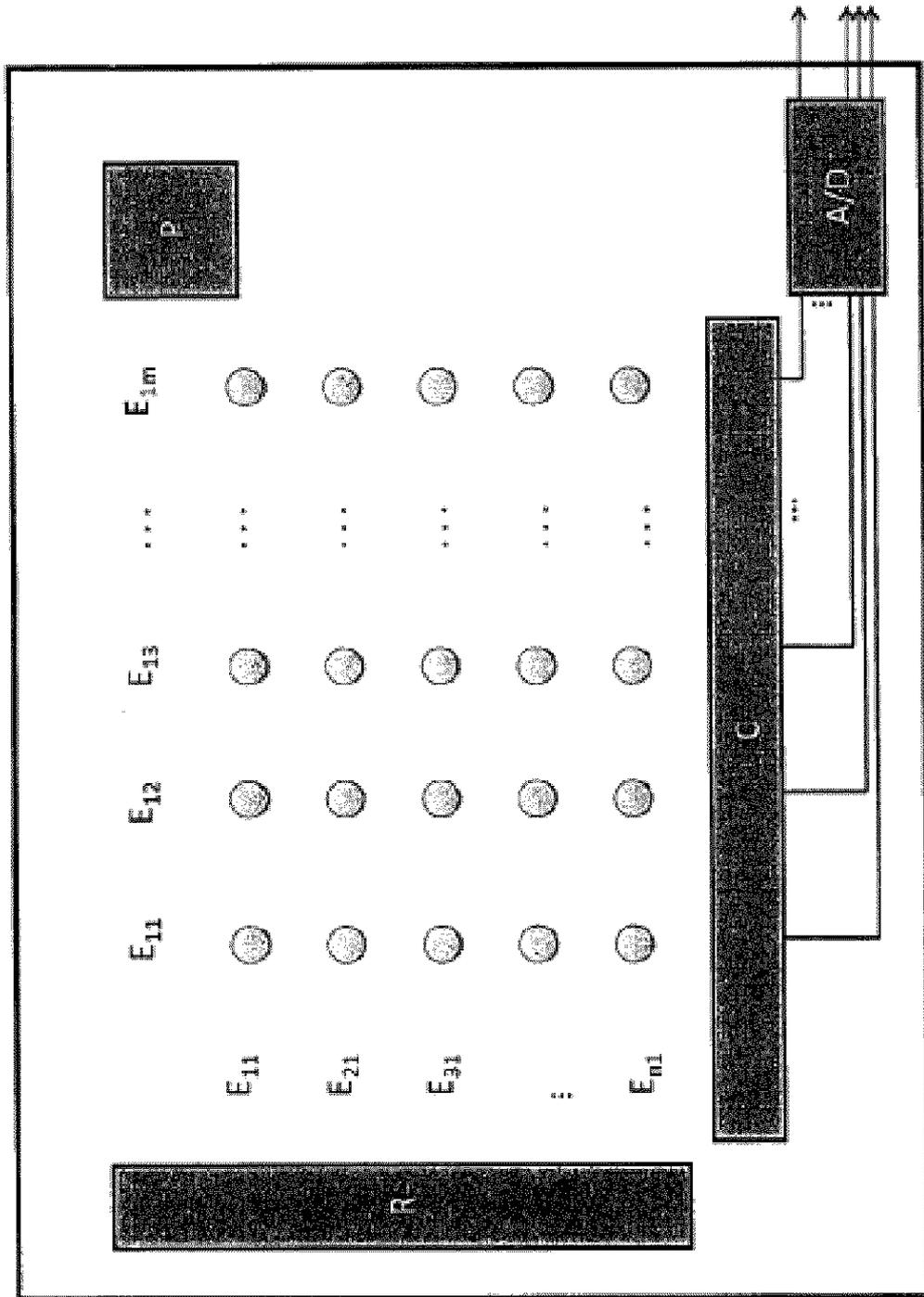


FIG. 8

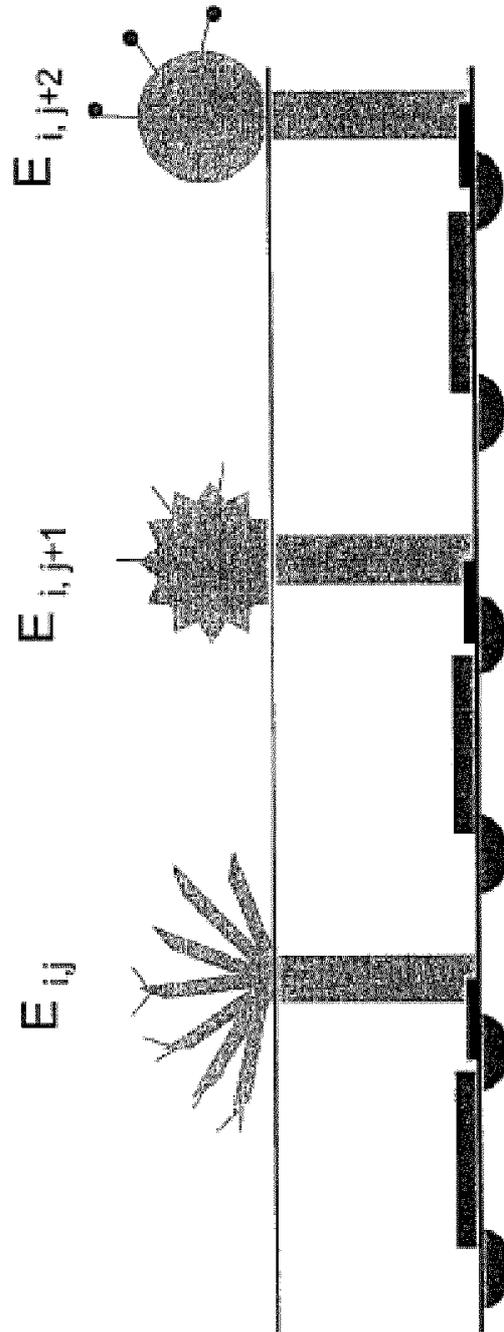
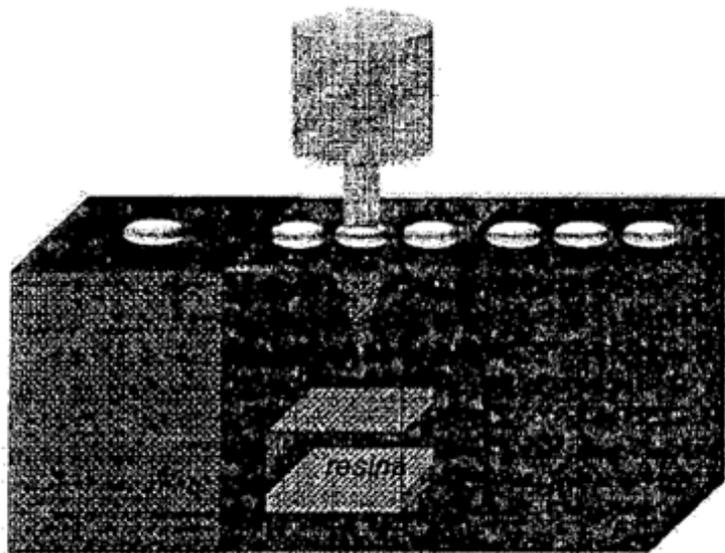
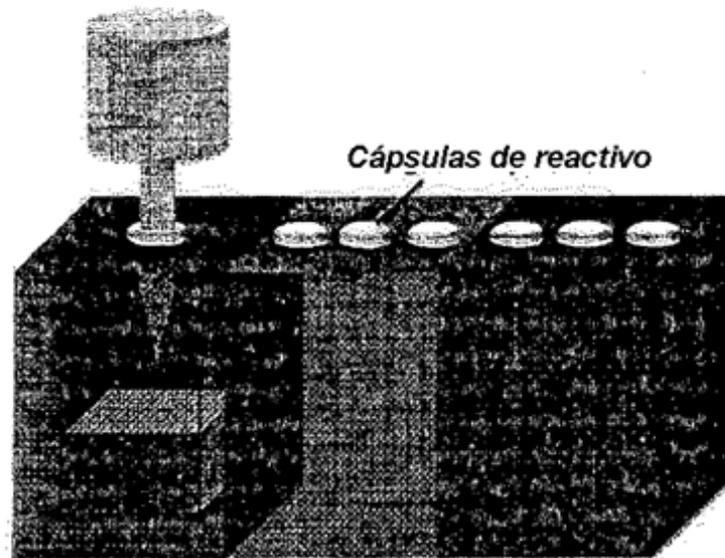


FIG.9



(continúa)

FIG. 10A

(continuación)

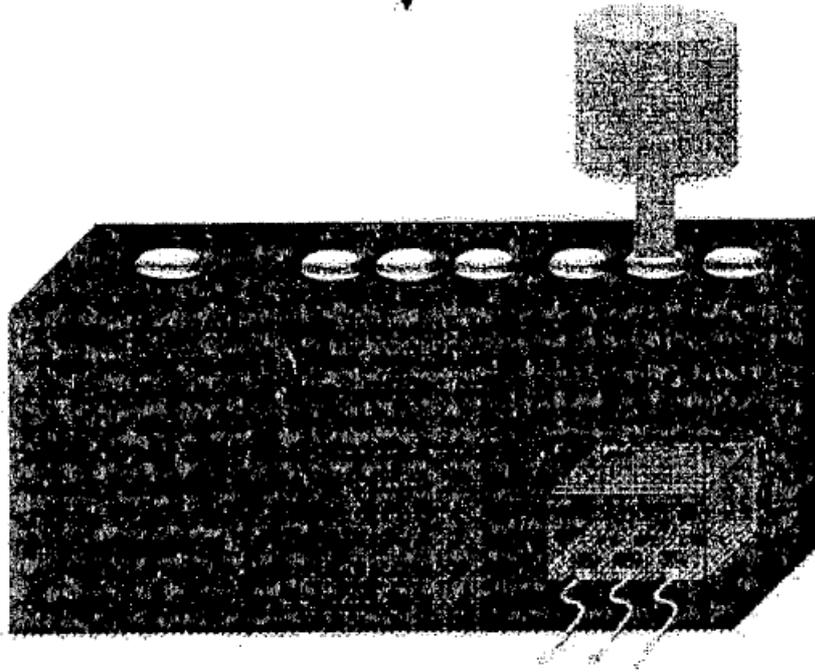


FIG. 10B

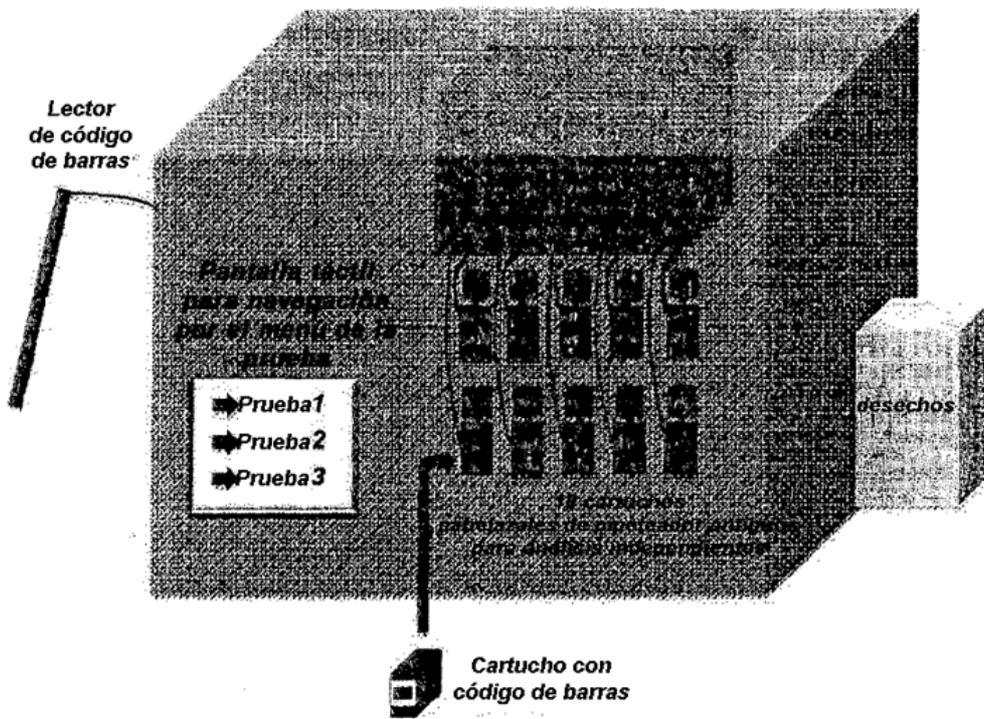


FIG. 1