

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 283**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/EP2014/064249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14737196 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 3017304**

54 Título: **Aptasensores electroquímicos con una matriz de gelatina B**

30 Prioridad:

04.07.2013 EP 13175128

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT ANTWERPEN (100.0%)
Prinsstraat 13
2000 Antwerpen, BE**

72 Inventor/es:

**BLUST, RONNY J.P.;
DARDENNE, FREDDY;
DE WAEL, KAROLIEN;
NAGELS, LUCIEN y
VAN CAMP, GUIDO F.E.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 645 283 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

Aptasensores electroquímicos con una matriz de gelatina B

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a aptasensores electroquímicos con una matriz de gelatina B, a un método de fabricación de los mismos y a su uso para determinar concentraciones de molécula diana. La presente invención se refiere además a un electrodo compuesto que combina un material polimérico y partículas eléctricamente conductoras para la detección selectiva de analitos.

Antecedentes de la invención

Las técnicas electroquímicas se reconocen como candidatos muy importantes para el desarrollo de biosensores que van a usarse en entornos no especializados. Aunque ha habido una investigación intensiva sobre biosensores amperométricos y algunos de ellos han alcanzado satisfactoriamente la fase de comercialización, ha habido pocos informes del uso de biomoléculas en sensores potenciométricos excepto por el uso de anticuerpos para la detección de bacterias, virus y proteínas marcadoras por medio de principios potenciométricos.

De Wael *et al.* en *Analytical Chemistry* (2012) 84:4921-4927, notificaron el primer uso de sensores potenciométricos para estudiar interacciones moleculares en entornos líquidos con metodología de sensogramas.

Los aptámeros han mostrado un enorme potencial en la detección selectiva de fármacos, toxinas, proteínas etc. Sassolas *et al.*, *Electroanalysis* 21(11) (2009) 1237-1250 notificaron el uso de aptámeros como elemento de biorreconocimiento en sensores potenciométricos. Cuando se combinan con transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFETS) como sistemas de lectura en sensores potenciométricos, los aptámeros parecen mejores que los anticuerpos, debido a su tamaño más pequeño.

Pilehvar *et al.* en *Anal. Chem.* (2012) 84:6753-6758, notificaron un biosensor electroquímico basado en aptámero inducido por plegamiento libre de marcador, novedoso para la detección de cloranfenicol (CAP) en presencia de sus análogos.

A pesar del hecho de que los aptámeros son químicamente más estables que las proteínas, tienen que protegerse de las nucleasas. Además, con respecto a los biosensores electroquímicos, también es necesario proteger la superficie del electrodo de la adsorción no específica y reacciones de oxidación/reducción que se producen mientras se analizan muestras reales.

El documento WO 2005/103664 da a conocer electrodos potenciométricos compuestos para la detección selectiva de analitos en una muestra que comprenden un cuerpo de detección hecho de un material polimérico, preferiblemente poli(cloruro de vinilo) plastificado, que comprende:

- partículas eléctricamente conductoras, preferiblemente polvo de grafito, cuya concentración aumenta lejos de una superficie de contacto con la muestra,

45 - moléculas de ionóforo, cuya concentración aumenta hacia la superficie de contacto con la muestra, y

- una conexión eléctrica, preferiblemente hecha de cobre, que discurre próxima a dichas partículas eléctricamente conductoras.

50 La selección de una matriz huésped apropiada para los aptámeros es uno de los principales desafíos para la inmovilización de aptámeros con el fin de mejorar las características analíticas de los aptasensores. Existe también la necesidad de sensores potenciométricos más sensibles y más específicos, en particular electrodos, para estudiar interacciones moleculares en entornos líquidos con una metodología de sensogramas.

55 **Sumario de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar sensores potenciométricos más sensibles y más específicos para determinar la concentración de una variedad de moléculas tales como vitaminas, toxinas, antibióticos, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, drogas recreativas, catecolaminas, metabolitos, proteínas, células etc. en entornos líquidos con metodología de sensogramas y métodos para usar los mismos.

65 Sorprendentemente, se ha encontrado que pueden usarse aptámeros seleccionados para formar complejos, habitualmente complejos robustos, con moléculas diana tales como vitaminas, toxinas, antibióticos, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, drogas recreativas, catecolaminas, metabolitos, proteínas y células, por ejemplo con dopamina y cloranfenicol, encapsuladas en una matriz de gelatina B hidrófila, en sensores electroquímicos para determinar las concentraciones de tales moléculas diana en entornos líquidos usando

mediciones amperométricas o mediciones potenciométricas y presentan mayor sensibilidad y selectividad para el analito diana que en ausencia de la matriz de gelatina B. Los proteínas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, interferón γ . Los fármacos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento celular tales como factor de crecimiento endotelial vascular, antígenos (por ejemplo el antígeno específico de próstata), promazina, lidocaína, ritodrina, bromhexina, clenbuterol, drofenina, atropina, salbutamol, trimipramina, flufenazina, clorfeniramina y catecolaminas tales como adrenalina, dopamina y noradrenalina. Las toxinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cadaverina y dioxina. Las drogas recreativas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cocaína y equivalentes funcionales de las mismas, y heroína.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que el uso de encapsulación en gelatina de tipo B no dificulta el uso de aptámeros en tales sensores potenciométricos y amperométricos, sino que también aumenta significativamente la sensibilidad de tales sensores, mientras que la gelatina de tipo A no presenta estas propiedades ventajosas. Esto no puede explicarse por la diferencia en las concentraciones de iones alcalinos y alcalinotérreos, puesto que las adiciones conocidas a gelatina A de concentraciones de iones alcalinos y alcalinotérreos comparables no tuvo ningún efecto sobre su comportamiento. Sin querer restringirse a la teoría, esta diferencia podría explicarse por la diferencia en la carga global sobre la gelatina, puesto que los iones de aptámeros cargados negativamente, que se repelen por la carga negativa global de la gelatina B, serían más móviles y, por tanto, se difundirían más rápidamente al electrodo en una matriz de gelatina B que en una matriz de gelatina A en la que la carga positiva global de la gelatina daría como resultado atracción, y por tanto, difusión reducida de las moléculas de aptámeros cargadas negativamente. Esta difusión aumentada también reduce el efecto de las impurezas en la gelatina.

Tan sólo como ejemplo, en el caso de un aptasensor de CAP amperométrico con un aptámero unido a una superficie de oro mediante enlaces de Au-S, por ejemplo, véase la figura 1, en ausencia de CAP los aptámeros tiolados encapsulados en gelatina B se despliegan parcialmente y tras la introducción de CAP el aptámero cambia su estructura para unirse a CAP aproximando sorprendentemente las moléculas activas redox a la superficie de oro tal como se caracteriza mediante su comportamiento electroquímico hacia la molécula diana CAP, mediciones de microscopía electrónica de barrido (SEM), voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), véase la figura 2.

Se proporciona un método novedoso de inmovilización de aptámeros sobre electrodos usando, por ejemplo electrodos recubiertos con matrices hidrófilas iónicamente conductoras, preferiblemente matrices de proteínas hidrófilas cargadas negativamente como gelatina B. Un ejemplo preferido de matrices iónicamente conductoras es gelatina B que proporciona un microentorno adecuado para la inmovilización de aptámeros, lo que facilita el intercambio de electrones entre las moléculas diana y el electrodo. La película de gelatina B puede prepararse fácilmente y es estable a lo largo de un periodo prolongado. Se ha encontrado que pueden inmovilizarse eficazmente aptámeros sobre la superficie de un electrodo de oro mediante incorporación dentro de la red porosa de gelatina B. El entorno tridimensional e hidratado de la gelatina B ayuda a aumentar la sensibilidad del sensor desarrollado manteniendo el aptámero sobre la superficie del electrodo e impidiendo que la superficie del electrodo se bloquee. Los sensores que se modifican con gelatina B y aptámeros muestran mayor sensibilidad hacia CAP en comparación con los sensores sin gelatina B como matriz protectora. Además, el sensor desarrollado es altamente estable, lo que lo convierte en una tecnología prometedora para la fabricación de aptasensores electroquímicos.

En un primer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante un sensor electroquímico basado en aptámero, en el que dicho aptámero está covalentemente unido a o quimisorbido sobre un electrodo, formando dicho aptámero un complejo, habitualmente un complejo robusto con una molécula diana y está encapsulado por una matriz de gelatina B.

En un segundo aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante un método de fabricación de un sensor electroquímico basado en aptámero para determinar una concentración de una molécula diana que comprende las etapas de: seleccionar un aptámero para formar un complejo, preferiblemente un complejo robusto con una molécula diana, por ejemplo, usando el procedimiento de SELEX; sintetizar dicho aptámero; adsorber dicho aptámero sobre o acoplar covalentemente dicho aptámero con un electrodo; y proporcionar una matriz de gelatina B para dicho aptámero sobre dicho electrodo consiguiendo de ese modo dicho sensor potenciométrico basado en aptámero.

En un tercer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante el uso del sensor electroquímico basado en aptámero producido según el segundo aspecto de la presente invención para la determinación electroquímica cuantitativa de una concentración de dicha molécula diana.

Una realización específica de la presente invención es la determinación electroquímica de una concentración de cloranfenicol mediante un sensor electroquímico del primer aspecto de la presente invención, en el que dicho aptámero es AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-AGA-TGA-CTG-AGG-GCA-CGG-ACA-GGA-GGG-CAT-GGA-GAG-ATG-GCG.

Una realización específica de la presente invención es la determinación electroquímica de una concentración de cloranfenicol mediante un sensor electroquímico del primer aspecto de la presente invención, en el que dicho

aptámero es AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-AGA-TGA-CTG-AGG-GCA-CGG-ACA-GGA-GGG-GGA-GAG-ATG-GCG-TGA-GGT-CCT-ATG-CGT-GCT-ACC-GTG-AA.

5 Otra realización específica de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante el uso para la determinación electroquímica de una concentración de dopamina mediante un sensor electroquímico del primer aspecto de la presente invención, en el que dicho aptámero es GTC-TCT-GTG-TGC-GCC-AGA-GAA-CAC-TGG-GGC-AGA-TAT-GGG-CCA-GCA-CAG-AAT-GAG-GCC-C.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un electrodo compuesto que combina un material polimérico y partículas eléctricamente conductoras para la detección selectiva de analitos, en el que dicho electrodo está recubierto con gelatina de tipo B. Tal electrodo compuesto recubierto con gelatina puede ser una parte de una célula potenciométrica de tres electrodos para la detección selectiva de analitos, que comprende además un electrodo de referencia y un contraelectrodo. Este electrodo compuesto y célula potenciométrica pueden ser para un sensor de analito *in vivo* o un sensor de analito *in vitro*.

15 Se exponen aspectos particulares y preferidos de la invención en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Pueden combinarse características de las reivindicaciones dependientes con características de las reivindicaciones independientes y con características de otras reivindicaciones dependientes según sea apropiado y no simplemente tal como se expone en las reivindicaciones.

20 Las características anteriores y otras, rasgos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

25 Definiciones

El término "biosensor electroquímico", tal como se usa en el presente documento, significa un dispositivo analítico que consiste en un material de reconocimiento biológico sensible que selecciona como diana un analito de interés y un elemento de transducción para convertir el proceso de reconocimiento en una señal amperométrica o potenciométrica.

El término "sensograma", tal como se usa en el presente documento, significa un gráfico de la señal potenciométrica frente al tiempo, cuando pasa un pulso de concentración (bloque) cuadrado por el sensor.

35 El término "metodología de sensogramas", tal como se usa en el presente documento, significa el uso del sensograma para calcular los valores de K_d para la interacción entre moléculas, por ejemplo usando el modelo de adsorción/desorción descrito en K. De Wael *et al.*, *Anal. Chemistry* 84 (2012) 4921-4927.

40 El término aptasensor electroquímico, tal como se usa en el presente documento, significa un sensor electroquímico con al menos un aptámero inmovilizado como elemento de detección.

El término aptámero, tal como se usa en el presente documento, significa una secuencia de ácido oligonucleico sintético [ADN o ARN monocatenario] que puede unirse a una diana molecular con alta afinidad y especificidad, por ejemplo debido a su flexibilidad estructural.

45 El término aptámero de ADN, tal como se usa en el presente documento que da a conocer la presente invención, significa una secuencia de ADN sintético monocatenario que se ha diseñado específicamente para reconocer y unirse a una diana molecular particular tal como una molécula pequeña, una proteína, un ácido nucleico, un célula, tejido o un organismo con alta afinidad y especificidad, por ejemplo debido a su flexibilidad que da como resultado unión a sus ligandos por medio de reconocimiento adaptativo que implica alteración conformacional. Los aptámeros de ADN son ventajosos con respecto a los aptámeros de ARN debido a la mayor estabilidad intrínseca del ADN.

50 El término iónicamente conductor, tal como se usa al dar a conocer la presente invención, significa tener una conductividad iónica mayor de 10^{-5} S cm^{-1} , prefiriéndose conductividades iónicas mayores de 10^{-4} S cm^{-1} y prefiriéndose particularmente conductividades iónicas mayores de 10^{-3} S cm^{-1} .

El término hidrófilo, tal como se usa en el presente documento, significa tener una afinidad para atraer, adsorber o absorber agua.

60 El término hidrogel, tal como se usa en el presente documento que da a conocer la presente invención, es un coloide en el que la fase dispersa (coloide) se ha combinado con la fase continua (agua) para producir un producto viscoso de tipo jalea.

65 Gelatina, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un producto obtenido mediante extracción con agua caliente (hidrólisis) de la proteína de colágeno de la piel, el hueso y los tejidos conjuntivos de animales vertebrados (bóvidos, cerdos, caballos, peces). Hay dos tipos principales de gelatina, denominados de tipo A (o

ácida) y de tipo B (o caliza/alcalina). Esta clasificación retrotrae esencialmente al pretratamiento del material de partida (colágeno) que afectará a las características de la gelatina extraída. La fuerza de gel de la gelatina se caracteriza por el número de Bloom; cuanto mayor es el número de Bloom, más fuerte es el gel.

- 5 La gelatina normalmente se hincha lentamente en agua fría (18°C) y se disuelve más rápidamente en disoluciones acuosas a 40°C y por encima.

10 El término gelatina de tipo B o gelatina B, tal como se usa en el presente documento, significa una gelatina que resulta del pretratamiento alcalino del colágeno. La gelatina de tipo B tiene normalmente concentraciones superiores de iones de calcio, potasio y sodio que la gelatina A, habitualmente en el intervalo de 900 ± 100 ppm, 330 ± 50 y 3600 ± 1400 ppm respectivamente. Otra diferencia típica de la gelatina B es el punto isoeléctrico (PIE) de 4,8 a 5,2 que es casi constante e independiente del número de Bloom. Esto contrasta con la gelatina A, en donde el PIE está vinculado al número de Bloom y oscila entre aproximadamente 7 (número de Bloom bajo, es decir 50-125) y aproximadamente 9 (número de Bloom alto, es decir 225-325).

15 **Abreviaturas**

Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de toda la descripción detallada de la presente invención con los siguientes significados.

20 CV: Voltametría cíclica.

SWV: Voltametría de onda cuadrada.

25 CAP: cloranfenicol.

DA: dopamina.

30 SELEX: "Evolución por selección de ligandos mediante enriquecimiento exponencial".

MRL: Límite máximo de residuos.

FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.

35 EIS: Espectroscopía de impedancia electroquímica.

SCE: Electrodo de calomelanos patrón.

40 SPR: Resonancia de plasmón superficial.

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (un tampón).

PIE: punto isoeléctrico.

45 FIA: Análisis de inyección de flujo.

EDC: 1-Etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

50 NHS: N-Hidroxisuccinimida.

SPE: Electrodo serigrafiado.

Descripción de realizaciones ilustrativas

55 La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos, pero la invención no se limita a los mismos sino sólo por las reivindicaciones.

60 Debe entenderse que aunque se comentan realizaciones preferidas, construcciones y configuraciones específicas, así como materiales, en el presente documento para los dispositivos y métodos según la presente invención, pueden hacerse diversos cambios o modificaciones en forma y detalle, por ejemplo pueden añadirse etapas de método o componentes de dispositivo, sin apartarse del alcance y espíritu de esta invención.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 es una representación de un aptasensor que contiene gelatina para la detección de CAP sobre un electrodo de oro (Au).

La figura 2 muestra voltamogramas de Au (1), electrodo de Gel B | APT | Au (2) en disolución de blanco y electrodo de Au (3), APT | Au (4) y Gel B | APT | Au (5) en $1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ de disolución de CAP.

- 5 La figura 3 muestra los espectros de impedancia electroquímica de electrodo de Au (1), APT | Au (2) y Gel B | APT | Au (3) en $10 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3-}$ en el intervalo de frecuencia de 0,1 a 100.000 Hz.

La figura 4 muestra imágenes de SEM del área de superficie de trabajo de un electrodo de oro tras la inmovilización en gelatina B (a), y tras la incorporación del aptámero (b).

- 10 La figura 5 muestra en (A) la dependencia de la corriente de pico redox de la concentración de CAP en un electrodo de Gel B | APT | Au, y en (B) curvas de calibración obtenidas en electrodos de APT | Au (1) y Gel B | APT | Au (2).

- 15 La figura 6 muestra en imágenes confocales de hidrogeles. (A): gelatina B pura; (B): gelatina B + agentes de acoplamiento (EDC y NHS); y (C): gelatina B + agentes de acoplamiento + aptámero fluorescente. Características confocales: píxeles 7,92; valor de rojo 5,58; la barra de escala (blanca) = 100 μm .

- 20 La figura 7 muestra registros de sensograma para DA sobre un biosensor con una membrana de gelatina B con aptámero unido covalentemente. Se inyectaron pulsos cuadrados de concentración durante 80 s. La concentración varió desde $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (curva inferior) hasta 10^{-6} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y 10^{-4} M (curva superior).

La figura 8 muestra la normalización de las curvas de la figura 7 desde tiempo 0 hasta el tiempo correspondiente a la respuesta máxima $R_{\text{máx}}$ a una inyección de DA 10^{-4} M , para mostrar la variación con la concentración.

- 25 La figura 9 muestra un gráfico de calibración de tipo Nicolskii-Eisenmann. Se obtiene la curva suave a partir de un ajuste de mínimos cuadrados no lineal a una función de Nicolskii-Eisenmann del tipo $E = E^0 + S \cdot \log (C_{\text{DA}} + C_{\text{st}})$. $E^0 = 387 \text{ mV}$, $S = 60,4 \text{ mV}$ y $C_{\text{st}} = 3,9 \times 10^{-7} \text{ M}$.

- 30 La figura 10 muestra las diferencias entre el biosensor potenciométrico basado en aptámero (línea de tendencia superior más clara) y el control negativo (línea de tendencia inferior más oscura, que contiene sólo una membrana de gelatina B) con respecto a las respuestas potenciométricas de inyecciones de DA de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ a 10^{-7} M en FIA tras la transformación a una señal relacionada con la concentración.

- 35 La figura 11 muestra las diferencias entre el biosensor potenciométrico basado en aptámero (más claro) y el control negativo (más oscuro) para inyecciones de DA 10^{-6} M sobre un sensor que contiene un aptámero (curva superior: más clara) y sobre un sensor que no contiene un aptámero (curva inferior: más oscura).

$$\frac{d(tR)}{dt}$$

- 40 La figura 12 muestra la pendiente de curvas de $\frac{d(tR)}{dt}$ frente a tR (respuesta transformada) (véase la ecuación (4) más adelante) representada gráficamente frente a las concentraciones de DA que se usaron para registrar los sensogramas.

La figura 13 muestra la fabricación de un aptasensor que contiene gelatina B basándose en un electrodo serigrafado de oro (SPE) para la detección de CAP por medio de voltametría de pulso diferencial.

- 45 La figura 14 muestra espectros de impedancia electroquímica obtenidos con el SPE desnudo de la figura 13 (figura 14a), el SPE modificado con aptámero (figura 14b) y el SPE modificado con aptámero/gelatina B (figura 14c).

- 50 La figura 15 muestra los voltamogramas de pulso diferencial de CAP acumulado (10^{-9} M) en la superficie del SPE de oro desnudo de la figura 13 (curva a), un SPE modificado con gelatina A (curva b), un SPE modificado con gelatina B (curva c), un SPE modificado con aptámero (curva d), un SPE modificado con aptámero/gelatina A (curva e) y un SPE modificado con aptámero/gelatina B (curva f) en disolución de tampón Tris.

La figura 16 muestra la influencia de la clase (figura 16A) y el tiempo (figura 16B) de acumulación de CAP sobre la señal de detección electroquímica.

- 55 La figura 17 muestra en (A) la dependencia de la corriente de pico redox de la concentración de CAP en un electrodo de Gel B | APT | SPE de Au, y en (B) curvas de calibración obtenidas en electrodos de APT | SPE de Au (1) y Gel B | APT | SPE de Au (2).

60 Electrodo

El aptasensor electroquímico según la presente invención requiere al menos un electrodo de detección, también denominado electrodo de trabajo. Un dispositivo electroquímico convencional es una configuración de célula de tres electrodos que comprende un electrodo de referencia (tal como, pero sin limitarse a, un electrodo de calomelanos o

un electrodo de plata) y un contraelectrodo. Los electrodos de detección adecuados incluyen electrodos de oro, electrodos de carbono vítreo, un metal inerte en un material compuesto iónicamente conductor y electrodos compuestos que combinan un material polimérico y partículas eléctricamente conductoras. El electrodo puede obtenerse mediante cualquier proceso de fabricación conocido en la técnica, incluyendo la técnica de serigrafía para producir un SPE.

El documento WO 2005/103664, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia, da a conocer electrodos potenciométricos compuestos adecuados para la detección selectiva de analitos según la presente invención, siempre que dichos electrodos estén recubiertos con una matriz hidrófila iónicamente conductora, preferiblemente cargada negativamente tal como gelatina de tipo B o un equivalente de la misma, por ejemplo en forma de una capa fina (escala de μm) o ultrafina (escala de nm). La gelatina B para realizar este aspecto de la invención puede tener cualquier número de Bloom, incluyendo el intervalo bajo 50-125, el intervalo medio 125-225 y el intervalo alto 225-325.

Este electrodo compuesto, y una célula potenciométrica que lo incluye, puede ser para un sensor de analitos *in vivo* o un sensor de analitos *in vitro*.

Sensor electroquímico basado en aptámero

En un primer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante un sensor electroquímico basado en aptámero, en el que dicho aptámero está covalentemente unido a o quimisorbido sobre un electrodo, dicho aptámero se selecciona para formar un complejo, habitualmente un complejo robusto con una molécula diana y está encapsulado por una matriz hidrófila iónicamente conductora, preferiblemente cargada negativamente tal como gelatina B o un equivalente de la misma. La gelatina B para realizar este aspecto de la invención puede tener cualquier número de Bloom, incluyendo el intervalo bajo 50-125, el intervalo medio 125-225 y el intervalo alto 225-325.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, dicho aptámero se selecciona con el procedimiento de SELEX, o puede conocerse de la bibliografía.

Según otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, dicha molécula diana se selecciona del grupo que consiste en vitaminas, antibióticos, toxinas, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, drogas recreativas (por ejemplo, cocaína), catecolaminas, metabolitos, proteínas y células.

Según otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, dicho aptámero es 5'-SH-(CH₂)₆-AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-AGA-TGA-CTG-AGG-GCA-CGG-ACA-GGA-GGG-CAT-GGA-GAG-ATG-GCG-3' y está destinado a la detección de CAP.

Según otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, dicho aptámero es 5'-GTC-TCT-GTG-TGC-GCC-AGA-GAA-CAC-TGG-GGC-AGA-TAT-GGG-CCA-GCA-CAG-AAT-GAG-GCC-C-espaciador-NH₂-3' y está destinado a la detección de dopamina.

Método de fabricación de un sensor electroquímico

En un segundo aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante un método de fabricación de un sensor electroquímico basado en aptámero para determinar una concentración de una molécula diana que comprende las etapas de:

- seleccionar un aptámero para formar un complejo, preferiblemente un complejo robusto, con una molécula diana, por ejemplo usando el procedimiento de SELEX;

- sintetizar dicho aptámero;

- adsorber dicho aptámero sobre o acoplar covalentemente dicho aptámero con un electrodo; y

- proporcionar una matriz hidrófila iónicamente conductora, preferiblemente cargada negativamente, preferiblemente gelatina de tipo B o un equivalente de la misma, para dicho aptámero sobre dicho electrodo.

Según una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, dicha molécula diana se selecciona del grupo que consiste en vitaminas, antibióticos, toxinas, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, drogas recreativas, catecolaminas, metabolitos, proteínas y células.

Uso del sensor electroquímico basado en aptámero

En un tercer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se consigue mediante el uso del sensor electroquímico basado en aptámero según el primer aspecto de la presente invención o producido según el segundo

aspecto de la presente invención para la determinación electroquímica de una concentración de una molécula diana.

Según una realización preferida del tercer aspecto de la presente invención, dicha determinación electroquímica es una determinación potenciométrica.

5 Según otra realización preferida del tercer aspecto de la presente invención, dicha determinación electroquímica es una determinación amperométrica.

Ejemplos

10 PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES

Se obtuvieron promazina, lidocaína, ritodrina y cloranfenicol (CAP) de Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica) y se obtuvo dopamina (DA) de Fluka. Para disolver estos fármacos, se usaron pequeñas cantidades de etanol (Fluka, calidad analítica).

Se obtuvo MES de Acros Organics (Eupen, Bélgica).

20 Se obtuvieron los agentes de acoplamiento EDC y NHS de Sigma-Aldrich.

Todos los productos químicos eran de calidad de reactivo analítico.

La gelatina de tipo B (Gel, PIE = 5, fuerza de Bloom = 257), aislada de piel bovina mediante el procedimiento alcalino, la proporcionó Tessenderlo Chemie (Bélgica).

25 Tampones

Tampón Tris que contiene:

NaCl $100 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

Tris HCl $20 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

MgCl₂ $2 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

KCl $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

CaCl₂ $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

30 con un pH de 7,6 obtenido de VWR (Bélgica) y usado como disolución de tampón de unión.

Aptámeros

Secuencia de aptámero de unión (5'-SH-(CH₂)₆-AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-AGA- de Eurogentec.
TGA-CTG-AGG-GCA-CGG-ACA-GGA-GGG-CAT-GGA-GAG-ATG-GCG-3')

Un aptámero de 58 meros seleccionado específicamente para detectar DA aptámero sintetizado por
(Zheng *et al.*, 2011) (5'-GTC-TCT-GTG-TGC-GCC-AGA-GAA-CAC-TGG-GGC- Integrated DNA Technologies
AGA-TAT-GGG-CCA-GCA-CAG-AAT-GAG-GCC-C-espaciador-NH₂-3') (Leuven, Bélgica)

35 Mediciones voltamétricas

Se registraron las mediciones voltamétricas mediante un potencióstato μ -AutolabII controlado por el paquete de software NOVA 1.7 (Metrohm, Países Bajos). Se realizaron las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) usando un módulo analizador de la respuesta de frecuencia. Se usó un disco incrustado en electrodo de oro ($\Phi = 1,6 \text{ mm}$) como electrodo de trabajo. Se usaron un electrodo de calomelanos saturado (SCE) y grafito como electrodo de referencia y auxiliar, respectivamente.

45 Investigación morfológica

Se realizó la investigación morfológica de la superficie del electrodo usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300 (SEM) y se realizó la microscopía confocal localizando tintes Cy3 con una unidad confocal de barrido láser Nikon C1 (D-eclipse-C1, Nikon, Melville, NY) equipada con una línea de láser de argón y de helio/neón acoplada sobre un microscopio vertical (Eclipse E600, Nikon, Melville, NY) en combinación con un objetivo Planfluor de 10x (NA: 0,50) fabricado por Nikon (Melville, NY).

FIA

Se realizaron los registros de FIA usando una bomba LC-10ADvp (Shimadzu Liquid Chromatography) y un inyector de muestras externo de seis orificios Rheodyne 7125 (VICI, EE.UU.). Se usó un bucle de muestra de 1,00 ml para generar pulsos cuadrados de concentración para el registro de sensogramas en condiciones de FIA. Los tubos de PEEK (Alltech, EE.UU.) del bucle de inyección y las conexiones de inyector-detector tenían un diámetro interno de 0,18 mm. La velocidad de flujo era de 1,00 ml min⁻¹. Se mantuvieron los efectos de ensanchamiento de picos de Poiseuille a un mínimo usando conexiones de inyector-detector cortas (150 mm). Para evitar tales efectos al final del pulso cuadrado de concentración, se cambió el inyector de inyección a carga tras 80 s (mucho antes de que el volumen de bucle de muestra se vaciara totalmente).

Esto da como resultado un pulso estrecho con ensanchamiento insignificante tanto al inicio como al final del pulso. El eluyente era MES 10,0 mM, pH 7,0.

La salida de la columna se dirigió perpendicularmente hacia la membrana sensible del electrodo de alambre recubierto en una célula de flujo de "chorro de pared". La distancia desde la salida de los tubos de la CL hasta el electrodo era de 0,10 mm.

Preparación del electrodo amperométrico para el ejemplo 1

Antes de la modificación de la superficie, se pulió mecánicamente el electrodo de oro con una suspensión de alúmina de 1,0 y 0,05 µm por separado, seguido por aclarado concienzudo con agua doblemente destilada. Entonces se lavó con ultrasonidos en agua doblemente destilada, luego etanol durante 15 minutos. Se aclaró el electrodo con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, se limpiaron los electrodos electroquímicamente mediante barrido de potencial entre -1,2 y 1,2 V hasta que se obtuvo un barrido volumétrico cíclico reproducible.

Para inmovilizar el aptámero tiolado de unión a CAP sobre la superficie de oro, se hicieron gotear 3x 10⁻⁶ l de una disolución de 2,5 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ de aptámero y gelatina de tipo B al 5% (p/p) sobre una superficie de oro recién alisada, y entonces se evaporó el disolvente a 4°C durante 6 horas. La superficie de contacto de detección final estaba lista tras aclarar con disolución de tampón.

Preparación del electrodo potenciométrico para el ejemplo 2

El electrodo indicador está hecho de un cilindro de PVC. Contiene un electrodo de sustrato cilíndrico (3,0 mm de diámetro x 1,0 mm de longitud), que es un material compuesto de grafito/PVC electrónicamente conductor. El electrodo de sustrato compuesto se pulió con una rejilla Carbimet 600 (Buehler Ltd, EE.UU.).

Para recubrir el hidrogel gelatinoso sobre el electrodo, se pusieron 10,0 µl de una mezcla, que consiste en 25,0 mg de gelatina B disuelta en 0,50 ml de MES 10,0 mM (5% p/v) pH 7,0 a 40°C, sobre la superficie del electrodo con una micropipeta y se expuso al aire durante 2 horas a 4°C (secado de las gotas).

Se usó el procedimiento de acoplamiento de EDC-NHS para unir de manera covalente el aptámero aminado de unión a DA al hidrogel de gelatina B (que contiene grupos carboxilo). Tras añadir 20 µl de los agentes de acoplamiento (15,32 mg de EDC y 2,32 mg de NHS disueltos en 100 µl de tampón MES 10,0 mM a pH 7,0) al hidrogel recubierto durante 2 horas, se aplicaron 2 x 4 µl del aptámero (10⁻⁴ M) durante 1 hora. Tras la evaporación durante 2 horas a 4°C, se mantuvieron los electrodos en tampón de ejecución MES 10,0 mM, pH 7,0 durante al menos 3 horas hasta que se obtuvo un nivel inicial estable. Se midieron los sensogramas de cada analito en 3 electrodos, y se usaron cuando la reproducibilidad entre electrodos era mejor del 10%. Se registraron al menos 3 sensogramas (inyecciones) en cada electrodo tras el acondicionamiento y la estabilización en el tampón de ejecución.

Se midió el potencial de membrana frente a un electrodo de referencia Orion 800500Ross[®] (Ag/AgCl) usando un amplificador casero de alta impedancia (10¹³ Ω). Se registraron las señales de detección en una estación de datos compuesta por un ordenador equipado con un convertidor 6013 NI DA y software basado en LabVIEW 7 (National Instruments, EE.UU.). La constante de tiempo de RC global del amplificador de alta impedancia más la estación de datos se fijó a 0,2 s.

EJEMPLO 1 - Aptasensor de CAP electroquímico

Morfología

Se investigó la morfología de los electrodos preparados mediante mediciones de SEM (véase la figura 4). La imagen de SEM de un electrodo de oro ensamblado con gelatina se muestra en la figura 4(a), observándose una estructura regular y porosa. La película de gelatina era compacta, lisa y homogénea sin estructura granulada y porosa, mostrando que se formó una matriz ordenada. Sin embargo, apareció una superficie rugosa, similar a una esponja e

irregular cuando se añadieron aptámeros a la matriz, indicando un cambio de morfología claro debido a las interacciones.

Comportamiento electroquímico

5 Se realizaron mediciones de voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) para caracterizar un electrodo de APT | Au y un electrodo de Gel B | APT | Au tal como se muestra en las figuras 2 y 3 respectivamente.

10 Mientras que en un electrodo de oro desnudo no se observó un pico redox obvio en la característica de CV (indicada por 3 en la figura 2), se observó un pico de reducción grande en la característica de CV (indicada por 4 en la figura 2) en APT | Au. Con la encapsulación con la gelatina de tipo B, la respuesta (indicada por 5 en la figura 2) aumentó debido al aumento de la capacidad de transferencia de electrones del electrodo modificado. Una película de gelatina de tipo B actúa como tanto un polímero de soporte para aptámeros como un medio de reacción. Por tanto, se produjo transporte de masa de sustrato dentro y fuera de la capa de hidrogel al tiempo que se retuvieron los aptámeros en la matriz y sobre la superficie del electrodo.

Las características de EIS mostradas en la figura 3 demuestran que la resistencia a la transferencia de electrones aumentó en el siguiente orden: electrodo de Au (indicado por 1 en la figura 3), electrodo de APT | Au (indicado por 2 en la figura 3) y electrodo de Gel B | APT | Au (indicado por 3 en la figura 3). Esto se atribuye al hecho de que el ADNmc con cargas negativas en su estructura principal de fosfato produce una fuerza repulsiva electrostática frente a los aniones de $[\text{Fe}-(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e impide que los electrones alcancen la superficie del electrodo. El aumento en la resistencia a la transferencia de electrones indica que los aptámeros están inmovilizados satisfactoriamente sobre la superficie del electrodo. En el caso de un electrodo de Gel B | APT | Au, una barrera adicional de gelatina cargada negativamente ha aumentado la resistencia a la transferencia de electrones, lo que da como resultado un semicírculo más grande. Esto demuestra la inmovilización satisfactoria de APT sobre el electrodo y el efecto de bloqueo de la capa de gelatina sobre moléculas activas redox inespecíficas. También se estudiaron las características de CV del aptasensor resultante a diferentes velocidades de barrido. En presencia de moléculas de CAP, una dependencia lineal de la corriente de pico de la velocidad de barrido implicó que el proceso electroquímico era un proceso confinado a la superficie. Se investigó la estabilidad a corto plazo del aptasensor a lo largo de voltamogramas sucesivos. La corriente de respuesta del electrodo con aptámero inmovilizado y encapsulación en gelatina disminuyó en aproximadamente el 3,2% con respecto a su respuesta inicial y la desviación estándar relativa (D.E.R.) era del 1,8%, mientras que el electrodo sólo con aptámero inmovilizado mostró una disminución del 20,2% y una D.E.R. del 3,5%. La alta estabilidad podría atribuirse a la alta estabilidad química de la gelatina y los aptámeros, que mejoran ambos la estabilidad del aptasensor. La buena estabilidad del Gel B | APT | Au puede atribuirse a una excelente biocompatibilidad y al microentorno estabilizante alrededor de los aptámeros proporcionado por los sensores de gelatina modificados.

A partir de la figura 5 (A), puede observarse que la corriente de pico aumenta con la concentración de CAP creciente. Hubo una relación lineal entre la corriente de pico y la concentración de CAP en el intervalo desde $2,1 \times 10^{-9}$ hasta $5,2 \times 10^{-7}$ mol l⁻¹. La ecuación de regresión lineal era $I = -1,6 C + 2,7$, (las unidades para C y I son $\times 10^{-9}$ M y $\times 10^{-7}$ A respectivamente) y el coeficiente de correlación es de 0,9684. El límite de detección era de $1,2 \times 10^{-9}$ mol l⁻¹ basándose en la interpolación con el punto en donde la corriente difiere de la corriente de fondo para tres desviaciones estándar calculadas a partir de las corrientes obtenidas para tres electrodos diferentes. En el caso de electrodos de APT | Au (sin gelatina como matriz protectora), se encontró que el límite de detección era de $1,6 \times 10^{-9}$ y el intervalo lineal era de entre $1,6 \times 10^{-9}$ y $4,2 \times 10^{-7}$ mol l⁻¹ que demostró los rendimientos mejorados del electrodo de Gel B | APT | Au con respecto al electrodo de APT | Au. La sensibilidad potenciada y el intervalo dinámico más amplio podrían deberse a la capacidad de la gelatina B para producir difusión de analitos más fácilmente e impedir que se fuguen aptámeros y, lo más importante, impedir que la superficie del electrodo produzca adsorción no deseada. Una comparación de las curvas de calibración para los dos electrodos [véase la figura 5(B)] muestra que la sensibilidad (pendiente) del electrodo de Gel B | APT | Au era mayor que la del electrodo de APT | Au.

Se investigó el ensayo de esta diana en muestras reales detectando CAP en una muestra de leche de vaca desnatada. Se empleó el método de adición convencional para evaluar la aplicabilidad del aptasensor desarrollado. El pico de reducción de CAP aumentado en comparación con la corriente de reducción obtenida en un electrodo con aptámero inmovilizado sin gelatina como matriz protectora se produjo en un electrodo de Gel B | APT | Au en el intervalo de potencial esperado, lo que indicó una sensibilidad potenciada del electrodo de Gel B | APT | Au desarrollado. Se obtuvieron valores de recuperación de entre el 87% y el 94%, lo que indica la aplicabilidad del aptasensor desarrollado para la detección de CAP en muestras biológicas reales.

EJEMPLO 2 - Aptasensor de DA electroquímico

Morfología

65 Se examinó la unión covalente de los oligonucleótidos aminados a la gelatina B, que contiene grupos carboxilo, mediante microscopía confocal. Para excluir la señal de fondo, se comprobaron como blancos gelatina B pura y

gelatina B tratada con agentes de acoplamiento (EDC y NHS). No se observó señal en los últimos casos (figura 6A y 6B). Esto está en contraste con la señal fluorescente brillante observada para un hidrogel tratado con un aptámero aminado marcado fluorescentemente (Cy3) (figura 6C). Incluso tras tres horas de uso en la configuración potenciométrica de FIA, la fluorescencia intensa persistió. Este experimento confirmó el acoplamiento covalente de los oligonucleótidos aminados a la gelatina B.

Comportamiento electroquímico

Tras comprobar el acoplamiento del aptámero al biopolímero tal como se describió anteriormente, se colocaron los electrodos en una configuración potenciométrica de FIA. Tras la inyección de un analito en el sistema de FIA, la salida de voltaje varía con el tiempo, debido a la cinética de formación de complejos entre DA y el aptámero anti-DA. Una molécula de analito cargada positivamente tal como DA tiene la tendencia a adsorberse al recubrimiento del sensor, si está presente un aptámero de unión a DA en este material. Esto provoca un cambio del potencial de superficie, que es la señal analítica. En su representación más sencilla, se espera que la superficie de contacto eluyente/gelatina B tenga una distribución de tipo Boltzmann de cargas positivas ya que la gelatina B se comporta como un material de tipo intercambio catiónico en las condiciones dadas.

Se inyectaron las moléculas diana como pulsos cuadrados de concentración, comparables con los pulsos de bloque en SPR. Los sensogramas (respuestas de mV en función del tiempo) obtenidos se muestran en la figura 7. El uso de un método hidrodinámico y pulsos cuadrados de concentración tiene la ventaja de que pueden obtenerse tanto curvas de adsorción como de desorción y calcularse la cinética de adsorción/desorción.

La figura 7 muestra la respuesta potenciométrica de DA sobre el sensor que contiene el aptámero específico de DA. Las alturas de respuesta (mV obtenidos a los valores de meseta tras 80 s de inyección) son dependientes de la concentración: véanse las figuras 7 y 9. Tras la normalización de las curvas desde tiempo cero hasta $R_{m\acute{a}x}$. (véase la figura 8), queda claro que concentraciones superiores de DA muestran una cinética de “activación” más rápida que concentraciones inferiores. Esta diferencia dependiente de la concentración en la cinética de adsorción (parte ascendente de la curva) es típica de experimentos de SPR.

Si las respuestas máximas (en mV) se representan gráficamente frente al logaritmo de la concentración, se obtiene la curva de Nicolskii-Eisenmann típica (véase la figura 9). A valores de concentración superiores (resultados no mostrados), comienza a producirse saturación de la señal (alcanzando un valor de meseta). Esto se atribuye al hecho de que se usó una concentración de aptámero relativamente baja (10^{-4} M) para unirse al hidrogel. Se usaron, por tanto, concentraciones de DA por debajo de 5×10^{-5} M en estos experimentos.

Se transformó la ecuación de Nicolskii-Eisenmann (véase la figura 9) en la ecuación 1, para obtener una señal de salida dependiente de la concentración (“respuesta transformada”, tR) del sensor.

$$tR = (10^{mV/S} - 1) \cdot Cst \quad (1)$$

Se compararon los valores de $R_{m\acute{a}x}$. transformada (ecuación 1) de los sensores potenciométricos con aptámero acoplado con los valores obtenidos con electrodos que no tenían un aptámero acoplado al hidrogel: véase la figura 9. Se sometieron a prueba cuatro electrodos, cada uno con 3 inyecciones. Se midieron señales de cinco a diez veces superiores con los electrodos que contenían aptámeros. No sólo la altura, sino también la forma del sensograma era diferente al comparar membranas de gelatina B con y sin aptámero acoplado (véase la figura 9). Los electrodos de gelatina B que contenían aptámero producían siempre curvas que descendían lentamente. Esto es una prueba adicional del reconocimiento por el aptámero de la molécula diana. Curvas que descienden lentamente significan cinética de desorción lenta. Esto produce valores de k_{off} pequeños, dando como resultados valores de $K_{asociación}$ altos: véase la ecuación. 2.

$$K_{asociación} = \frac{K_{on}}{K_{off}} \quad (2)$$

Las figuras 9, 10 y 11 muestran claramente que los sensores basados en aptámero son muy sensibles, siendo las respuestas al menos un factor de 800 mayores (en una base de mV) que las de los electrodos basados en PVC clásicos.

Determinación de la constante de asociación, K_{as} , entre aptámero específico de DA y DA

Se usó la “metodología de sensogramas” definida anteriormente. Se registraron sensogramas a diferentes concentraciones de analito. Las partes ascendentes de los sensogramas se muestran en mV en la figura 8. Se convirtió en primer lugar el eje y de mV en estos sensogramas en una respuesta dependiente de la concentración, denominada respuesta transformada (véase la ecuación 1). La respuesta transformada (tR) del sensor estaba

relacionada linealmente con el número de sitios de adsorción ocupados, $R_{ocupados}$, es decir: respuesta transformada

$$(tR) \sim R_{ocupados}$$

- 5 La velocidad de adsorción de DA, v_{on} , puede considerarse como una velocidad de reacción que es de primer orden en la concentración de DA en el volumen de la disolución ($c_{analito}$) y en la concentración de sitios de adsorción libres (o aptámeros) en la superficie del sensor: $R_{máx.} - R_{ocupados}$. Puede describirse mediante una ecuación de velocidad de la forma de la ecuación 3:

$$v_{on} = \frac{dR_{ocupados}}{dt} = K_{on} \cdot c_{analito} (R_{máx.} - R_{ocupados}) - k_{off} R_{ocupados} \quad (3)$$

- 10 Esta ecuación puede reescribirse sustituyendo la concentración de moléculas de DA, que se adsorben sobre (u "ocupaban") la superficie derivatizada con aptámero, $R_{ocupados}$, por la respuesta transformada del sensor, tR , y reemplazando $R_{máx.}$ por $tR_{máx.}$. Esto produce la ecuación 4:

$$\frac{d(tR)}{dt} = k_{on} \cdot c_{analito} \cdot d(tR)_{máx.} - (k_{on} \cdot c_{analito} + k_{off}) \cdot tR \quad (4)$$

- 15 Se representó gráficamente la primera derivada de la parte hacia arriba ascendente de la respuesta transformada $\frac{d(tR)}{dt}$ con el tiempo frente a la respuesta transformada, tR . Esto produjo una línea recta con una pendiente igual a $-(K_{on} \cdot c_{analito} + k_{off})$. La representación gráfica de esta pendiente frente a $c_{analito}$ para el conjunto de concentraciones de analito (DA) produjo una gráfica a partir de la que se calcularon k_{on} y k_{off} . La curva de "pendiente" frente a concentración de DA obtenida se facilita en la figura 12, que confirma que el modelo usado para la metodología de sensogramas puede aplicarse. Por primera vez se obtuvieron datos fiables de interacción molecular para la interacción de una biomolécula (el aptámero) con su molécula diana, por medio de un principio de sensor potenciométrico.

25 Detección específica con aptámero específico de DA

- 30 Para comprobar la especificidad del aptámero específico de DA, se sometieron a prueba dopamina y otros tres fármacos básicos (ritodrina, lidocaína y promazina) en los electrodos recubiertos con gelatina B con y sin el aptámero. Estos fármacos catiónicos lipófilos tienen respuestas mucho mejores en sensores potenciométricos basados en PVC que DA. Los sensores basados en gelatina B son bastante insensibles hacia estos tres otros fármacos, no habiendo mejora en la sensibilidad para estos compuestos cuando se acopló el elemento de biorreconocimiento de aptámero a la gelatina B, mientras que DA mostró un aumento muy claro en $R_{máx.}$, tal como se dio a conocer anteriormente. La tabla 1 proporciona los valores de $R_{máx.}$ (en mV) de inyecciones de 10^{-5} M de diferentes moléculas de analito para diferentes electrodos potenciométricos.

35 Tabla 1

Recubrimiento	Respuesta de dopamina en mV	Respuesta de ritodrina en mV	Respuesta de lidocaína en mV	Respuesta de promazina en mV
Gelatina B	9,46	1,83	2,88	3,66
Gelatina B + aptámero específico de DA	92,86	1,57	1,57	2,44

EJEMPLO 3 - Aptasensor de CAP electroquímico basado en un electrodo de oro SPE

- 40 Se registraron mediciones electroquímicas mediante un potenciostato Autolab controlado por el paquete de software NOVA 1.10 (Metrohm, Países Bajos). Se realizó la investigación morfológica de la superficie del electrodo en un microscopio electrónico de barrido Fei Quanta 250 FEG (SEM). Se adquirió el SPE de Metrohm y estaba hecho de un electrodo de trabajo de oro, un contraelectrodo de carbono y un electrodo de referencia de plata.

- 45 A menos que se especifique otra cosa, los productos químicos y materiales son los mismos que en los ejemplos previos.

La figura 13 muestra esquemáticamente la construcción del aptasensor de CAP electroquímico basado en gelatina

de tipo B. En ausencia de CAP, el aptámero tiolado encapsulado en gelatina B está parcialmente desplegado pero unido a la superficie de oro mediante un enlace de Au-S. Cuando se introduce CAP en el SPE modificado, el aptámero cambia su estructura para unirse a CAP aproximando las moléculas activas redox a la superficie del electrodo dando como resultado una transferencia de electrones potenciada.

5 La primera etapa es el pretratamiento electroquímico y la biomodificación del electrodo serigrafiado de oro (SPE). Antes de la inmovilización del aptámero de ADN tiolado, se lleva a cabo un pretratamiento amperométrico de múltiples pulsos de la superficie de oro en una disolución agitada de $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ de H_2SO_4 , 10 mmol l^{-1} de KCl. Se aplicó la siguiente secuencia de pulso de potencial triple: $-0,3 \text{ V}$ durante $3,0 \text{ s}$; $0,0 \text{ V}$ durante $3,0 \text{ s}$ y $+1,0 \text{ V}$ durante
10 $1,5 \text{ s}$ (15 ciclos). Entonces se expuso la superficie del electrodo de trabajo de oro de SPE a la mezcla de aptámero ($5 \text{ }\mu\text{M}$) y la disolución de gelatina de tipo B (5% p/v) en tampón Tris (pH 7,6). El porcentaje de la incorporación era del 70 : 30% v/v a partir de la mezcla de aptámero : gel. Se permite que avance la quimisorción (aproximadamente 4 horas) mientras que los electrodos se almacenan en una cámara húmeda para proteger la disolución de la evaporación. La etapa de inmovilización va seguida por la adición de disolución de CAP (una gota de $100 \text{ }\mu\text{l}$) sobre
15 la parte superior del SPE de oro modificado durante 25 minutos. Antes de la medición electroquímica, se lavó suavemente el electrodo con $100 \text{ }\mu\text{l}$ de tampón Tris. Entonces, se realiza la voltametría de pulso diferencial en disolución de tampón Tris (pH 7,6).

Los datos medidos de EIS (figura 14) muestran que la resistencia a la transferencia de electrones aumenta en el
20 siguiente orden: SPE desnudo (figura 14a), SPE modificado con aptámero (figura 14b) y SPE modificado con aptámero/gelatina B (figura 14c). El aumento en la resistencia a la transferencia de electrones indica que los aptámeros están inmovilizados satisfactoriamente sobre la superficie del electrodo. En el caso de un SPE de aptámero/GelB, una barrera adicional de gelatina cargada negativamente ha aumentado la resistencia a la transferencia de electrones, lo que da como resultado un semicírculo más grande. Esto demuestra la inmovilización
25 satisfactoria del aptámero sobre el electrodo de SPE y el efecto de bloqueo de la capa de gelatina B frente a moléculas activas redox inespecíficas.

Con el fin de investigar el papel de la matriz de gelatina B en la eficacia del aptasensor, se seleccionó la voltametría de pulso diferencial (DPV) como técnica sensible. La figura 15 presenta los voltamogramas de pulso diferencial de CAP acumulado (10^{-9} M) en la superficie de SPE de oro desnudo (curva a: $0,00 \text{ }\mu\text{A}$), SPE modificado con gelatina A (curva b: $0,67 \text{ }\mu\text{A} \pm 0,02$), SPE modificado con gelatina B (curva c: $0,801 \pm 0,015 \text{ }\mu\text{A}$), SPE modificado con aptámero (curva d: $1,22 \pm 0,06 \text{ }\mu\text{A}$), SPE modificado con aptámero/gelatina A (curva e: $0,86 \pm 0,04 \text{ }\mu\text{A}$) y SPE modificado con aptámero/gelatina B (curva f: $2,71 \pm 0,09 \text{ }\mu\text{A}$) en disolución de tampón Tris. Las corrientes indicadas reflejan la corriente de pico obtenida en el voltamograma y pueden explicarse como la reducción irreversible del grupo nitro (NO_2) presente en moléculas de CAP, con formación de hidroxilamina (NHOH). Tal como puede observarse, no hay
35 señal de CAP en un electrodo de oro desnudo. Significa que no tiene lugar quimisorción tras 25 minutos de acumulación de CAP en la superficie de SPE de oro desnudo (curva a). Tras la inmovilización de gel en SPE, aparece la señal de DPV para CAP acumulado (curvas b y c). Sin embargo, SPE modificado con gelatina B muestra una señal de corriente mayor que gelatina A. Tras la modificación del SPE mediante el aptámero, la corriente de la señal de DPV aumentó (curva d), confirmando la capacidad del aptámero sintetizado para capturar la molécula diana. La combinación de aptámero y gelatina A no tuvo efecto positivo sobre la eficacia del sensor (curva e) mientras que la incorporación de aptámero y gelatina B mostró una respuesta muy buena hacia la molécula diana (curva f) al potencial al que se esperaba la reducción del grupo nitro, es decir $-0,7 \text{ V}$. Además, hay una onda de preoxidación alrededor de $-0,45 \text{ V}$ que muestra la presencia de productos intermedios en reacciones redox de CAP.

Un aumento drástico en la altura de DPV tras el mezclado de aptámero y gelatina B se debe probablemente a un aumento en la cinética de transferencia de carga que resulta de la mejor reactividad del aptámero hacia la diana. Debido a la incorporación del aptámero en la matriz de gelatina B y su biocompatibilidad, la mayoría de los sitios del aptámero permanecerán activos durante la formación de la monocapa autoensamblada a partir del aptámero tiolado.
40 Puesto que la mezcla de aptámero/gelatina B muestra una señal de DPV significativamente mayor que aptámero/gelatina A, se espera que la biocompatibilidad de gelatina B hacia aptámeros sea mejor. Debido a las interacciones físicas entre las cadenas de aptámero y la gelatina (por ejemplo fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno entre aminoácidos), GelB es un buen ejemplo de un hidrogel físicamente reticulado. Por tanto, los dominios o grupos hidrófilos que se hidratan hacen que GelB sea una matriz adecuada para el atrapamiento del
45 aptámero.

Para obtener los resultados más sensibles, se optimizaron parámetros tales como la clase (figura 16A) y el tiempo (figura 16B) de la etapa de acumulación de CAP para la detección electroquímica de CAP. Se investigaron tres enfoques para acumular CAP sobre la superficie de los electrodos de aptámero/GelB. En primer lugar, se sumergió el SPE modificado en la disolución de CAP mientras que se agitaba la disolución muy rápido (i). En segundo lugar, se agitó lentamente la disolución de CAP (ii). En tercer lugar, se mantuvo horizontalmente el SPE modificado con $100 \text{ }\mu\text{l}$ de la disolución de CAP sobre el mismo (gota húmeda, iii). Esto último demostró ser lo mejor para acumular CAP debido a la mejor oportunidad de interacción entre CAP, aptámero, GelB y la superficie del electrodo (figura 16A). Además, se investigó el tiempo de acumulación de CAP sobre la superficie del SPE modificado con
60 aptámero/GelB durante 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos. Cuando el tiempo de acumulación aumentó desde 10 hasta
65

25 minutos, la señal del CAP acumulado se potenció. Después de eso, no se observaron cambios obvios en la corriente de reducción de DPV de CAP. Por tanto, se seleccionaron 25 minutos como tiempo optimizado (figura 16B).

- 5 La figura 17A representa el rendimiento de diagnóstico del aptasensor. Para estudiar el papel de la gelatina B como matriz en función del biosensor, se investigó la señal de reducción de CAP en el SPE modificado con aptámero/gelatina B. Puede observarse que la corriente de pico aumenta con un aumento de la concentración de CAP (figura 17B). La corriente de pico muestra una relación lineal con el log de la concentración de CAP en el intervalo desde 0,10 hasta 10,0 pico mol l⁻¹ (recuadro de la figura 17B). El límite de detección calculado es de 2,09 x 10⁻¹⁴ mol l⁻¹ basándose en la interpolación con el punto en donde la corriente difiere de la corriente de fondo para tres desviaciones estándar calculadas a partir de las corrientes obtenidas para tres electrodos diferentes.

EJEMPLO 4 - Detección de CAP selectiva en una muestra de leche

- 15 Se investigó el ensayo de la diana en una muestra real detectando CAP en una muestra de leche de vaca desnatada con el electrodo de SPE del ejemplo 3. Se empleó el método de adición convencional para evaluar la aplicabilidad del aptasensor desarrollado. El pico de reducción de CAP aumentado se produjo en el intervalo de potencial esperado en SPE modificado con aptámero/gelatina B en comparación con la corriente de reducción obtenida en un electrodo con aptámero inmovilizado sin una matriz protectora de gelatina, lo que sugiere una sensibilidad potenciada del sensor desarrollado. Los valores de recuperación mostrados en la tabla 2, que oscilan entre el 82% y el 95%, indican la aplicabilidad del aptasensor desarrollado para la detección de CAP en muestras reales.

Tabla 2

Muestra	Añadido (M)	Detectado (M)	Recuperación (%)	D.E.R. (%)
1	10 ⁻⁹	9,50 ± (0,36) x 10 ⁻¹⁰	95	3,78
2	10 ⁻¹⁰	8,60 ± (0,30) x 10 ⁻¹¹	86	3,48
3	10 ⁻¹¹	8,23 ± (0,26) x 10 ⁻¹²	82	3,15

- 25 Para el estudio de selectividad, se usaron los antibióticos tiamfenicol y florfenicol con una estructura similar a CAP. Los resultados mostraron que no influían en el rendimiento del aptasensor, lo que sugiere una buena selectividad de este aptasensor. También para el estudio de estabilidad, se realizó la medición de impedancia tras una detección electroquímica de CAP. Se obtuvo el mismo valor, lo que indica que el aptámero autoensamblado es bastante estable.

30 **Lista de secuencias**

<110> Universidad de Amberes

- 35 <120> Aptasensores electroquímicos con una matriz de gelatina B

<130> U6851 - EP

<140> Documento EP 13175128.1

<141> 04-07-2013

- 40 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5.1.

- 45 <210> 1
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 50 <220>
 <223> Aptámero

<400> 1
 agcagcacag aggtcagatg actgagggca cggacaggag ggcattggaga gatggcg 57

- 55 <210> 2
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 645 283 T3

<220>
<223> Aptámero

5 <400> 2
agcagcacag aggtcagatg actgagggca cggacaggag ggggagagat ggcgtgaggt 60
cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

<210> 3
<211> 58
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Aptámero

15 <400> 3
gtctctgtgt gcccagaga aactggggc agatatgggc cagcacagaa tgaggccc 58

<210> 4
20 <211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Aptámero. El extremo 5' porta un grupo -SH-(CH₂)₆-

<400> 4
agcagcacag aggtcagatg actgagggca cggacaggag ggcattgaga gatggcg 57

30 <210> 5
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Aptámero. El extremo 3' porta un grupo -C-espaciador-NH₂

<400> 5
gtctctgtgt gcccagaga aactggggc agatatgggc cagcacagaa tgaggccc 57

REIVINDICACIONES

1. Sensor electroquímico basado en aptámero para detectar una molécula diana, que comprende un electrodo, en el que un aptámero está covalentemente unido a o quimisorbido sobre dicho electrodo, formando dicho aptámero un complejo con dicha molécula diana, caracterizado porque dicho complejo está encapsulado por una matriz de gelatina B.
2. Sensor electroquímico basado en aptámero según la reivindicación 1, en el que el electrodo comprende un electrodo de oro o un electrodo compuesto que combina un material polimérico y partículas eléctricamente conductoras.
3. Sensor electroquímico basado en aptámero según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el electrodo está recubierto con gelatina de tipo B.
4. Sensor electroquímico basado en aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha molécula diana se selecciona del grupo que consiste en interferón γ , factores de crecimiento celular, antígenos, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, antibióticos, toxinas, vitaminas, drogas recreativas, catecolaminas, metabolitos, proteínas y células.
5. Sensor electroquímico basado en aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el aptámero es un aptámero de ácido nucleico.
6. Sensor electroquímico basado en aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho aptámero es 5'-SH-(CH₂)₆-AGC-AGC-ACA-GAG-GTC-AGA-TGA-CTG-AGG-GCA-CGG-ACA-GGA-GGG-CAT-GGA-GAG-ATG-GCG-3' o 5'-GTC-TCT-GTG-TGC-GCC-AGA-GAA-CAC-TGG-GGC-AGA-TAT-GGG-CCA-GCA-CAG-AAT-GAG-GCC-C-espaciador-NH₂-3'.
7. Método de fabricación de un sensor electroquímico basado en aptámero para determinar una concentración de una molécula diana que comprende las etapas de:
- seleccionar un aptámero para formar un complejo con una molécula diana;
 - sintetizar dicho aptámero; y
 - adsorber dicho aptámero sobre, o acoplar covalentemente dicho aptámero con, un electrodo;
- caracterizado por proporcionar además una matriz de gelatina B para dicho aptámero sobre dicho electrodo.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha molécula diana se selecciona del grupo que consiste en interferón γ , factores de crecimiento celular, antígenos, fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, antibióticos, toxinas, vitaminas, drogas recreativas, catecolaminas, metabolitos, proteínas y células.
9. Uso del sensor electroquímico basado en aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o producido según el método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para la determinación electroquímica de una concentración de una molécula diana.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha determinación electroquímica es una determinación potenciométrica o una determinación amperométrica.
11. Uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para la determinación electroquímica de una concentración de cloranfenicol.
12. Uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para la determinación electroquímica de una concentración de cocaína.
13. Uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para la determinación electroquímica de una concentración de dopamina.

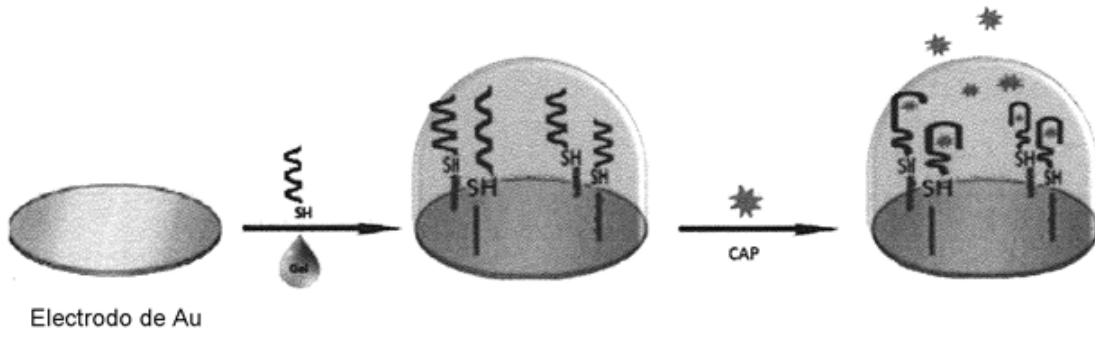


FIGURA 1

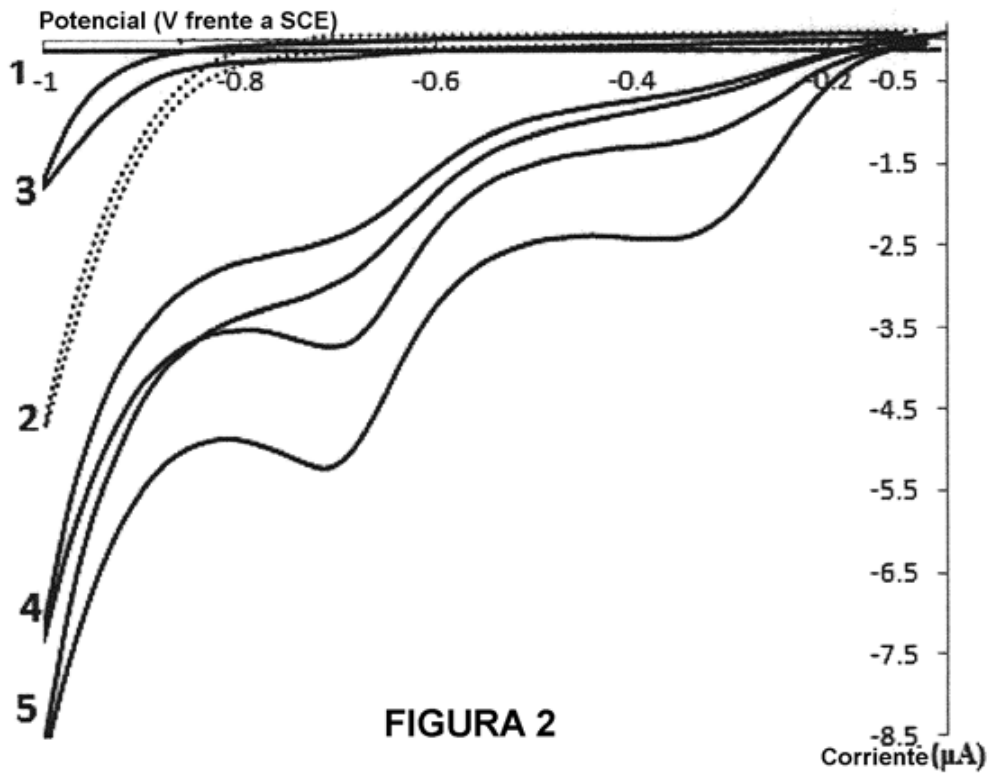


FIGURA 2

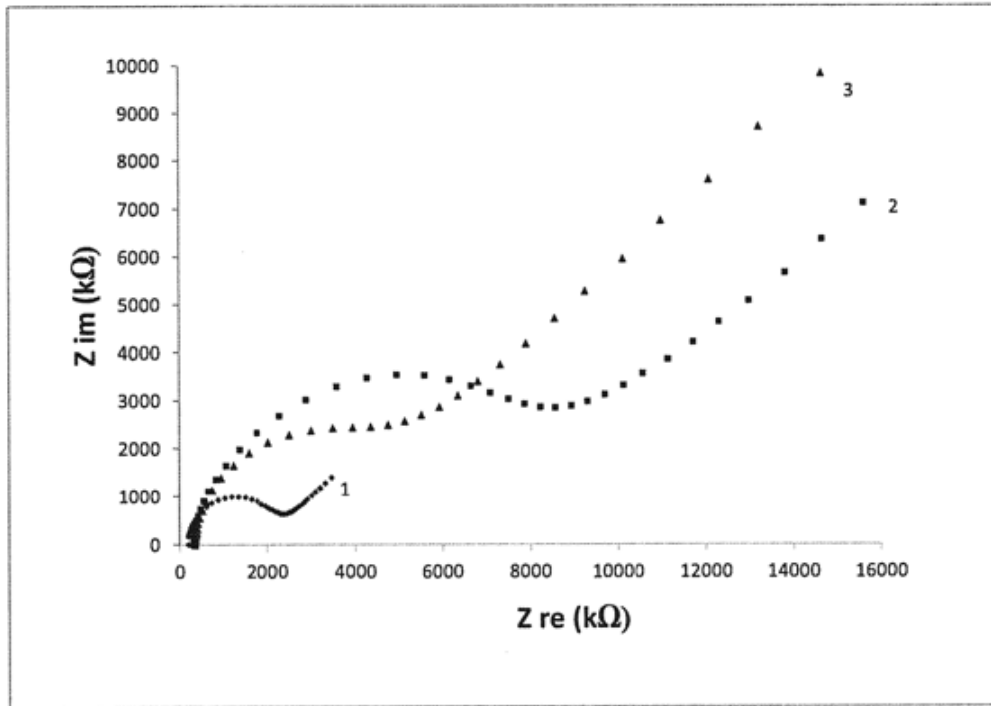


FIGURA 3

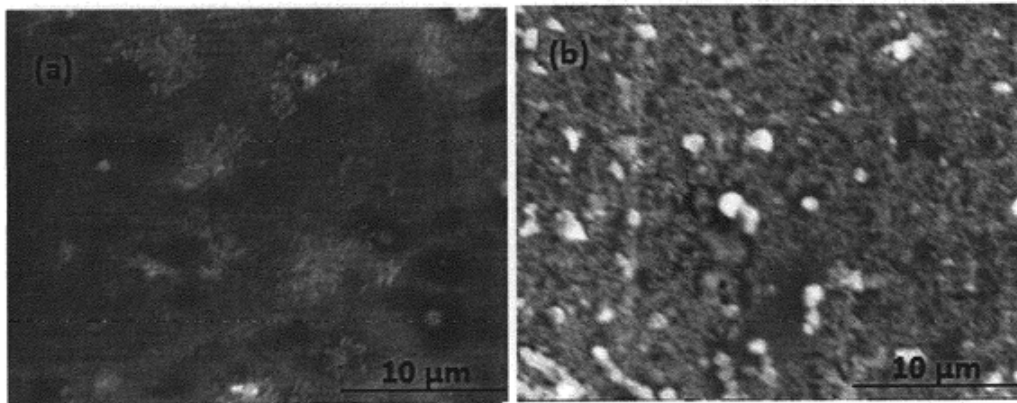
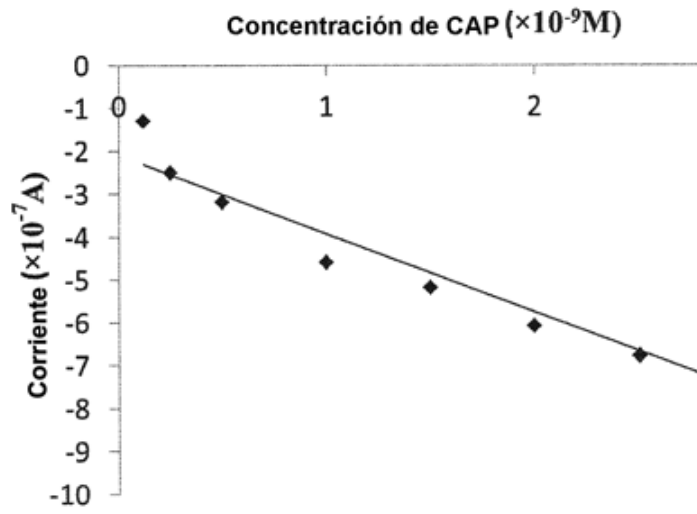
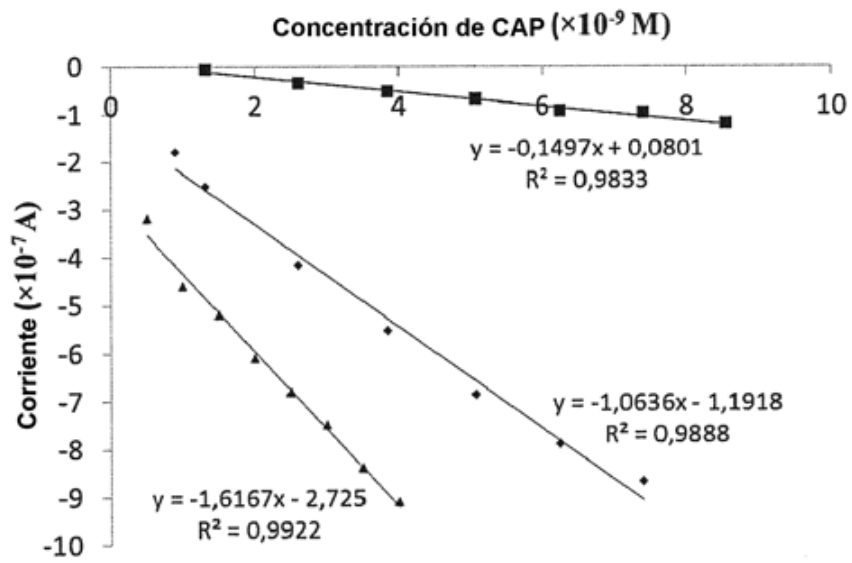


FIGURA 4



(A)



(B)

FIGURA 5

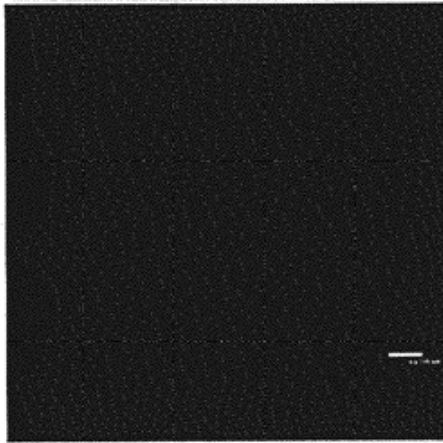


FIGURA 6A

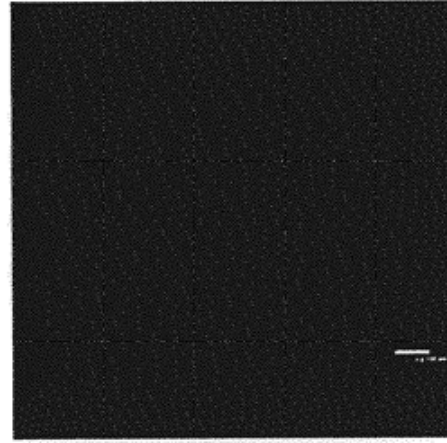


FIGURA 6B

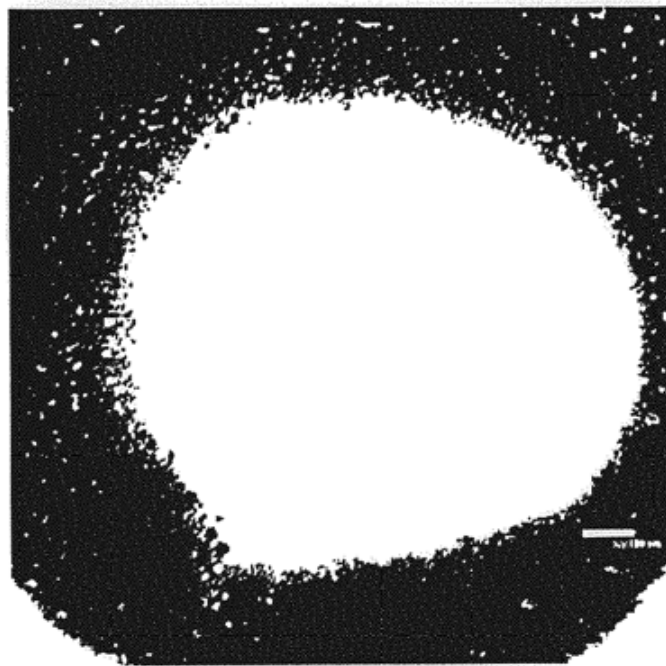


FIGURA 6C

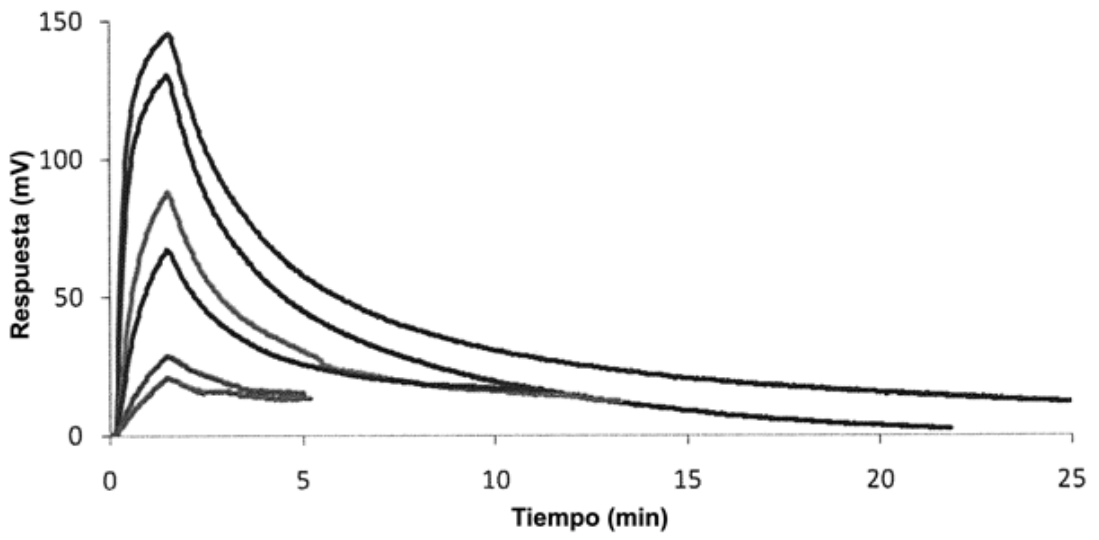


FIGURA 7

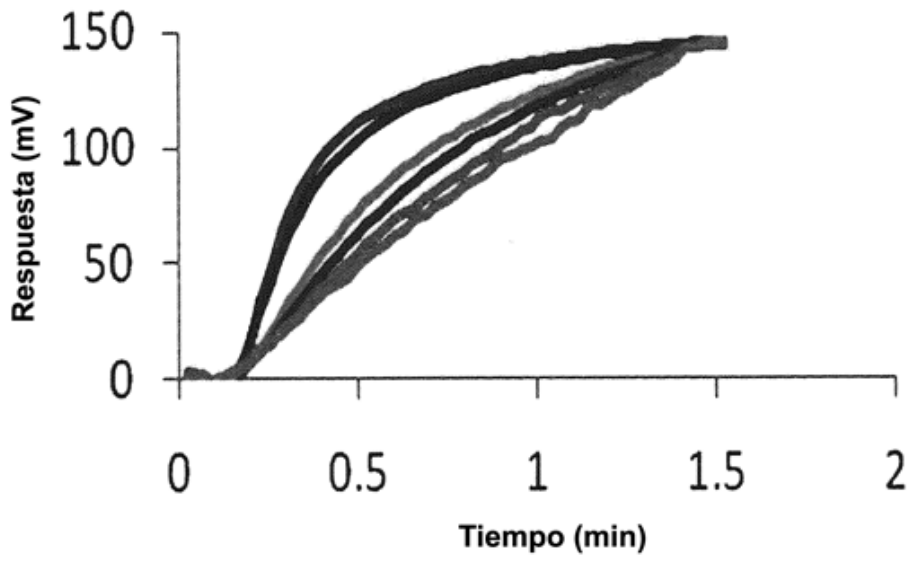


FIGURA 8

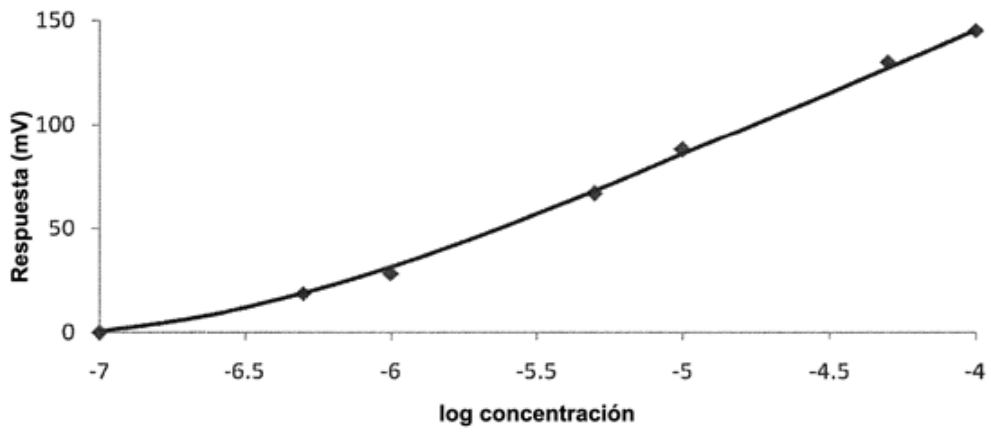


FIGURA 9

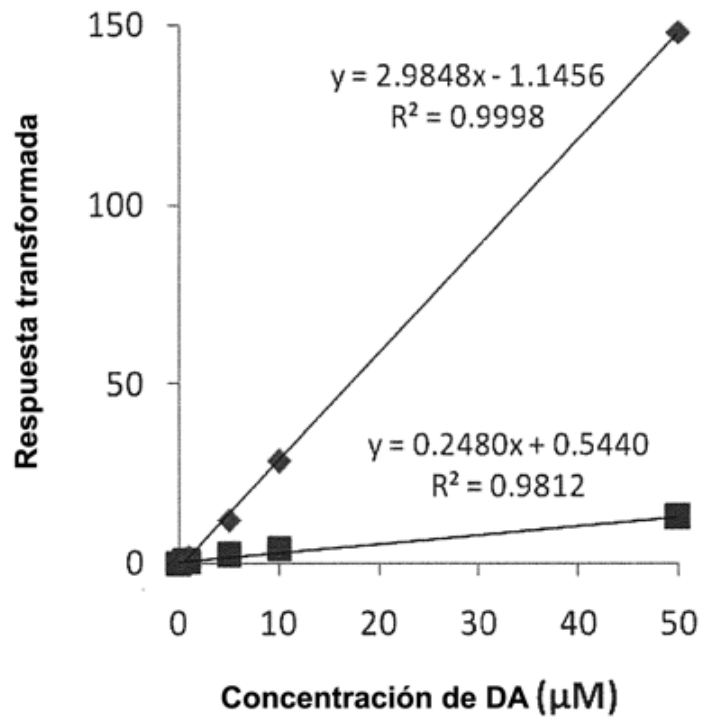


FIGURA 10

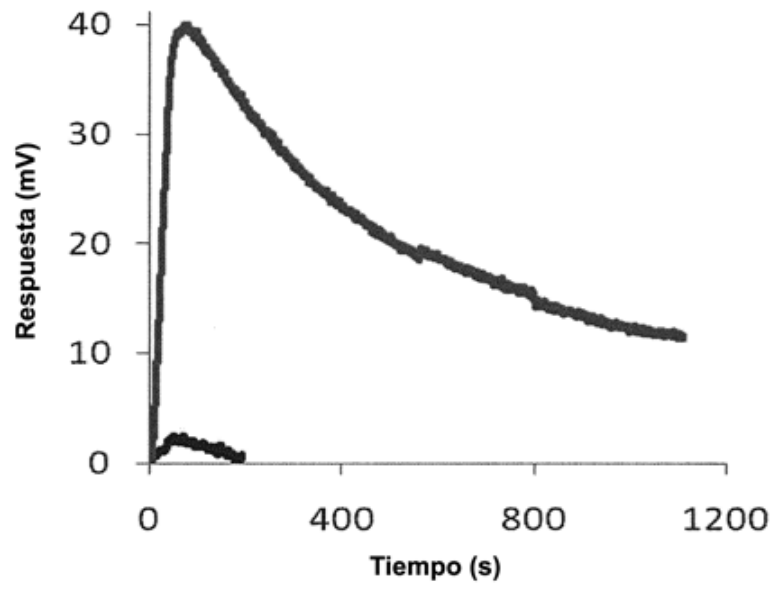


FIGURA 11

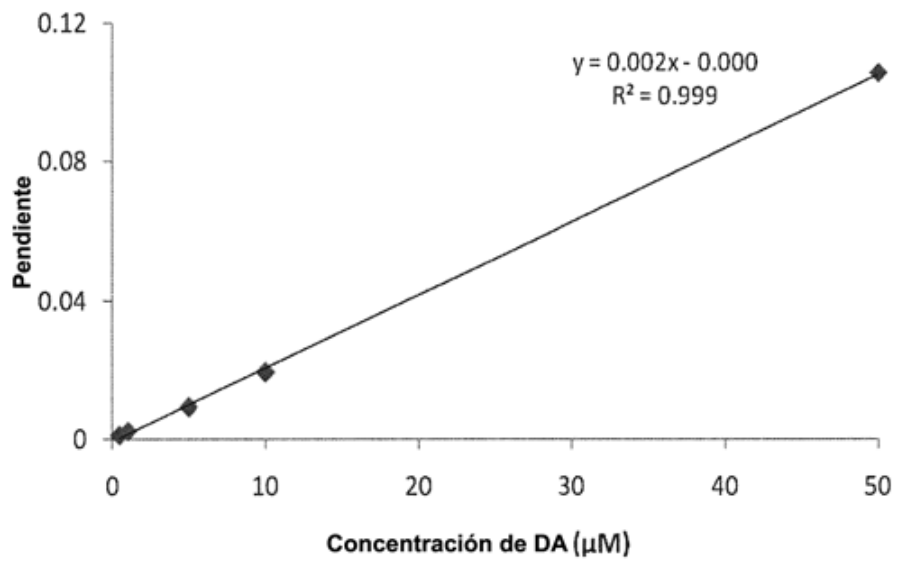


FIGURA 12

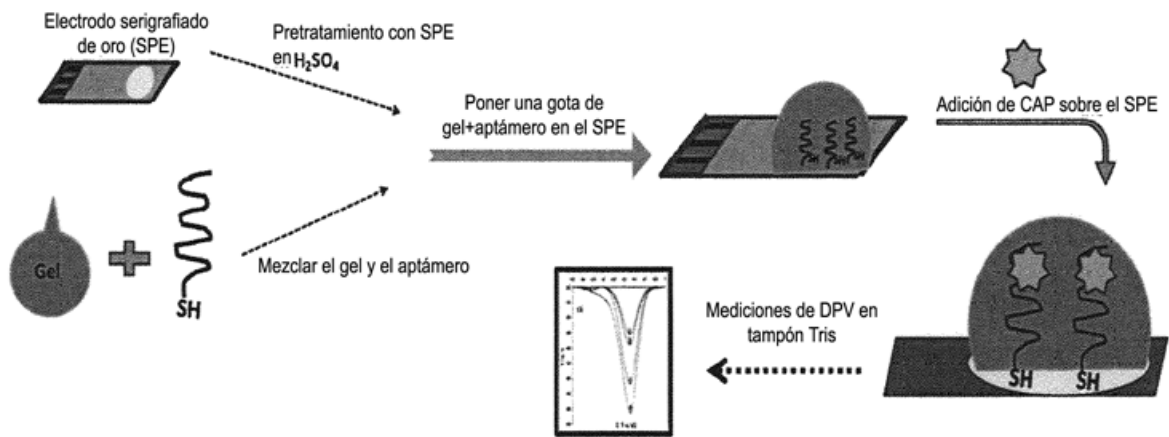


Figura 13

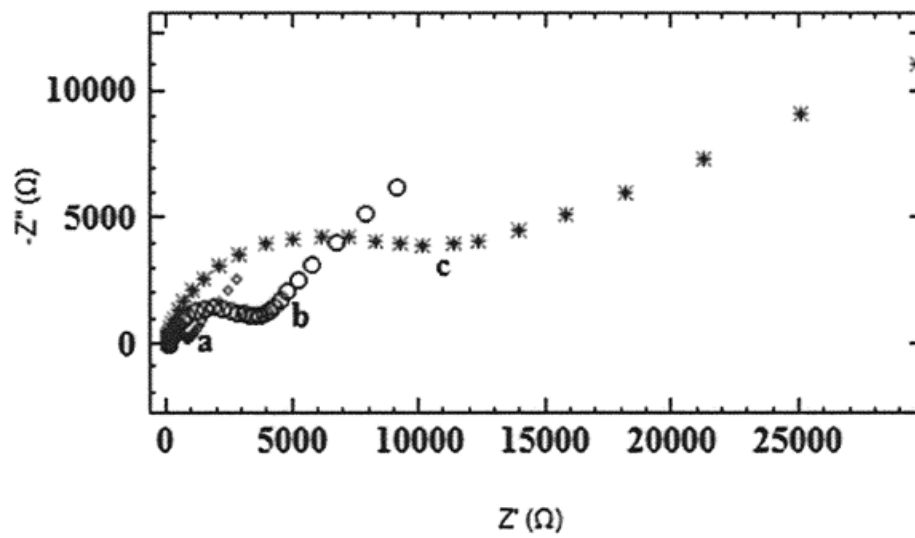


Figura 14

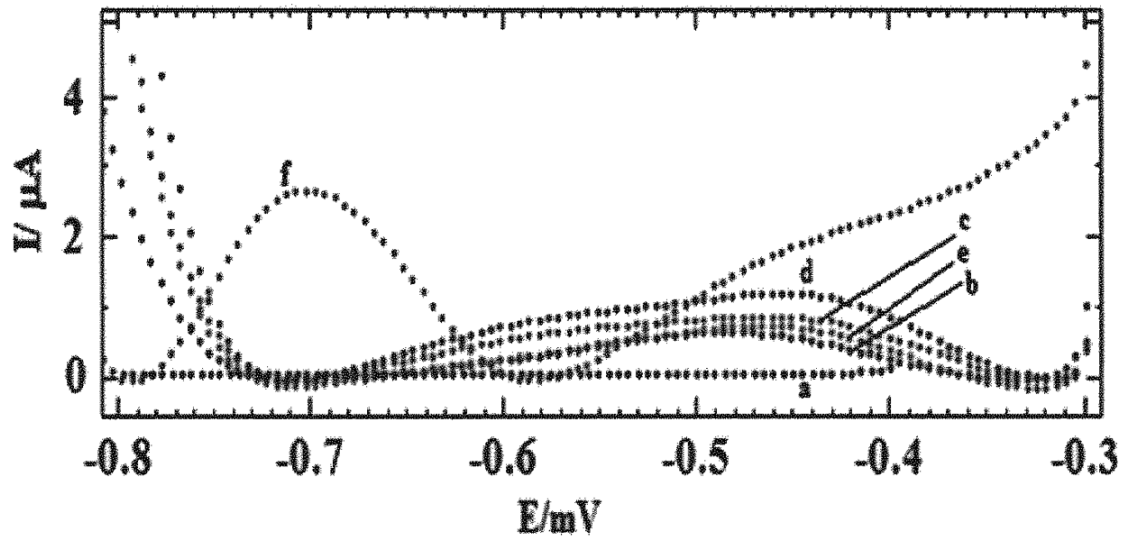


Figura 15

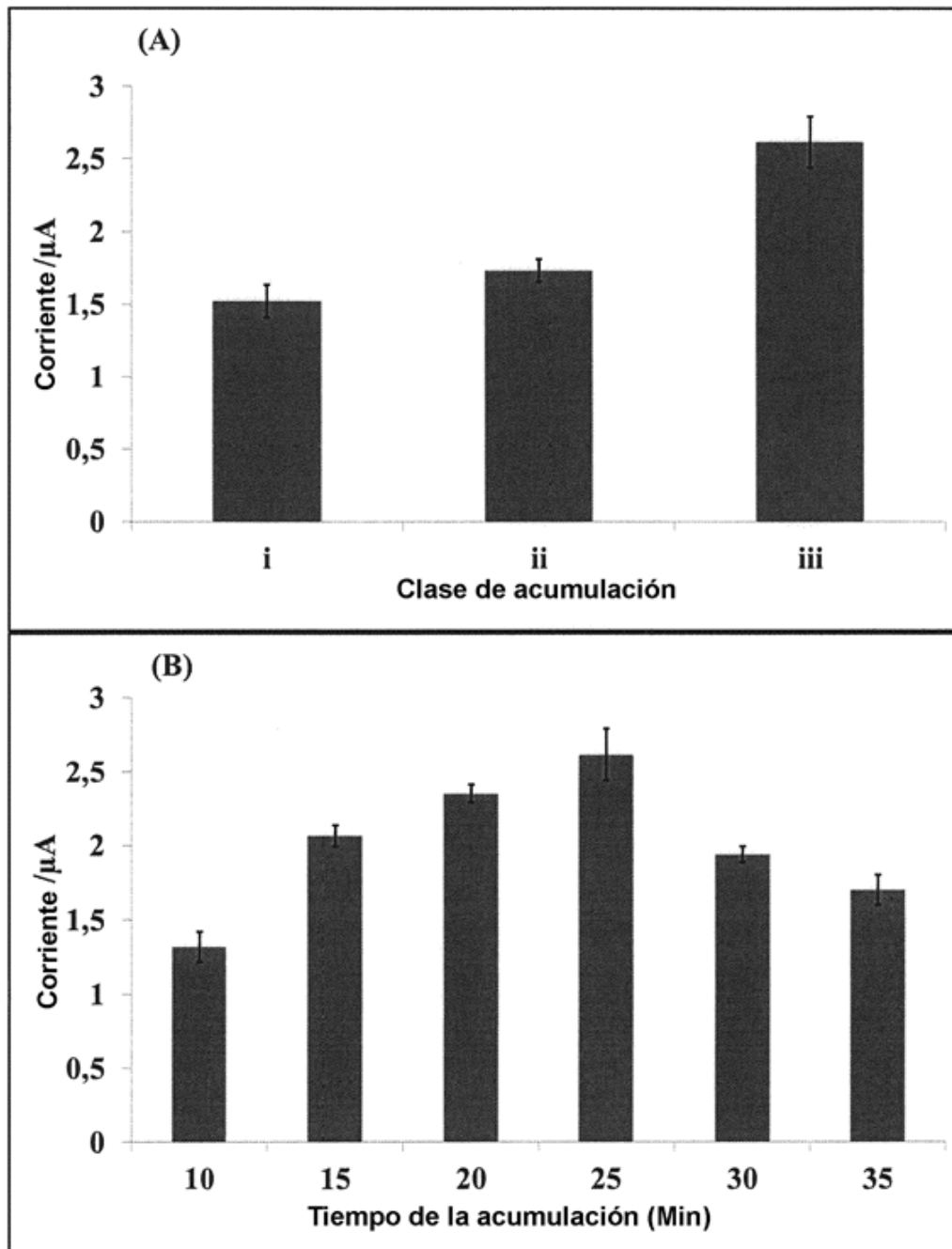


Figura 16

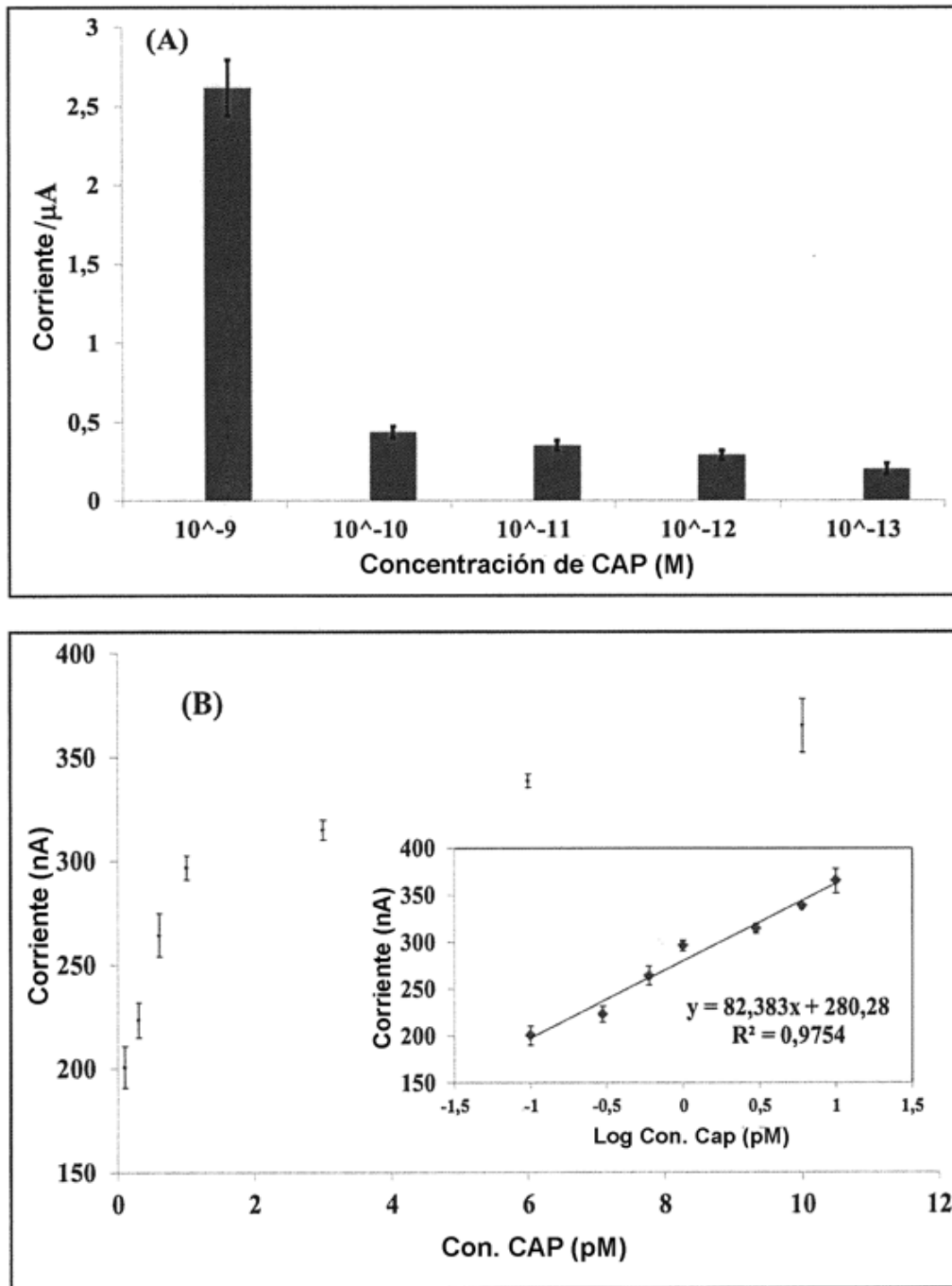


FIGURA 17