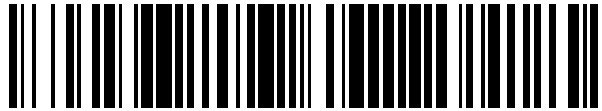


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 647**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2007 PCT/US2007/063723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2007 WO07104058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07758285 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 1996734**

54 Título: **Método y aparato para la detección de dianas usando virus unidos a electrodos**

30 Prioridad:

09.03.2006 US 743448 P

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607 , US**

72 Inventor/es:

**WEISS, GREGORY A.;
PENNER, REGINALD M.;
TAM, PHILLIP Y.;
YANG, LI-MEI y
BRIGHAM, TYLER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 691 647 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

Método y aparato para la detección de dianas usando virus unidos a electrodos

Campo de la invención

5 [0001] El campo de la invención generalmente se refiere a sensores. Más particularmente, el campo de la invención trata sobre un biosensor electroquímico que detecta la unión de analitos a virus que están adheridos o unidos a la superficie de un electrodo.

Antecedentes

10 [0002] Hay una creciente necesidad de dispositivos y métodos que puedan detectar marcadores biológicos y otras sustancias químicas o especies orgánicas dentro de una muestra. Por ejemplo, se pueden diagnosticar muchos estados de enfermedad o monitorizar su progresión mediante la detección de uno o más marcadores biológicos. Por ejemplo, una prueba de cáncer de próstata puede depender de la cantidad de antígeno prostático específico (PSA) presente en una muestra. En otros contextos, tales como guerra biológica y aplicaciones de biodefensa, hay una creciente necesidad de dispositivos sensibles relativamente pequeños que sean capaces de detectar rápidamente la presencia de cantidades pequeñas de agentes nocivos en el entorno.

15 [0003] Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos han sido investigadas como una herramienta potencial que podría proporcionar la capacidad para analizar o cribar un gran número de moléculas diana. Por ejemplo, las bibliotecas de péptidos expresados en fagos con unos 10^{10} elementos únicos ofrecen la promesa de reconocimiento biológico universal. Desafortunadamente, esta tecnología solo ha encontrado aplicación limitada en biosensores. En trabajos previos, la detección del reconocimiento molecular entre fago y diana se ha centrado
20 en un esquema de "ensayo sándwich" que implica la detección de la unión del fago a una diana inmovilizada utilizando equipos de ensayo más bien complicados y costosos tales como microbalanzas de cristal de cuarzo, matrices de microelectrodos, transistores de efecto de campo de nanohilos, inmunoensayos electroquímicos con esferas, chips eléctricos de ADN y fluoroinmunoensayos. Otras técnicas se han propuesto para la detección rápida de, por ejemplo, bacterias utilizando un sistema de ensayo electroquímico con fagémidos. Otros también
25 han propuesto el uso de un bacteriófago filamentoso seleccionado por afinidad que se inmoviliza en transductores piezoeléctricos. En este último esquema, la unión específica a la bacteria produce supuestamente cambios en la frecuencia de resonancia.

[0004] Goldman et al. han mostrado el desarrollo potencial de reactivos para sensores basados en fagos en J. Mol. Recognit. 2000;13:382-387.

30 [0005] Se ha demostrado que es posible caracterizar interacciones intermoleculares específicas entre proteínas y fagos aislados de bibliotecas de expresión en fagos grandes mediante microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) por Decker et al. en J. Inmuno. Met. 233 (2000) 159-165.

35 [0006] La solicitud de patente US 2005/0059105 A1 divulga un método y dispositivo para la detección de microorganismos mediante detección de un cambio de impedancia como resultado de la unión del microorganismo a un anticuerpo entre electrodos interdigitados. Divulga un biosensor conforme al preámbulo de la reivindicación 1.

[0007] La solicitud de patente US 2004/0005540 A1 divulga un dispositivo sensor de ligando de fagos (PLSD) que incluye un sensor de onda acústica acoplado a un elemento de unión de interés.

40 [0008] Así, existe una necesidad de un dispositivo y método que evite los problemas asociados a los ensayos sándwich previos. Tal sistema debería poderse miniaturizar y tener un tiempo de respuesta rápido.

Resumen

[0009] La presente invención está definida por las características de las reivindicaciones independientes anexas 1 y 10 y las reivindicaciones dependientes subsiguientes 2-9 y 11.

Breve descripción de los dibujos

[0010]

La FIG. 1 ilustra una vista esquemática de un sistema para medir la presencia o la concentración de una diana o analito que no es parte de la invención.

5 La FIG. 2 ilustra un diseño basado en sonda de un sensor que usa un electrodo unido a virus del tipo descrito en la presente.

La FIG. 3 ilustra un sistema microfluídico que incorpora una pluralidad de electrodos de medida. El sistema microfluídico incluye un circuito de conmutación para el muestreo de la pluralidad de electrodos.

10 La FIG. 4 es una vista en perspectiva de un electrodo dispuesto encima de un sensor QCM que no es parte de la invención.

La FIG. 5 ilustra un proceso de formación de un sensor que no es parte de la invención.

La FIG. 6A ilustra una vista en perspectiva de un sensor según una forma de realización. En esta forma de realización, los hilos o las líneas del electrodo se forman encima de un sustrato. Los hilos del electrodo están revestidos por una capa aislante que incluye una vía de acceso a la región del sustrato entre los hilos del electrodo adyacente.

15 La FIG. 6B ilustra un analizador de impedancia acoplado al sensor del tipo ilustrado en la FIG. 6A.

La FIG. 7 es una imagen de arriba abajo de un sensor con una pluralidad de hilos de electrodo formados en la superficie. También se ilustran dos capas de revestimiento fotosensible de los hilos de los electrodos adyacentes. Se ilustra también una vista agrandada de la línea o hilo del electrodo.

20 La FIG. 8 ilustra un proceso de fabricación de un sensor con una pluralidad de líneas de electrodo dispuestas en una superficie de un sustrato.

La FIG. 9 ilustra un proceso, que no es parte de la invención, de carga del sensor de las figuras 6A, 6B y 7-8 con unas partículas de virus y posteriormente la exposición del mismo a una diana o analito que se une a las partículas de virus.

25 La FIG. 10A ilustra una imagen de microscopio de fuerza atómica (AFM) de la superficie de oro recocido a la llama en cuarzo.

La FIG. 10B ilustra una imagen de AFM de un electrodo de oro similar después de la unión covalente de partículas de fago.

30 La FIG. 10C es un gráfico de la resistencia del electrodo Z_{Re} en función de la frecuencia. Los gráficos se muestran para un electrodo de oro desnudo así como para el electrodo después de la unión covalente del fago M13 y exposición de la superficie a albúmina de suero bovino (BSA). También se muestra en este gráfico el aumento en la resistencia medida relativa al electrodo de oro "limpio" que resulta de las partículas de fago unidas y el BSA.

35 La FIG. 10D ilustra diferentes voltamogramas cíclicos a 20 mV s^{-1} para un electrodo desnudo o "limpio" de oro en fluoruro tamponado con fosfato (PBF). También se ilustra el voltamograma cíclico del electrodo revestido de fago tras la exposición a n-Ab y p-Ab de > 8-10 horas de duración en la solución tamponada en circulación. Las reacciones características del electrodo de oro expuesto o "limpio" se inhibieron por las partículas de virus unidas covalentemente. Como se muestra en la FIG. 10D mediante las flechas opuestas en el trazo más bajo, esta capa podría quitarse gradualmente barriendo el potencial del electrodo a + 1,0 V frente al electrodo de calomelanos saturado (SCE) revelando las características voltamétricas de la superficie de oro subyacente.

La FIG. 11A ilustra un dispositivo de electrodo de célula de flujo radial que utilizó mediciones de masa de QCM frente al tiempo mostrando la exposición del electrodo con virus a n-Ab, PSMA y p-Ab.

45 La FIG. 11B ilustra una microfotografía de electrodos de oro estampados en silicio después de la formación de una superficie de virus covalente.

La FIG. 11C ilustra una micrografía de fluorescencia de electrodos de oro estampados expuestos a éster de tiooctil NHS seguido de incubación consecutiva en tampón, BSA y, por último, p-Ab marcado con fluorescina. Aquí, se omitió el fago M13 y, como resultado, no se observa ninguna unión al electrodo.

50 La FIG. 11D ilustra una micrografía de fluorescencia tras la fijación del fago M13 a la monocapa autoensamblada de tiooctilo y la unión de p-Ab marcado con fluorescina.

La FIG. 12A ilustra un gráfico del cambio de la impedancia capacitiva ΔZ_{Im} como función de la frecuencia aplicada para un sensor de electrodo de oro de 3 mm de diámetro unido a fagos. Los gráficos se ilustran durante las condiciones cuando el electrodo se expuso a n-Ab, PSMA y p-Ab. También se muestra una vista expandida de la región entre aproximadamente 100 Hz a 10^6 Hz con las barras de error correspondientes.

55 Las FIG. 12B ilustra un gráfico del cambio de la impedancia resistiva ΔZ_{Re} como función de la frecuencia aplicada para un sensor de electrodo de oro de 3 mm de diámetro unido a fagos. Los gráficos se ilustran durante las condiciones cuando el electrodo fue expuesto a n-Ab, PSMA, y p-Ab. También se muestra una vista expandida de la región entre aproximadamente 100 Hz a 10^6 Hz con las barras de error correspondientes.

60 La FIG. 12C ilustra un gráfico de la proporción de señal a ruido $\Delta Z_{Im}/\sigma_{\Delta Z}$ para el cambio en la impedancia capacitiva ΔZ_{Im} del electrodo de oro.

La FIG. 12D ilustra un gráfico de la proporción de señal a ruido $\Delta Z_{Re}/\sigma_{\Delta Z}$ para el cambio en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} del electrodo de oro. Además, la FIG. 12D destaca la región entre 2 kHz y 500 kHz donde se observa una relación de señal a ruido relativamente alta tanto para PSMA como para p-Ab.

La FIG. 13A ilustra un gráfico de la impedancia resistiva Z_{Re} del electrodo de oro después de la exposición a 0,24 μM de PSMA y el aclarado posterior con 100 mM de glicina acuosa a pH 2,0. Las mediciones se muestran a cuatro frecuencias, 100 Hz, 1kHz, 10 kHz y 100 kHz.

La FIG. 13B ilustra una curva de calibración para la detección de PSMA utilizando un electrodo de disco de oro. Cada dato representa el cambio promedio de la impedancia resistiva ΔZ_{Re} para cuatro electrodos separados expuestos a varias concentraciones de PSMA.

La FIG. 14 ilustra el ΔZ_{Re} medido obtenido utilizando un sensor del tipo ilustrado en las figuras 6A y 6B que fue cargado con 133 nM de n-Ab y 133 nM de p-Ab. Las mediciones se realizaron sobre un intervalo de frecuencias de 10 kHz a 100 kHz.

Descripción detallada

[0011] La FIG. 1 ilustra un sistema 10 para la detección y/o medición de la concentración de un analito o diana 50 contenido en una solución de muestra 12 utilizando un sensor 14. Como se utiliza en la presente, el analito o la diana se refiere a cualquier número de materiales que se puedan unir al sensor 14. Esto incluye, a modo de ejemplo, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN), moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, enzimas, organismos unicelulares (por ejemplo, bacterias, algas, virus), muestras de tejido y similares. La solución de muestra 12 puede incluir una solución acuosa con una o más especies iónicas en la misma. La solución 12 puede incluir una solución o componente biológico (por ejemplo, sangre u orina) o se puede obtener del entorno o de un proceso de fabricación. La solución 12 puede contenerse dentro de un recipiente 16 tal como un frasco, cubeta u otro soporte tal como se ilustra en la FIG. 1. A este respecto, las mediciones hechas utilizando el sistema 10 se realizan en un proceso discontinuo. Alternativamente, como se ilustra en la FIG. 3, el sistema 10 también se puede usar en sistemas de flujo. Por ejemplo, la solución de muestra 12 puede rebosar el sensor 14 permitiendo así la detección y/o la medición de la concentración de un analito o diana en una operación de flujo continua o semicontinua. Por ejemplo, el sensor 14 puede integrarse en una corriente de proceso de una operación de fabricación para detectar la presencia de un contaminante o una toxina.

[0012] Haciendo referencia de nuevo a la FIG. 1, el sensor 14 incluye un electrodo de trabajo 18, un electrodo de referencia 20 y un contraelectrodo 22. Durante la operación del sistema 10, como se describe con más detalle más adelante, los electrones fluyen entre el electrodo de trabajo 18 y el contraelectrodo 22. En algunas formas de realización, el electrodo de referencia 20 se puede omitir totalmente. El electrodo de trabajo 18 está formado por un metal electroconductor tal como, por ejemplo, oro. La(s) parte(s) del electrodo de trabajo 18 que estarán en contacto con la solución 12 están recubiertas con una monocapa autoensamblada (SAM) 30. Por ejemplo, en el contexto de un electrodo de trabajo de oro 18, la SAM 30 se puede formar exponiendo el electrodo de trabajo de oro desnudo 18 a éster tióctico de N-hidroxisuccinimida. El electrodo de trabajo 18 incluye además una pluralidad de virus o partículas de virus 34 que están químicamente unidos a la SAM 30. En otra configuración, las medidas de la impedancia eléctrica pueden realizarse usando una configuración de dos electrodos donde el electrodo de trabajo 18 y el electrodo de detección 24 se combinan en un electrodo y el electrodo de referencia 20 y el contraelectrodo 22 se combinan en el segundo electrodo. La FIG. 6B ilustra esta configuración con un sensor 90, pero también se puede usar en conexión con el sensor 14.

[0013] Las partículas de virus 34 comprenden partículas de fago único 34 que son seleccionadas de bibliotecas de exposición en fago. A este respecto, el sensor 14 se puede confeccionar de manera que las partículas de virus 34 se unen selectivamente a la(s) diana(s) 50 de interés. Mediante la selección del virus apropiado 34, el sensor 14 se puede confeccionar para la aplicación particular. Por ejemplo, las partículas de virus 34 se pueden seleccionar para que se unan a una proteína o polipéptido particular que sea indicativo de la presencia de un agente infeccioso. Por ejemplo, la diana 50 puede incluir un factor letal del carbunco, vaccinia (vacuna de la viruela), francisella tularemia, toxina del cólera, toxina botulínica, proteína S del SARS, y similares. A este respecto, el sensor 14 puede ser particularmente adecuado para aplicaciones de biodefensa.

[0014] La diana 50 también puede incluir una proteína o marcador biológico indicativo de un estado de enfermedad. Por ejemplo, como se describe en la presente, la diana 50 puede incluir el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), que es un marcador indicativo de cáncer de próstata. La diana 50 también puede incluir cualquier número de proteínas de señalización celular que se puedan utilizar para detectar y controlar cualquier número de enfermedades. La diana 50 también puede incluir un fármaco (por ejemplo, factor de crecimiento humano) o metabolito farmacológico de manera que el sensor 14 se pueda emplear en las aplicaciones de detección farmacológica.

[0015] Todavía en referencia a la FIG. 1, la SAM 30 recubre preferiblemente toda la parte(s) del electrodo de trabajo 18 que contactará con la solución de muestra 12. Si hay cualquier agujero o abertura en la SAM 30, esto llevará a la pérdida o saturación de la señal cuando la diana de interés 50 se una a las partículas de virus 34.

Debido a esto, durante la formación del sensor completo 14, es deseable añadir una macromolécula 38 (como se muestra en la FIG. 5) para llenar cualquier agujero o espacio en la SAM 30. Por supuesto, puede haber otras SAM 30 donde el uso de una o más macromoléculas 38 sea innecesario.

5 [0016] Como se observa en la FIG. 1, el sensor 14 incluye un contraelectrodo 22. El contraelectrodo 22 puede incluir, por ejemplo, un metal electroconductor tal como platino. La FIG. 1 también ilustra un sensor 14 que incluye un electrodo de referencia 20. El electrodo de referencia 20 puede incluir, por ejemplo, un electrodo de calomelanos saturado (SCE). Por supuesto, el electrodo de referencia 20 se puede omitir totalmente. En la FIG. 1, el electrodo de trabajo 18, electrodo de referencia 20 y contraelectrodo 22 se acoplan a través de las respectivas líneas o conductores de señal 24, 26, 28 a un analizador de impedancia 40. El analizador de impedancia 40 también puede incluir una configuración de cuatro electrodos que incluye un electrodo de trabajo 18, un electrodo de referencia 20, un contraelectrodo 22 y un electrodo de detección 24 (como se muestra en la FIG. 6B).

15 [0017] El analizador de impedancia 40 incluye la capacidad para aplicar una corriente alterna al electrodo de trabajo 18 con una variedad de frecuencias. Además, la amplitud de la corriente eléctrica aplicada puede ajustarse. El analizador de impedancia 40 puede incluir cualquier número de analizadores de respuesta en frecuencia, potencióstatos y galvanostatos. Por ejemplo, el PARSTAT 2263 disponible de Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN se puede usar en conexión con el sensor 14. El PARSTAT 2263 es capaz de realizar mediciones de impedancia en el intervalo de frecuencias de 10 μ Hz a 1 MHz. El analizador de impedancia 40, bien solo o bien en combinación con software cargado en un PC asociado (discutido más adelante), es capaz de medir la impedancia resistiva Z_{Re} del electrodo de trabajo 18. Además, el analizador de impedancia 40 (o software asociado) también es capaz de calcular el cambio en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} del electrodo de trabajo 18. Por ejemplo, ΔZ_{Re} se puede calcular como una diferencia entre la impedancia resistiva medida Z_{Re} cuando las dianas 50 se unen a las partículas de virus 34 en el electrodo de trabajo 18 en comparación con la impedancia resistiva Z_{Re} medida del electrodo de trabajo 18 en la solución 12 (por ejemplo, solución tamponada) sin la presencia de las dianas 50. En otra alternativa, el analizador de impedancia 40 junto con el software (por ejemplo, algoritmos computacionales) para determinar la impedancia resistiva Z_{Re} del electrodo de trabajo 18 y los cambios en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} se pueden integrar en uno o más procesadores construidos a medida tal como ASIC(s). Esto disminuiría el tamaño total del sistema y también reduciría el coste del dispositivo.

30 [0018] Como se observa en la FIG. 1, el analizador de impedancia 40 puede conectarse con un ordenador 42 a través de una interfaz de comunicación 44. La interfaz 44 puede incluir, por ejemplo, un cable USB o similar. El ordenador 42 puede incluir típicamente un ordenador personal o PC que puede incluir uno o más dispositivos de entrada 46 como el teclado ilustrado junto con un monitor 48 que puede usarse, por ejemplo, para mostrar resultados. Por supuesto, otros dispositivos de entrada 46 tales como un ratón o similar también pueden conectarse al ordenador 42. Asimismo, el ordenador 42 puede incluir varios dispositivos periféricos tales como una impresora (no mostrada) o similar. Preferiblemente, el ordenador 42 operativamente acoplado al analizador de impedancia 40 contiene software para controlar el analizador de impedancia 40 además de procesar y analizar los datos producidos durante el uso. Por ejemplo, para el sistema PARSTAT 2263 mencionado anteriormente, el software PowerSINE disponible de Princeton Applied Research se puede utilizar para medidas de impedancia electroquímica.

40 [0019] La FIG. 2 ilustra un sensor 14 que se fabrica en forma de una sonda 60. La sonda 60 ilustrada en la FIG. 2 se puede dimensionar de manera que pueda manipularse a mano o mediante un robot e insertarse manualmente en una solución de ensayo o muestra 12. Por ejemplo, la sonda 60 puede incluir un cuerpo alargado 62 que esté hecho de un material aislante tal como plástico o poliolefina. Un extremo de la sonda 60 incluye el electrodo de trabajo 18 que puede comprender, por ejemplo, un electrodo de oro con forma de disco o similar (por ejemplo, de 3 mm de diámetro). El contraelectrodo 22 puede estar hecho por hilo de platino que se envuelve alrededor de una superficie externa del cuerpo alargado 62. Tanto el electrodo de trabajo 18 como el contraelectrodo 22 están eléctricamente conectados a hilos o conductores 24,28 que se adaptan para conectarlos al analizador de impedancia 40.

50 [0020] La FIG. 3 ilustra un sensor 14 que se integra en un dispositivo microfluídico 70. En este ejemplo, una pluralidad de electrodos de trabajo 18a, 18b, 18c, 18d, 18e, 18f junto con un contraelectrodo 22 se posicionan dentro de un canal 72 del dispositivo microfluídico 70. El fluido de muestra 12 fluye por el canal 72 en la dirección de las flechas A. Cada electrodo 18a-18f y 22 se acopla eléctricamente al analizador de impedancia 40 a través de un circuito de conmutación 74. El circuito de conmutación 74 permite que el analizador de impedancia 40 registre cada uno de los electrodos de trabajo 18a-18f. Cada electrodo de trabajo 18a-18f incluye un virus diferente 34 que es capaz de unirse a una diana específica 50. Por ejemplo, el electrodo de trabajo 18a puede unirse con el factor letal del carbunco mientras que el electrodo de trabajo 18b puede unirse a la toxina botulínica. A este respecto, se puede crear un dispositivo de detección microfluídico pequeño que puede cribar cualquier número de analitos o dianas potenciales 50. A diferencia del dispositivo de sonda de la FIG. 2, este es particularmente adecuado para procesos en flujo o no discontinuos donde una corriente de fluido se monitoriza

para detectar la presencia de uno o varios analitos 50. También, mientras que el dispositivo de la figura 3 ha sido descrito en términos de un dispositivo microfluídico, el mismo sensor 14 se puede integrar en dispositivos de flujo no microfluídicos más grandes.

[0021] La FIG. 4 ilustra un electrodo de trabajo 18 que está situado encima de un sensor de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) 80. El sensor QCM 80 permite al sensor 14 recoger medidas de masa además de medidas de la impedancia resistiva Z_{Re} como se describe en la presente. Por ejemplo, el QCM 80 y el electrodo de trabajo 18 se pueden situar al final de la sonda 60 ilustrada en la FIG. 2. El QCM 80 es particularmente útil en los ejemplos de sensores donde el electrodo 18 es reutilizable. Por ejemplo, una solución de lavado junto con una corriente alterna aplicada puede ser capaz de eliminar selectivamente las dianas unidas 50 al electrodo de trabajo 18, volviendo al mismo reutilizable. El sensor QCM 80 puede permitir el control de la acumulación y eliminación de las dianas unidas 50 durante este proceso.

[0022] La FIG. 5 ilustra un proceso de fabricación de un sensor 14. Inicialmente, como se ha visto en el paso 200, se proporciona un electrodo de trabajo de metal 18. El electrodo de trabajo de metal 18 comprende un electrodo de oro. El electrodo de trabajo de oro 18 se puede pulir y activar mediante deposición electroquímica de una pequeña capa de oro. Otras modalidades no químicas también se pueden usar para depositar una capa fina de oro activado en el electrodo 18 (por ejemplo, bombardeo iónico). A continuación, como se observa en el paso 210, se genera una monocapa autoensamblada (SAM) 30 en el electrodo de trabajo 18. La SAM 30 se puede formar por enjuagado del sensor 14 en agua Nanopure, secado del sensor 14 con nitrógeno e incubado del electrodo de trabajo 18 en una solución con éster tióctico de N-hidroxisuccinimida disuelto en dimetilforamida (DMF). El electrodo 18 debería incubarse durante varias horas (por ejemplo, al menos dieciocho horas). Generalmente, la SAM 30 tiene un espesor del orden de varios nanómetros, pero el espesor podría ser menor o mayor dependiendo del constituyente de la SAM 30. A continuación, con referencia al paso 220 en la FIG. 5, las partículas de virus 34 se unen entonces a la SAM 30 mediante incubación del electrodo de trabajo 18 modificado con NHS-TE en la solución de fago. La solución se puede agitar para ayudar en el proceso. A continuación, en el paso 230, los electrodos cargados de virus 18 se pueden lavar con solución tamponada y luego con fluoruro tamponado con fosfato (PBF). Para llenar cualquier espacio o agujero en la SAM 30, el electrodo 18 se puede sumergir en una solución que contenga una macromolécula 38. La macromolécula 38 puede incluir BSA, ovoalbúmina, caseína u otras macromoléculas grandes. Después de la exposición a la macromolécula 38, el electrodo modificado con virus/macromolécula 18 se puede enjuagar en una solución de enjuagado (por ejemplo, Tween-20/tampón PBF) y luego lavado con un búfer de lavado. El paso 240 ilustra el electrodo de trabajo 18 después de unirse a varias dianas 50.

[0023] Las figuras 6A y 6B ilustran una forma de realización de la presente invención de un sensor 90. En esta forma de realización, una pluralidad de electrodos alargados 92, 94 se forman encima de un sustrato 96. El sustrato 96 está hecho preferiblemente de un material aislante tal como vidrio o silicio oxidado. La pluralidad de electrodos alargados 92, 94 pueden comprender hilos o líneas de dimensiones micrométricas o incluso nanométricas que se forman a lo largo de una superficie superior del sustrato 96. Como se observa en la FIG. 6A, los electrodos alargados 92, 94 se sitúan adyacentes a una capa de níquel 95 y están hechos de oro. Durante la aplicación de la corriente alterna, el campo eléctrico está confinado en gran medida a la región 110 localizada justo sobre la superficie del sustrato 96. Cada electrodo alargado 92,94 está localizado bajo una capa aislante 98. Por ejemplo, la capa aislante 98 puede comprender un material fotosensible. En la capa aislante 98 se aísla o focaliza el campo eléctrico a la región de superficie justo sobre el sustrato 96. De manera importante, esto elimina la resistencia de la solución a granel de las medidas de impedancia resistiva, aumentando así significativamente la sensibilidad del sensor 90. En un aspecto preferido, los electrodos alargados 92,94 se localizan bajo un rebajo 100 de cada capa aislante 98. Esto ayuda además a la focalización del campo eléctrico entre los dos electrodos 92, 94 en la superficie del sustrato 96. Como se observa en las FIGS. 6A y 6B, hay una abertura 102 en la capa aislante 98 que permite el acceso a la región de la superficie 300 localizada entre los dos electrodos 92, 94. La abertura 102 crea un canal o valle 104 entre electrodos adyacentes 92, 94. Los electrodos alargados 92,94 pueden tener una altura (H) en el intervalo de aproximadamente 5-80 nm. Además, los electrodos 92, 94 pueden estar separados por una anchura (W) de aproximadamente 10 μ m a aproximadamente 15 mm.

[0024] La FIG. 6B ilustra un analizador de impedancia 40 operativamente acoplado a los electrodos 92, 94 del sensor 90. En esta forma de realización, el electrodo de trabajo 18 y el electrodo de detección 24 están eléctricamente conectados a un electrodo 92 mientras que el electrodo de referencia 20 y el contraelectrodo 22 están conectados al segundo electrodo 94. Los contactos eléctricos 106 pueden formarse en la superficie de la capa aislante para proporcionar contacto eléctrico a los electrodos alargados subyacentes 92, 94. Por ejemplo, los contactos eléctricos 106 pueden estar hechos de una pintura metálica que se aplica a una superficie marcada o cortada de la capa aislante 98 que proporciona contacto eléctrico para cada electrodo 92, 94.

[0025] La FIG. 7 es una imagen micrográfica de arriba abajo de una pluralidad de electrodos 92, 94 formados en un sustrato. Se ilustra una imagen magnificada de uno de la pluralidad de electrodos 92, 94 y tiene una anchura

de 46 nm. Como se observa en la FIG. 7, la ubicación de las capas aislantes 98 (por ejemplo, material fotosensible) se muestra sobre un par de electrodos adyacentes 92, 94. La capa fotosensible 98 cubre el electrodo adyacente no acoplado. A este respecto, se forma un canal 104 entre cada par de electrodos 92, 94.

5 [0026] La FIG. 8 ilustra un proceso de formación de un sensor 90 del tipo ilustrado en las FIGS. 6A, 6B y 7. Inicialmente, en el paso 300, se proporciona un sustrato 96. Por ejemplo, el sustrato 96 puede incluir un portaobjetos de vidrio que se limpia en NOCHROMIX durante al menos dos días. A continuación, con referencia al paso 310, una capa de níquel 95 se deposita en una superficie del sustrato 96. La capa de níquel 95 se puede depositar mediante, por ejemplo, evaporación térmica de metal de níquel. El espesor de la capa de níquel 95 se usará para determinar la altura (H) de los electrodos 92, 94 descritos en la presente. En el paso 320 de la FIG. 8, una capa aislante 98 se forma encima de la capa de níquel 95. La capa aislante 320 puede incluir, por ejemplo, un material fotosensible. El material fotosensible puede incluir SU-8 10 fotosensible de tono negativo disponible de MICROCHEM de Newton, MA. El SU-8 10 fotosensible puede ser depositado por rotación (*spin coating*) sobre la capa de níquel 95 en un proceso de rampa en dos etapas. Primero, el material fotosensible se deposita por rotación sobre la capa de níquel 95 durante cinco segundos con una velocidad de rampa de 100 rpm/s (la velocidad final es 500 rpm). A continuación, el material fotosensible se deposita por rotación durante treinta segundos con una velocidad de rampa de 300 rpm/s (la velocidad final es 2000 rpm).

20 [0027] El material fotosensible depositado se somete entonces a un proceso de precocción en el cual el dispositivo se calienta a 65°C durante dos minutos que luego se incrementa lentamente hasta 95 °C. El dispositivo se somete luego a una "cocción suave" a 95°C durante cinco minutos. Después del proceso de cocción suave, el dispositivo se enfría lentamente a temperatura del entorno o ambiental. A continuación, con referencia al paso 320 de la FIG. 8, una máscara de contacto 108 se coloca en el dispositivo con un portaobjetos de cuarzo y se expone a luz ultravioleta (UV) durante tres minutos. La luz UV expone las partes descubiertas del SU-8 10 fotosensible. Tras la exposición a la luz UV, el dispositivo ahora expuesto se coloca en una solución de revelado de SU-8 10 durante aproximadamente tres minutos en el paso 330. La solución de revelado puede incluir, por ejemplo, REMOVER PG disponible de MICROCHEM. El dispositivo se enjuaga entonces con alcohol isopropílico (IPA) y se seca con nitrógeno.

30 [0028] La capa aislante 98 se compacta luego a 150°C durante aproximadamente una hora. Este proceso se realiza aumentando lentamente la temperatura desde temperatura ambiente hasta 150°C y después disminuyéndola lentamente otra vez hasta temperatura ambiente. A continuación, con referencia al paso 340, la capa de níquel 95 se graba luego químicamente en 0,785 M de ácido nítrico durante aproximadamente cinco minutos. El dispositivo se enjuaga después con agua Millipore (18,2 MOhm) y se seca con nitrógeno. Durante este proceso, el grabado de la capa de níquel 95 bajo las capas de material fotosensible 98 crea las partes rebajadas 100 provocadas por el saliente de material fotosensible que no ha reaccionado. Como se observa en el paso 340, partes de la capa aislante 98 se pueden marcar o cortar con una herramienta tal como una hoja de afeitar para proporcionar una vía conductiva para la electrodeposición posterior. El paso 340 ilustra varios de tales contactos eléctricos 106 formados en la capa fotosensible restante 98. Las regiones o aberturas marcadas pueden luego rellenarse de una pasta o pintura electroconductora (por ejemplo, pasta de plata disponible en Ted Pella, Inc.) y dejar secar para el contacto eléctrico 106 anterior.

40 [0029] A continuación, con referencia al paso 350 de la FIG. 8, los electrodos de oro 92, 94 se electrodepositan aplicando una corriente eléctrica a la capa de níquel 95 a través de los contactos eléctricos 106. La parte de canal 104 del sensor 90 se carga con una solución de electrodeposición de oro sin cianuro (Clean Earth Solutions Cyanide Free Gold Plating solution N.º 45.216 de New Braunfels, TX). El oro se deposita entonces en la capa de níquel 95 bajo el material fotosensible 98 por aplicación de alrededor de -950 mV (frente a un electrodo SCE) durante aproximadamente cien segundos. La cantidad de tiempo durante el cual se deposita el oro determinará la anchura de los electrodos de oro 92, 94. En una forma de realización preferida, la deposición de oro debería parar de manera que un reborde o saliente de material fotosensible permanezca sobre los electrodos recién formados 92, 94. Esto minimizará cualquier posible fuga del campo eléctrico a la solución a granel (cuando se haya cargado).

50 [0030] La FIG. 9 ilustra un proceso, que no forma parte de la invención, de carga del sensor de la FIG. 8 con partículas de virus 34 seguida de la unión de las mismas a la(s) diana(s) 50. El paso 400 comprende la provisión de un sensor 90 como se ha descrito anteriormente. En este estado, el sensor 90 no incluye ninguna partícula de virus adherida 34. Para que el sensor 90 detecte y/o mida la concentración de la diana 50, las partículas de virus correspondientes 34 que se unen a la diana(s) 50 de interés deben cargarse en el dispositivo. Como se observa en el paso 410 de la FIG. 8 la superficie del sustrato 96 localizada entre los electrodos 92, 94 se modifica químicamente para unirse electroestáticamente a partículas de virus 34. Para hacer esto, el dispositivo del paso 400 se calienta primero a alrededor de 100°C en un horno durante aproximadamente veinte minutos. El calentamiento se realiza para eliminar toda humedad. El dispositivo se aparta entonces del calor, se enfría y se coloca en una solución que contiene un 2% (en volumen) de 3-aminopropiltriétoxilano (APES) en tolueno seco durante aproximadamente treinta minutos. El tratamiento con APES causa que la superficie del sustrato 96

localizada entre los electrodos 92, 94 se carguen positivamente. El dispositivo se lava o se enjuaga a continuación con tolueno. El dispositivo puede volver a lavarse con un alcohol tal como etanol seguido de un enjuagado con agua Nanopure.

5 [0031] Ahora en referencia al paso 420 de la FIG. 9, las partículas de virus 34 (en la FIG. 9 ilustradas como fago M13) se ponen entonces en contacto con la superficie del sustrato 96 cargada positivamente. Por ejemplo, una parte del dispositivo se puede bañar o, de otro modo, sumergir en una solución con las partículas de fago 34. Un agitador orbital o similar se puede utilizar para facilitar la mezcla de la solución. Después de unir las partículas de fago 34 a la superficie del sustrato 96, el dispositivo se puede enjuagar con una solución tamponada tal como PBF. Preferiblemente, el dispositivo se mantiene en un estado húmedo hasta su uso para conservar la integridad de las partículas de fago 34. Otros tipos de partículas de virus 34, no obstante, pueden ser almacenadas en un estado seco durante algún tiempo. En este caso, el dispositivo podría almacenarse en un estado seco antes del uso. Haciendo referencia ahora al paso 430 de la FIG. 9, una solución de muestra 12 que contenga diana(s) 50 puede colocarse después en contacto con el sensor 90. Por ejemplo, la solución de muestra 12 se puede hacer fluir o gotear en el canal 104. Las dianas 50 contenidas en la solución de muestra 12 pueden luego unirse a partículas de virus complementarias 34 que están unidas a la superficie del sustrato 96.

10 [0032] Después de que la solución de muestra 12 haya entrado en contacto con el sensor 90, el sensor 90 se puede lavar o enjuagar con un agente de enjuagado (por ejemplo, Tween-20/tampón PBF) para eliminar cualquier material no unido de la superficie cargada con fagos 96. La impedancia resistiva Z_{Re} del sensor 90 puede medirse luego utilizando el analizador de impedancia 40 como se describe en la presente. En un aspecto de la invención, la impedancia resistiva medida Z_{Re} puede ser suficiente para identificar la presencia o ausencia de una diana particular 50. A este respecto, puede que no haya ninguna necesidad de sustraer un valor de línea base de la impedancia resistiva medida cuando no hay ninguna diana 50 presente (por ejemplo, medidas realizadas en tampón solo). Por supuesto, en otras formas de realización, el cambio en la impedancia resistiva Z_{Re} se puede calcular y usar para detectar tanto la presencia de una diana 50 como la concentración de la diana 50 en la solución de muestra 12.

Experimento n.º 1

15 [0033] En un primer experimento, se desarrolló y evaluó un sensor del tipo ilustrado en la FIG. 1, mediante el uso del bacteriófago M13 unido de manera covalente a la superficie de un electrodo de oro. El bacteriófago M13 puede unirse selectiva y simultáneamente a dos biomoléculas: un anticuerpo (positivo o p-Ab con un peso molecular de 150 kDa) y un antígeno prostático específico de membrana (PSMA con un peso molecular de 91,5 kDa). El bacteriófago M13 incluye un péptido expresado en fago con la secuencia aminoacídica CALCEFLG. El péptido se fusiona con P8 (g8p), la principal proteína de revestimiento, y se expresa en la superficie del M13. Un anticuerpo de control negativo (n-Ab con un peso molecular de 150 kDa) se usó para evaluar la unión inespecífica y la selectividad del biosensor.

35 Materiales

[0034] Todos los productos químicos y disolventes (>99% de pureza) se adquirieron en Fisher o Merck y se usaron tal como se recibieron, a menos que se indique. La DMF y el etanol se secaron con tamices moleculares de 4Å obtenidos de Alfa. El anticuerpo anti-M13 (p-Ab) se adquirió en Amersham Biosciences, y el anti-Flag® M2 (n-Ab) se adquirió en Sigma. Se usó agua Nanopure (resistencia ~18 MΩ*cm, Barnstead Inc.) en todos los experimentos.

[0035] Respecto a los tampones, el PBF (5,7 mM PO₄, 140 mM NaF, pH 7,2) se esterilizó con filtro a través de un tamaño de poro de membrana de 0,22 μm (Corning). Para el tampón de lavado, se añadieron BSA al 0,06% y Tween-20 al 0,035% (Sigma) al PBF. Se usó BSA (0,2%) en solución de fluoruro de sodio tamponado con fosfato (pH 7,2) para el bloqueo.

45 Construcción del electrodo con virus

[0036] Se pulieron electrodos de oro circulares (3 mm de diámetro) con compuesto de diamante de 1 μm y 0,25 μm (Ted Pella) en microtejido (Buehler) y se sonicaron tres veces en agua Nanopure durante 3 minutos. Los electrodos recién preparados se enjuagaron con agua Nanopure, se secaron con N₂ y se incubaron durante al menos 18 horas en una solución de éster tióctico de N-hidroxisuccinimida (NHS-TE, 16,5 mM) disuelto en DMF. El electrodo modificado con NHS-TE se almacenó en un desecador. Se seleccionaron fagos con afinidad de unión específica con PSMA de bibliotecas de péptidos expresados en fagos usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. La secuencia aminoacídica del péptido específico para PSMA fue CALCEFLG. Para la reacción con el fago, un electrodo modificado con NHS-TE se incubó en una solución de fago (300 μl, 16 nM) y agitado durante 1 h mediante agitador orbital. Los electrodos con virus se enjuagaron 5 minutos con búfer de

lavado y después 5 minutos con PBF. Los electrodos con virus se sumergieron en 300 μ l de solución de BSA al 50% y se agitaron otros 40 minutos. Los electrodos modificados con virus/BSA se enjuagaron durante 5 minutos con tampón Tween-20/PBF y luego 5 minutos con tampón de lavado.

Medidas con electrodos con virus

- 5 [0037] Para experimentos con biosensores, se diluyeron n-Ab, p-Ab o PSMA (concentración final de 0,583 μ M o la que se indique) en el tampón de lavado antes de la medida. El electrodo con virus se sumergió en la solución de n-Ab, p-Ab o PSMA en agitación durante 1 hora. El electrodo se enjuagó con tampón de lavado, antes de la inmersión durante un minuto en el tampón de lavado durante la siguiente medición de la impedancia. Todas las mediciones de impedancia se efectuaron utilizando un potenciostato PARSTAT 2263 (Princeton Applied Research, Inc.). Estas mediciones emplearon una amplitud de voltaje de CA de 10 mV en el intervalo de frecuencias de 1 MHz a 0,1 Hz y el potencial de reposo del electrodo con virus. Todas las mediciones de voltametría cíclica se efectuaron en PBF acuoso utilizando un electrodo de calomelanos saturado (SCE) como electrodo de referencia y un contraelectrodo de platino a una velocidad de barrido de 20 mV^{-1} .

Mediciones con QCM

- 15 [0038] Se prepararon discos de cuarzo Au/Ti (diámetro de 1 pulgada) como se describe en la presente para los electrodos con virus excepto que una capa de oro fresca se electrodepositó primero en el oscilador de cuarzo revestido de oro obtenido del fabricante (Stanford Research Systems) aplicando +0,7 V frente a SCE durante 200 segundos en una solución 10 mM de AuCl_3 (pH 1). Después de la deposición de oro, se empleó el mismo procedimiento para la fijación de virus. Este electrodo se colocó en una célula de flujo (mostrada en la FIG. 11A) que proporciona un suministro radial simétrico de la solución a la superficie del electrodo QCM de forma circular. Las mediciones de masa se realizaron utilizando un QCM 200 (Quartz Crystal Microbalance Digital Controller, 5 MHz Crystal Oscillator, Stanford Research Systems) con una velocidad de flujo de 10 μLmin^{-1} obtenida de una bomba de jeringa (Kd Scientific Inc.).

Análisis AFM

- 25 [0039] Se obtuvieron imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo de contacto intermitente en aire a presión y humedad ambiental utilizando un microscopio de sonda de barrido de Park Scientific Instruments AutoProbe CP Research (ahora Veeco, Santa Barbara, CA). El escáner piezoeléctrico se calibró utilizando una rejilla de 1,0 μm en las direcciones xy y en la dirección z usando varios estándares de altura convencional. Las puntas eran de silicio (Ultrasharp cantilevers, modelo n.º NSC11, MikroMasch). Los topogramas se obtuvieron de 30 256 x 256 píxeles y fueron aplanados línea a línea y analizados utilizando el software AutoProbe de tratamiento de imagen suministrado por el fabricante del AFM.

Análisis de fluorescencia

- 35 [0040] Se prepararon electrodos interdigitados con espacios de 2 μm por fotolitografía en una sala limpia. La modificación de la superficie fue similar a la preparación de los electrodos con virus, excepto que el ensamblaje se realizó en una célula de flujo de PDMS con un canal de 0,3 mm de ancho y 0,8 mm de largo. Los anticuerpos anti-M13 marcados fluorescentemente se añadieron con una bomba de jeringa a una velocidad de 10 $\mu\text{l/min}$ antes de aclarar con soluciones de PBF-Tween y PBF durante 10 minutos cada una. Para visualizar el electrodo se utilizó un microscopio Axioskop2 MAT (Carl Zeiss Micromaging Inc.) equipado con un filtro apropiado y una cámara digital Nikon Coolpix 5000.

Resultados y discusión

- 40 [0041] En este experimento, el biosensor consistió en un electrodo de oro modificado de manera covalente con el fago M13, que se une a un anticuerpo monoclonal anti-M13 (p-Ab). Para el reconocimiento del marcador de cáncer de próstata, el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), se aislaron fagos con alta afinidad por PSMA de selecciones de una biblioteca de péptidos de diversidad $\sim 5 \times 10^{11}$. Este PSMA-fago se une a PSMA y a p-Ab y, como el fago M13, no se une al anticuerpo de control negativo (n-Ab, Ab monoclonal anti-His). Los fagos y anticuerpos se unieron y midieron en soluciones de PBF-Tween-BSA, con la excepción de los experimentos con QCM en los que se omitió el BSA para reducir el fondo. Este tampón permite una evaluación realista del potencial de este dispositivo para ejecutar mediciones fisiológicas, ya que incluye una concentración alta de sal ($I > 140 \text{ mM}$) y un pH de 7,2.

- 50 [0042] La preparación de una superficie covalente con virus sin poros fue crítica para realizar mediciones electroquímicas fiables. Primero se pulió la superficie de oro y luego se activó mediante la electrodeposición

breve de una pequeña cantidad de oro fresco. Como se muestra esquemáticamente en la FIG. 5, se anclaron partículas de fago 34 al electrodo de oro 18 a través de una monocapa autoensamblada (SAM) de éster de tiooctil NHS. Esta SAM requirió ~18 horas para ensamblarse a partir de una disolución de DMF seca del éster activado con NHS y, después de la reacción con el fago, produjo una capa densa de virus covalente eléctricamente resistente. Se tomaron imágenes del electrodo por microscopía de fuerza atómica sin contacto (NC-AFM) y la superficie de oro limpio se caracterizó por una rugosidad RMS de <1 nm con granos de oro de 10 μm de diámetro delineados por bordes granulares como se ilustra en la FIG. 10A. Después de la modificación covalente con virus, la imagen de NC-AFM mostrada en la FIG. 10B muestra una superficie estriada con una aspereza de 2-3 nm. Debido a que las partículas individuales de fago M13 tienen ~6-8 nm de diámetro y aproximadamente 1 μm de longitud, las estrías observadas en la FIG. 10B concuerdan con la presencia de haces alineados de partículas de fago M13 en la superficie de oro. Junto con la BSA adsorbida, esta capa covalente de virus aumenta de manera pronunciada la resistencia de la superficie de electrodo con el aumento más grande observado a frecuencias menores como se muestra en la FIG. 10C.

[0043] Con referencia a la FIG. 10D, la capa superficial de virus covalente, después de la exposición a BSA, fue lo suficientemente densa como para inhibir completamente las características electroquímicas de las superficies de oro subyacentes (compárese el electrodo superior con virus con trazas de oro desnudo). El voltamograma cíclico para un electrodo de oro desnudo en tampón PBF ilustrado en la FIG. 10D muestra tres reacciones electroquímicas incluyendo: (1) una oxidación reversible del oro (a 0,5 V), (2) reducción del óxido de oro resultante (a 0,2 V), y (3) reducción de H^+ para formar H_2 (a 0,0 V). Después de la modificación covalente con virus y el tratamiento con BSA/Ab-p, no se observa ninguna de estas tres reacciones (electrodo con virus en la FIG. 10D), lo que indica que el electrodo de oro está aislado del contacto directo con la disolución de electrolito. No obstante, si se realiza un barrido reiterado del potencial de este electrodo a +1,0 V, la SAM se desorbe oxidativamente, liberando así el virus y el Ab-p de la superficie de oro. A medida que la desorción de la SAM procede sobre el curso de diez barridos voltamétricos (mostrado por flechas opuestas en la parte inferior del barrido en la FIG. 10D), emergen picos de corriente característicos del oro desnudo. La selectividad del biosensor para p-Ab frente a n-Ab y PSMA que demostramos a continuación requirió superficies con virus covalentes con esta fuerte pasivación de la superficie de oro.

[0044] Para guiar el desarrollo del electrodo con virus, dos métodos independientes se usaron para evaluar el funcionamiento de la superficie de virus covalente. Primero, la gravimetría con microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) permitió medir directamente cambios de masa en la superficie de virus covalente durante la exposición de estas superficies a p-Ab y n-Ab. Los resultados de esto se ilustran en la FIG. 11A. Las mediciones con QCM revelaron que los electrodos con virus se unen rápida e irreversiblemente a p-Ab, pero no se unen a n-Ab en ningún grado medible. La omisión del fago, seguida de la adición de tampón y BSA, resultó en una superficie incapaz de unirse a p-Ab marcado fluorescentemente. Esto se puede observar en la FIG. 11C que ilustra la ausencia de unión. Como era de esperar, la superficie de virus covalente reconoció y se unió al p-Ab marcado fluorescentemente, como se muestra en la FIG. 11D. El p-Ab marcado con fluoresceína se ve claramente en la FIG. 11D situado en los electrodos de oro estampados ilustrados en la FIG. 11B.

[0045] La espectroscopía de impedancia electroquímica evaluó el rendimiento del electrodo con virus en respuesta a la exposición a n-Ab, PSMA y p-Ab. Las FIGS. 12A-12D ilustran el cambio de impedancia (tanto capacitiva como resistiva) como función de la frecuencia aplicada. También se ilustran (FIGS. 12C y 12D) las proporciones de señal a ruido asociadas a estas mediciones particulares. Estos experimentos han explorado dos modos de detección. Primero, el electrodo con virus se expuso a analito durante 1 hora, se enjuagó con tampón de lavado y luego se transfirió a búfer de lavado para medir la impedancia. En las FIGS 12A y 12B, la señal se define como el cambio en la impedancia que es o bien capacitiva, ΔZ_{Im} (FIG. 12A), o bien resistiva, ΔZ_{Re} (FIG. 12B), en relación a la impedancia inicial de la superficie de virus covalente, tras tratamiento con BSA (es decir, electrodo con virus en tampón). En el intervalo de frecuencia de 100 Hz a corriente continua (dc), tanto ΔZ_{Im} como ΔZ_{Re} aumentaron exponencialmente con la reducción de la frecuencia. Mientras que las amplitudes de señal relativamente grandes observadas a frecuencias muy bajas se han visto como razón para utilizar frecuencias inferiores a 1 Hz en biosensores, estos resultados hallan que la variabilidad entre medidas de ΔZ_{Im} y ΔZ_{Re} , como se mide con la desviación típica obtenida para mediciones replicadas, $\sigma_{\Delta Z}$ (representada como barras de error en las FIGS. 12A y 12B), aumentó en paralelo con ΔZ tanto para ΔZ_{Im} como para ΔZ_{Re} . Así, las frecuencias bajas proporcionan una señal grande, pero desafortunadamente un ruido de fondo proporcionalmente mayor. No obstante, entre 2 kHz y 500 kHz, ΔZ_{Im} se vuelve pequeña, como se muestra en la FIG. 12A, pero ΔZ_{Re} se puede medir fácilmente con una señal positiva tanto para p-Ab como para PSMA, y con una señal cercana a cero para n-Ab, como se ilustra en la FIG. 12B.

[0046] El valor positivo de ΔZ_{Re} sobre este intervalo de frecuencias significa que cuando el electrodo con virus está unido al analito o la diana tiene una resistencia mayor que cuando el electrodo está en el estado inicial previo a la exposición al analito. Esta mayor resistencia puede derivar de la formación de una capa de analito unido situada encima del electrodo con virus. Se cree que estas moléculas de analito unido pueden tanto desplazar el electrolito, como impedir el transporte iónico a la superficie del electrodo bloqueándolo físicamente.

[0047] Los datos de las FIGS. 12A y 12B sugieren que la proporción entre ΔZ y $\sigma_{\Delta Z}$ a cada frecuencia puede proporcionar un mejor factor de mérito que ΔZ . Cuando $\Delta Z/\sigma_{\Delta Z}$, o la proporción de señal a ruido, se representa frente a la frecuencia tanto para los canales capacitivos como para los resistivos (FIGS. 12C y 12D, respectivamente), es evidente que los valores más altos (es decir, aquellos con las proporciones de señal a ruido más altas) se obtienen en el canal resistivo en el intervalo de frecuencias de aproximadamente 2 kHz a aproximadamente 500 kHz. Aquí, $\Delta Z_{Re}/\sigma_{\Delta Z} = 16$ para PSMA y $\Delta Z_{Re}/\sigma_{\Delta Z} = 20$ para p-Ab (FIG. 12D). Además, los valores medidos de $\Delta Z_{Re}/\sigma_{\Delta Z}$ permanecieron prácticamente invariables en este intervalo de frecuencias (por ejemplo, de aproximadamente 2 kHz a aproximadamente 500 kHz).

[0048] La FIG. 13A ilustra la medición del valor dependiente de la frecuencia de Z_{Re} cuando un electrodo con virus se expuso primero a PSMA y posteriormente se enjuagó para liberar PSMA de la superficie del sensor. Como se observa en la FIG. 13A, solo a 10 kHz y 100 kHz se recupera la impedancia del electrodo con virus recién preparado después de esta operación de enjuagado. A estas frecuencias, la elevada resistencia del estado de Z_{Re} asociado a PSMA unido y la del estado de baja Z_{Re} asociado a una superficie de sensor limpio se reproducen para tres ciclos sucesivos de exposición/enjuagado antes del fallo del sensor en la cuarta exposición a PSMA. Usando 10 kHz, puede medirse la dependencia de ΔZ_{Re} de la concentración de PSMA. Por ejemplo, la FIG. 13B ilustra una curva de calibración de cuatro sensores separados 14 cada uno expuesto a una concentración diferente de PSMA. En base a la curva de calibración de la figura 13B, estos datos permiten estimar un límite de detección para PSMA de aproximadamente 120 nM utilizando el sensor 14, que es un valor comparable a los niveles observados en el semen de hombres saludables. Durante el uso operativo de los sensores 14, 90, los datos de la curva de calibración se pueden cargar en el analizador de impedancia 40 y/o el ordenador 42 para determinar la concentración de la(s) diana(s) 50 en la muestra o la solución de ensayo 12. Por ejemplo, una vez se ha medido ΔZ_{Re} , la concentración correspondiente puede entonces determinarse en función de la curva de calibración. Esto se puede realizar a través de una tabla de consulta, base de datos o software que contenga la curva de calibración para la diana 50 de interés particular. En un aspecto de la invención, cuando hay una pluralidad de electrodos 92, 94 como en el sensor 90, puede haber una curva de calibración separada para cada una de las dianas 50 que corresponden a las partículas de virus 34 cargadas sobre el sensor 90.

Experimento n.º 2

[0049] En un segundo experimento según la presente invención, múltiples sensores 90 del tipo ilustrado en las figuras 6A, 6B y 7-9 se expusieron a 133 nM de n-Ab y 133 nM de p-Ab. Usando un analizador de impedancia 40, se calculó ΔZ_{Re} en un intervalo de frecuencias aplicadas que varía de 10 kHz a 100 kHz.

[0050] La FIG. 14 ilustra un gráfico de ΔZ_{Re} como función de la frecuencia aplicada tanto para n-Ab como para p-Ab. Como se observa en la FIG. 14, se obtiene un valor ΔZ_{Re} positivo en el intervalo de frecuencias de 10 kHz a aproximadamente 90 kHz. Consecuentemente, el sensor 90 es capaz de detectar la presencia de p-Ab en concentraciones tan bajas como 133 nM. En este experimento particular, los electrodos 92, 94 tenían una altura de 40 nm y estaban separados por 11 mm. Se cree que la sensibilidad del sensor 90 se puede aumentar reduciendo la separación entre electrodos adyacentes 92, 94, permitiendo así la detección de concentraciones incluso menores de p-Ab.

[0051] Existen numerosas aplicaciones para los sensores 14, 90 descritos en la presente. Por ejemplo, los sensores 14, 90 se pueden utilizar para diagnóstico y cribado no invasivos de cáncer. Además, debido a que los sensores 14, 90 se pueden confeccionar para prácticamente cualquier molécula diana, los sensores 14, 90 también pueden emplearse en otras aplicaciones diagnósticas. Además, debido a la naturaleza compacta y robusta de los sensores 14, 90, pueden ser particularmente adecuados para proporcionar ensayos directos sensibles para aplicaciones de control y detección medioambiental. Por ejemplo, los sensores 14, 90 son capaces de operar durante varias horas en presencia de tampones de elevada fuerza iónica. Finalmente, los sensores 14, 90 también se pueden usar en biodefensa y otras aplicaciones.

[0052] Si bien se han mostrado y descrito formas de realización de la presente invención, se pueden realizar varias modificaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. La invención, por lo tanto, no debería limitarse, excepto a las reivindicaciones siguientes y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Ensamblaje de biosensor que comprende:
- 5 un electrodo de oro electroconductor operativamente acoplado a un analizador de impedancia para medir el cambio en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} del electrodo;
 una monocapa autoensamblada químicamente unida a una superficie del electrodo de oro electroconductor a través de un enlace tiol-oro; y
 una pluralidad de partículas víricas de fago unidas de manera covalente a la monocapa autoensamblada.
2. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, que comprende además una o varias macromoléculas dispuestas en la monocapa autoensamblada.
- 10 3. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, donde la pluralidad de partículas de fago comprende el bacteriófago M13.
4. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, donde la pluralidad de partículas de fago se une selectivamente con el antígeno prostático específico de membrana (PSMA).
- 15 5. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, que comprende además un procesador operativamente conectado al analizador de impedancia para el cálculo de una concentración de analito basado al menos en parte en el cambio medido de la impedancia resistiva ΔZ_{Re} .
6. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, donde la monocapa autoensamblada comprende éster tióctico de N-hidroxisuccinimida.
- 20 7. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, donde el electrodo electroconductor de oro comprende electrodos separados en forma de una matriz y donde cada electrodo de la matriz se acopla al analizador de impedancia a través de una circuitería de conmutación.
8. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, donde el analizador de impedancia está operativamente acoplado al electrodo electroconductor de oro para aplicar una corriente alterna en el intervalo de frecuencias de aproximadamente 2 kHz a aproximadamente 500 kHz.
- 25 9. Ensamblaje de biosensor según la reivindicación 1, que comprende además al menos un procesador operativamente acoplado al analizador de impedancia para la comparación del cambio en la impedancia resistiva medida ΔZ_{Re} con uno o varios valores preestablecidos, dicho al menos un procesador configurado para emitir una señal indicativa de la detección de analito basado al menos en parte en la comparación.
10. Método de detección de un analito en una solución de ensayo, que comprende:
- 30 provisión de un biosensor que comprende al menos un electrodo electroconductor de oro, una monocapa autoensamblada unida al electrodo electroconductor de oro a través de un enlace tiol-oro, y una pluralidad de partículas víricas de fago unidas de manera covalente a la monocapa autoensamblada;
 acoplamiento de al menos un electrodo de oro electroconductor a un dispositivo de medición de impedancia;
 35 exposición del biosensor a la solución de ensayo;
 medición del cambio en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} de al menos un electrodo electroconductor de oro;
 y
 detección de la presencia del analito basada al menos en parte en el cambio medido en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} de dicho al menos un electrodo electroconductor de oro, el cambio en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} que comprende la obtención de la diferencia de la impedancia resistiva medida ΔZ_{Re} de dicho al menos un electrodo electroconductor de oro cuando está unido al analito y cuando no está unido al analito.
- 40 11. Método según la reivindicación 10, que comprende además la determinación de la concentración del analito basada al menos en parte en una comparación del cambio medido en la impedancia resistiva ΔZ_{Re} de dicho al menos un electrodo electroconductor de oro y una curva de calibración.
- 45

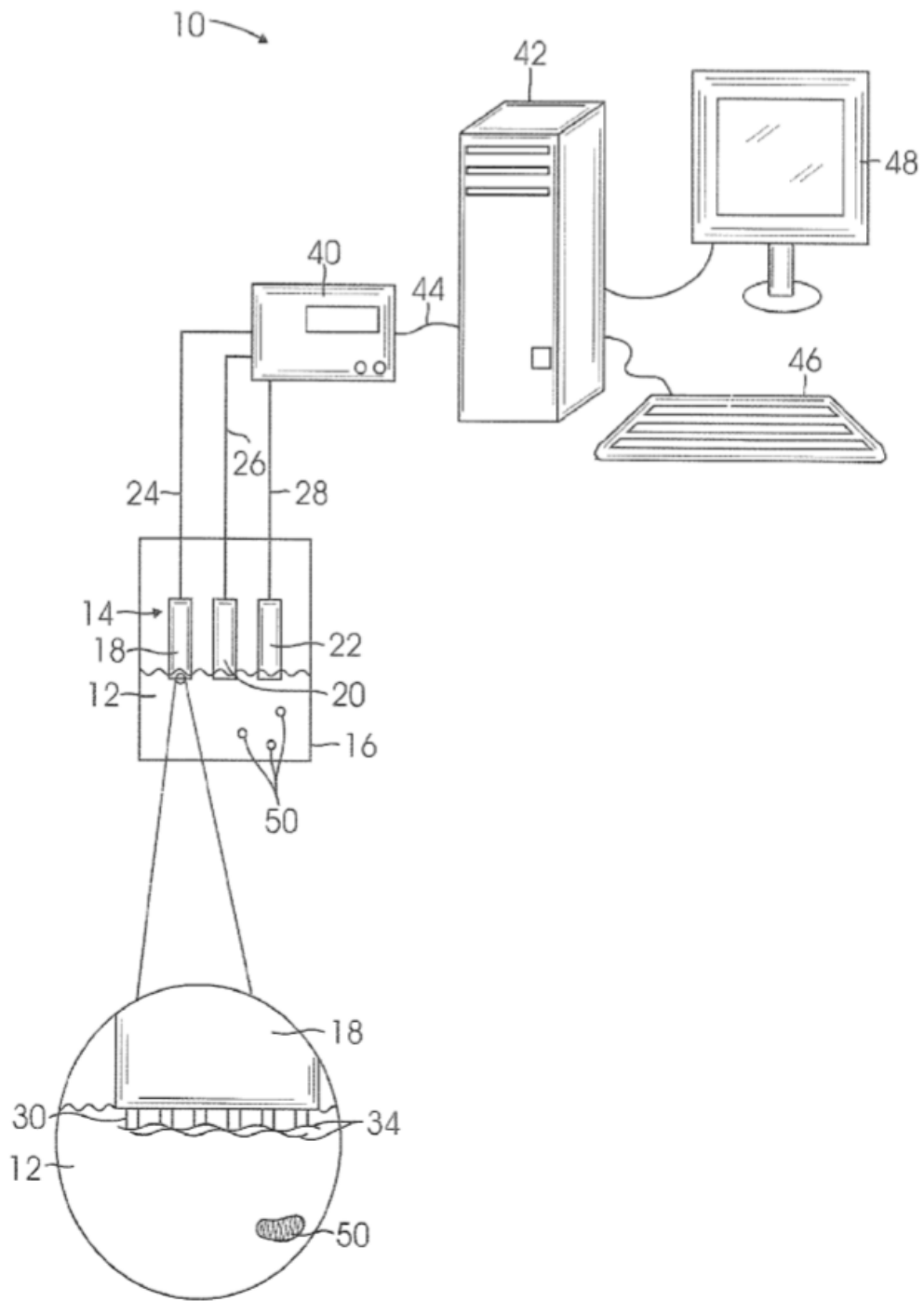


FIG. 1

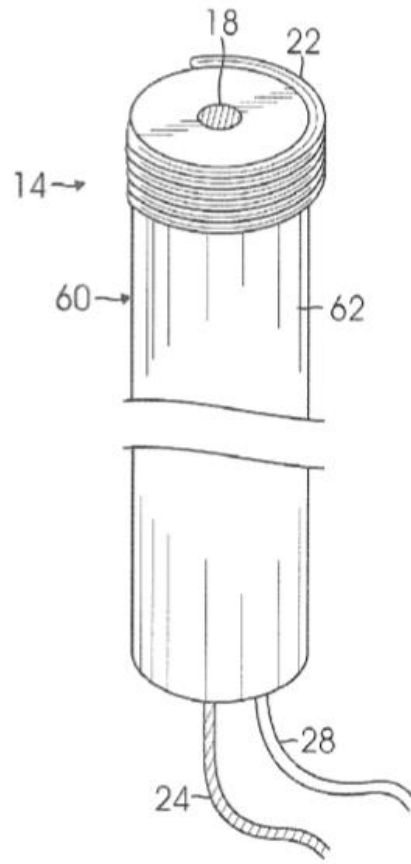


FIG. 2

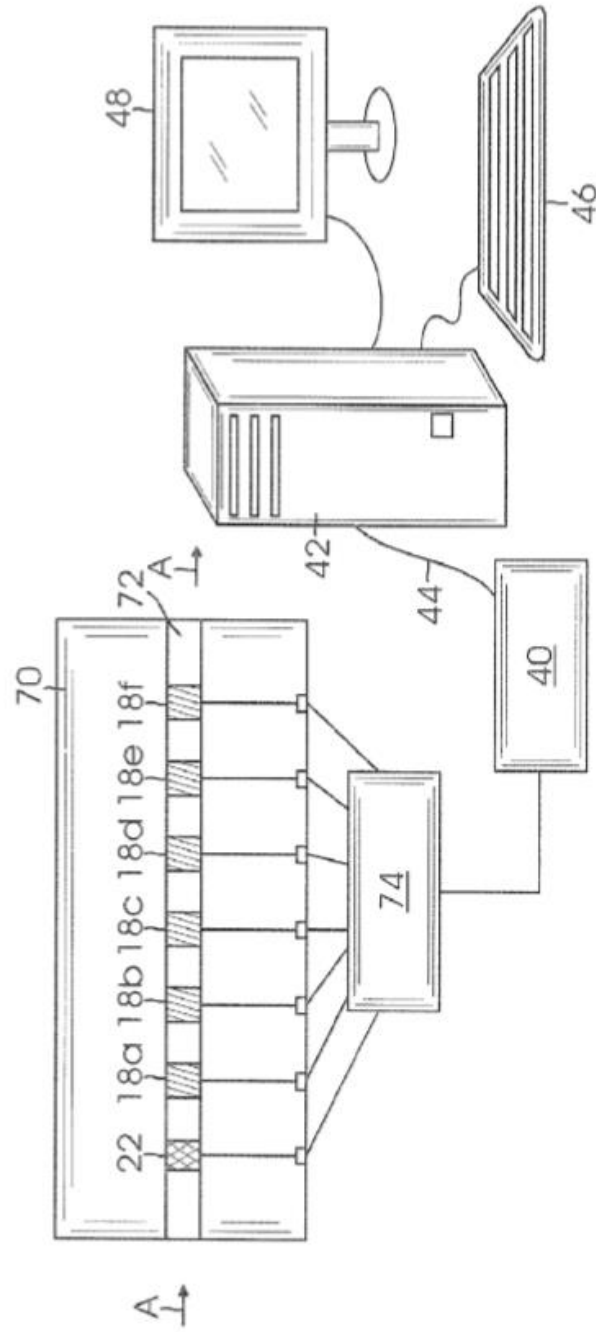


FIG. 3

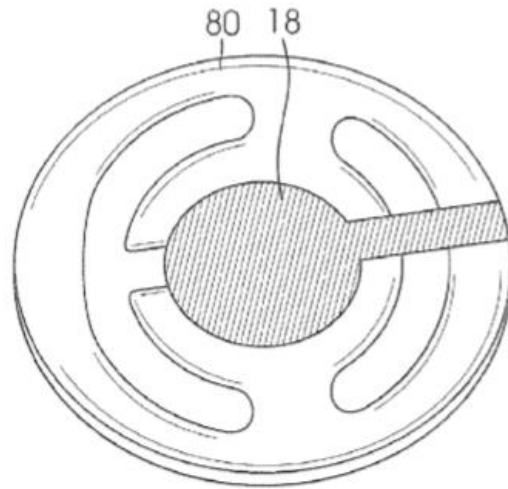


FIG. 4

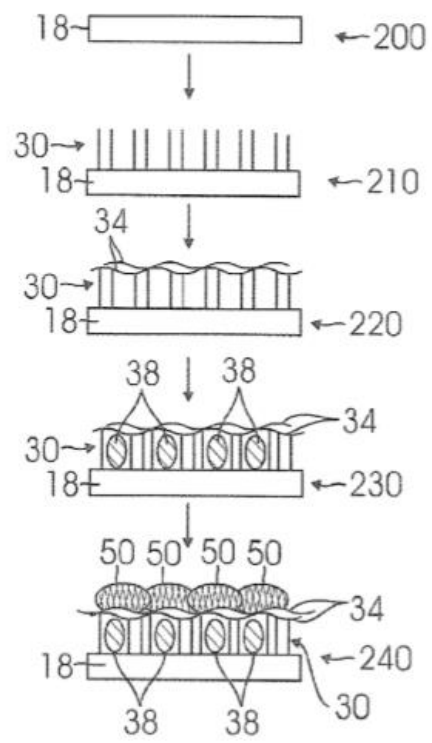
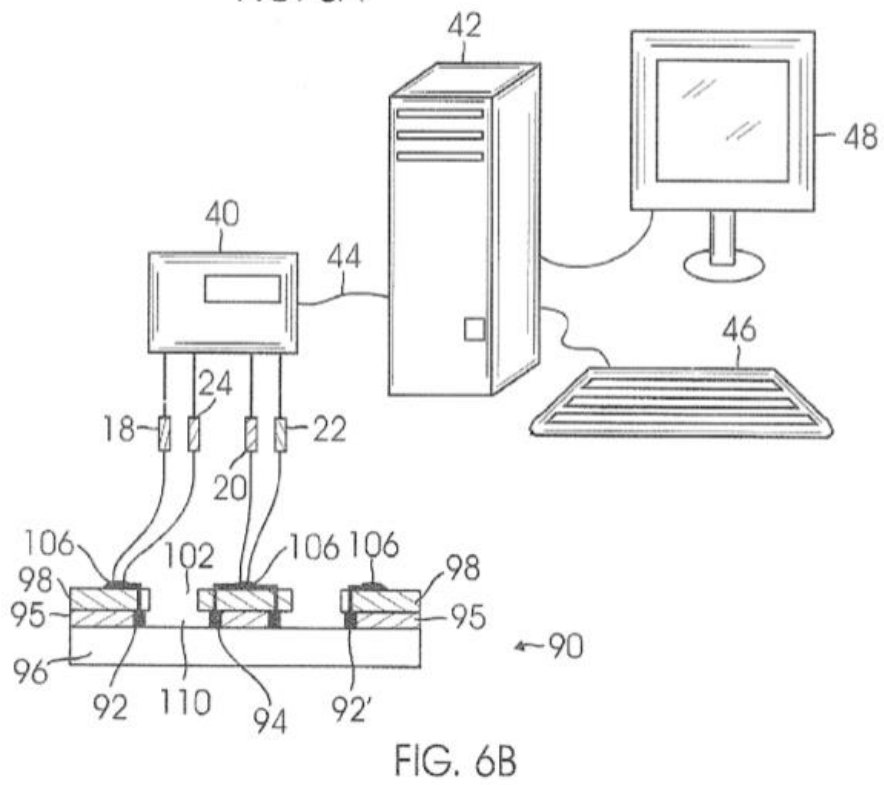
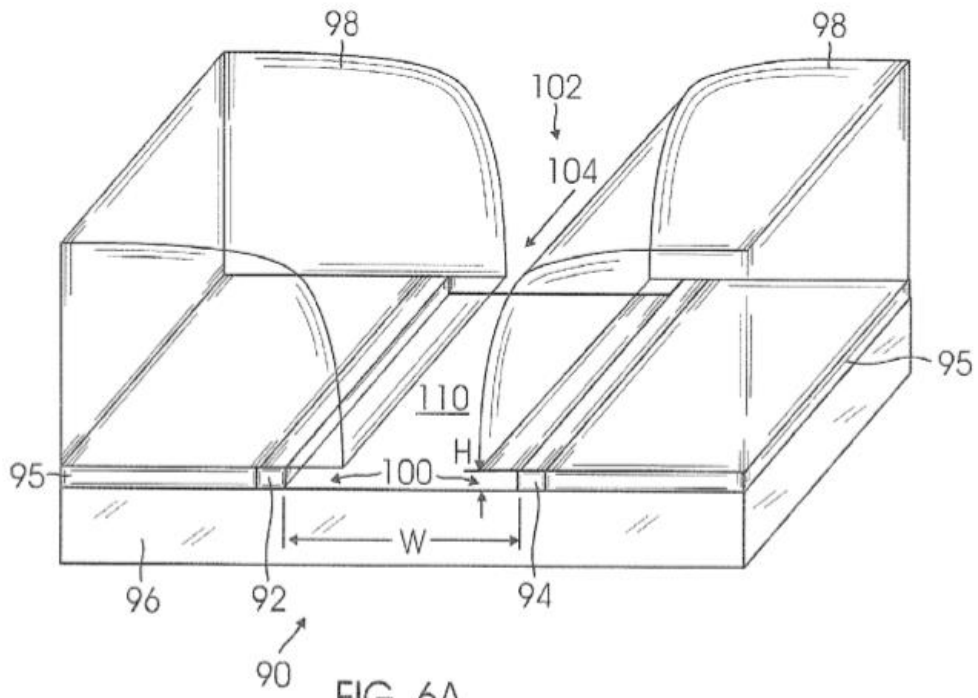
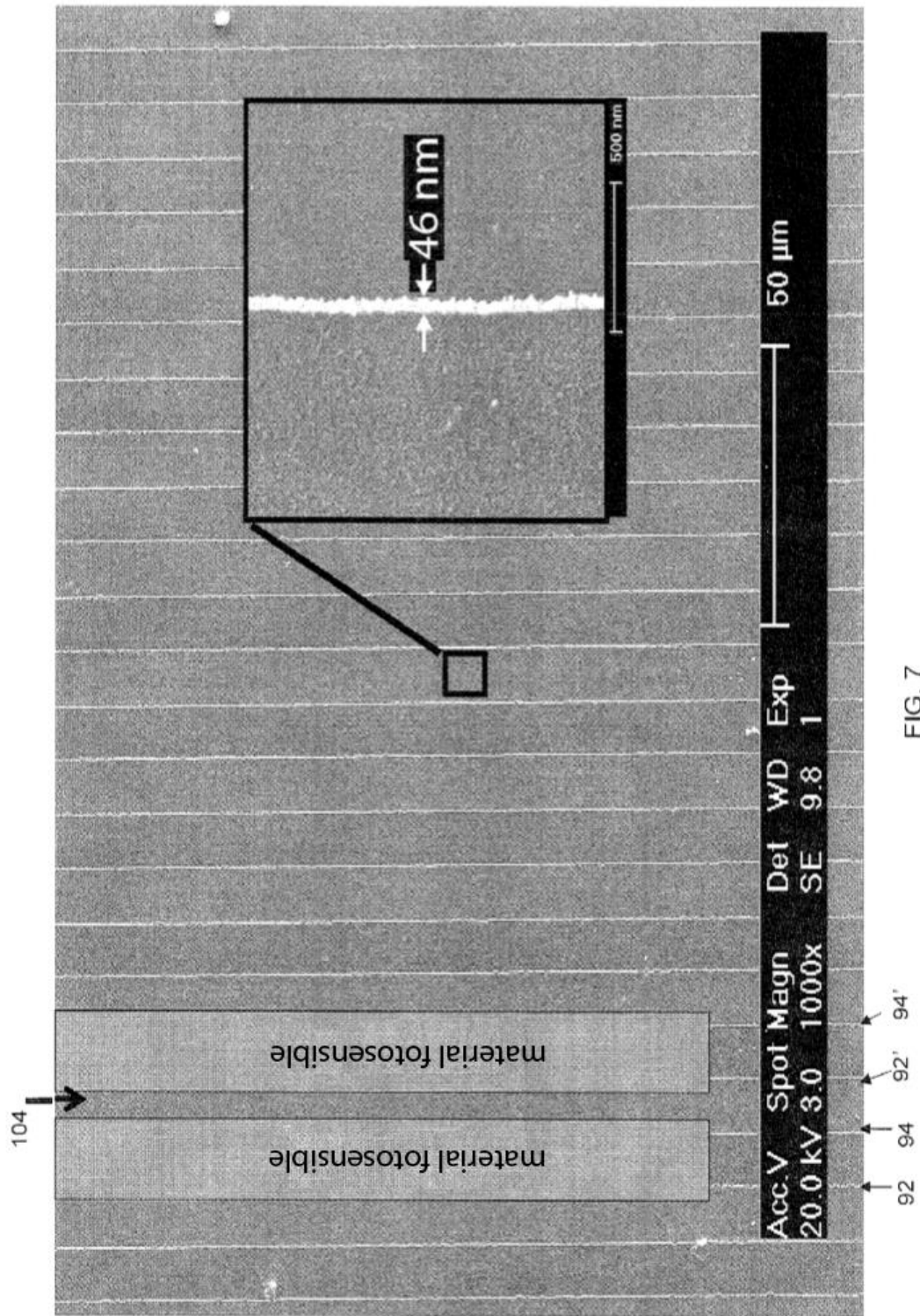


FIG. 5





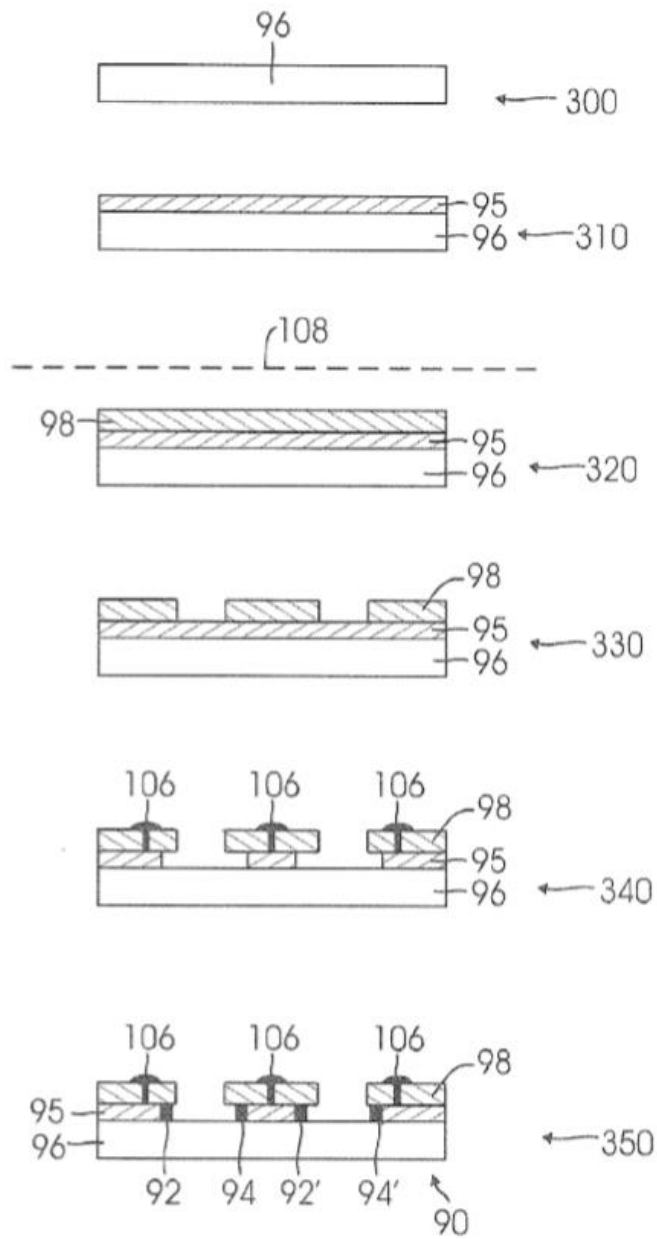


FIG. 8

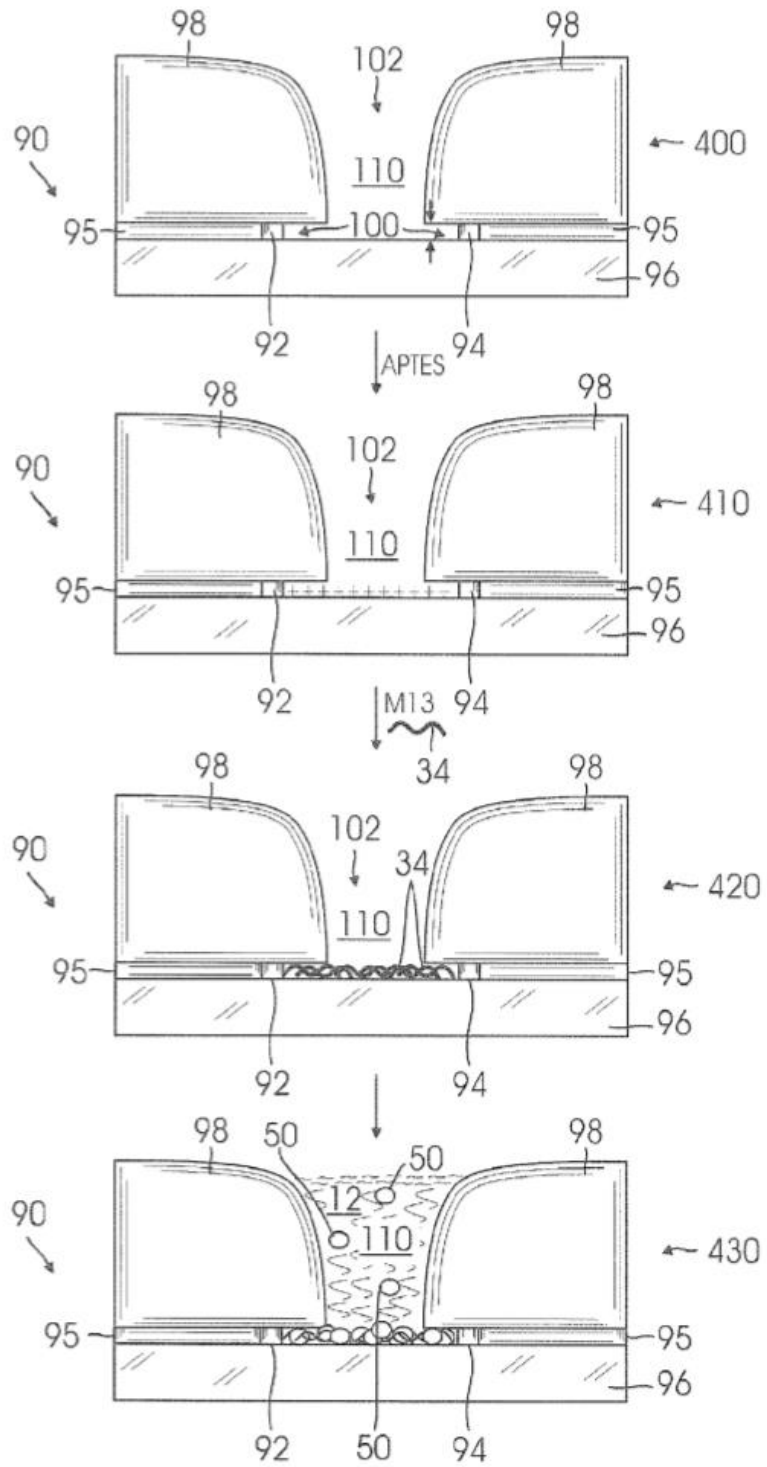


FIG. 9

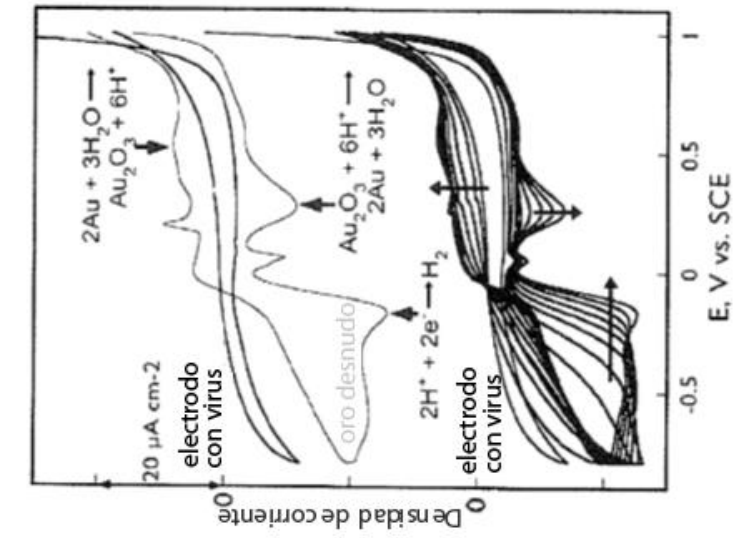


FIG. 10D

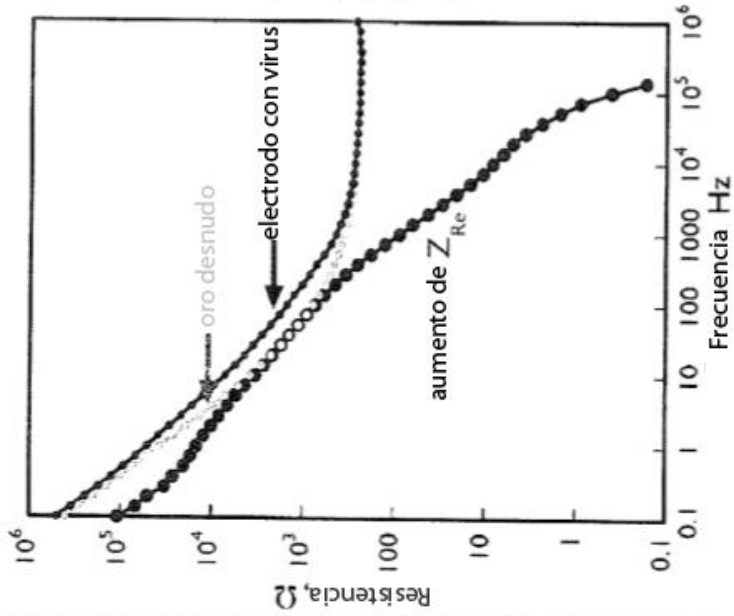


FIG. 10C

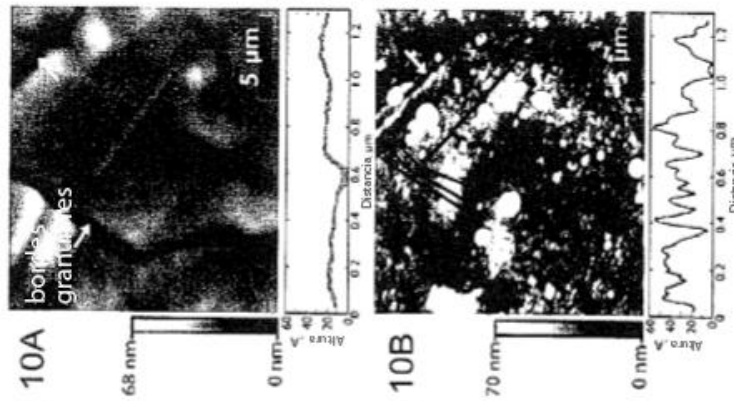


FIG. 10A

FIG. 10B

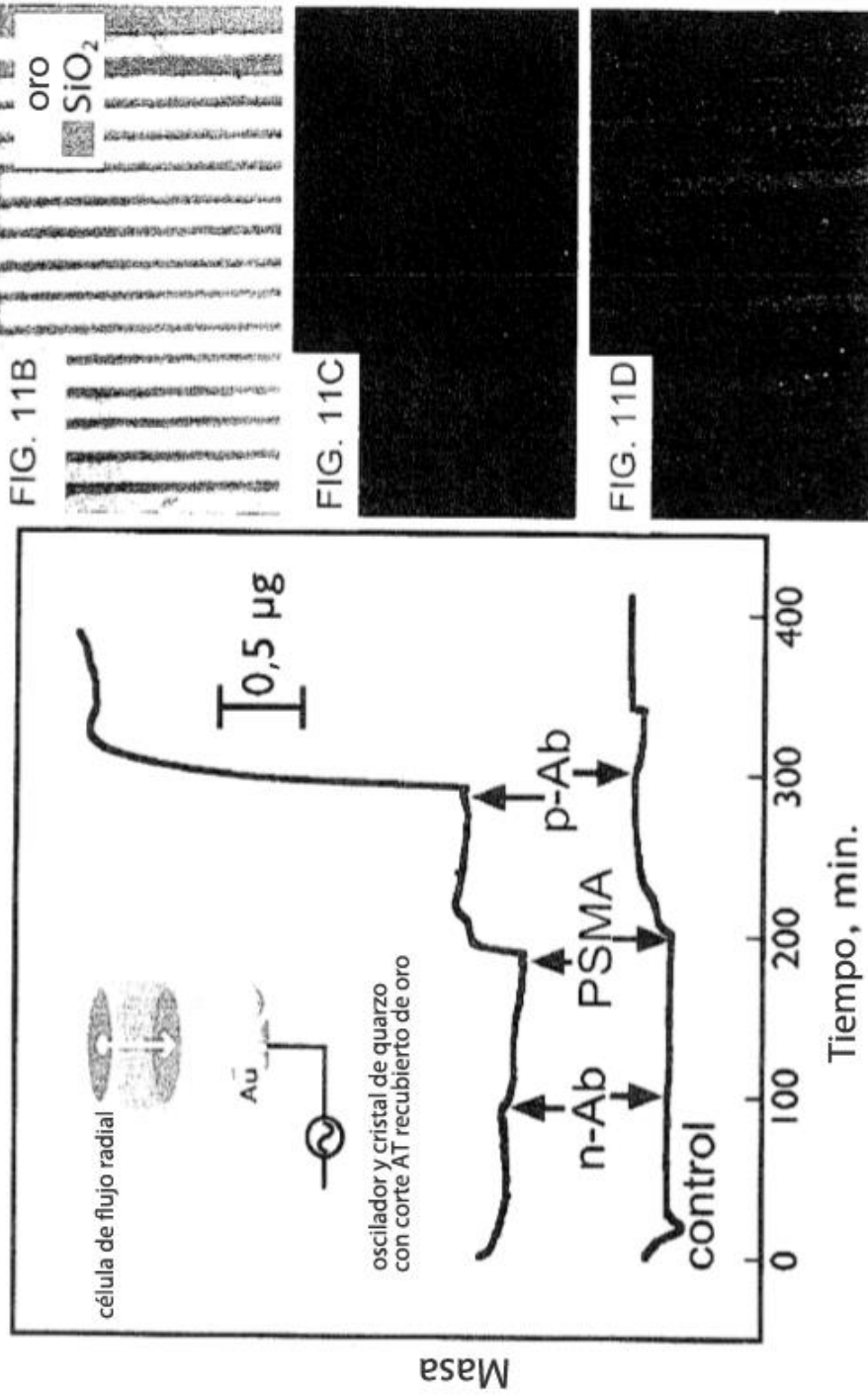
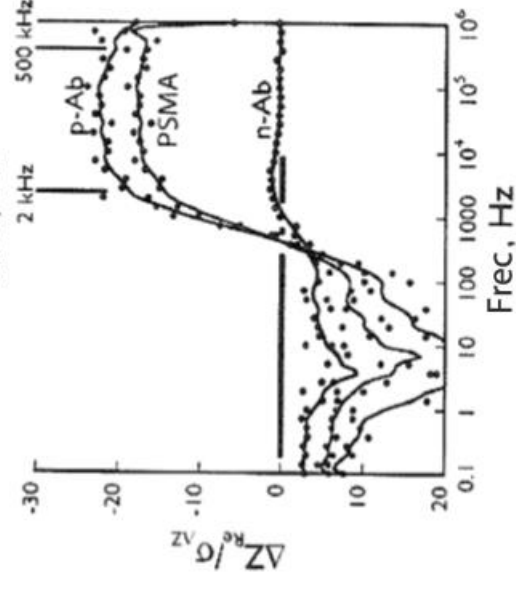
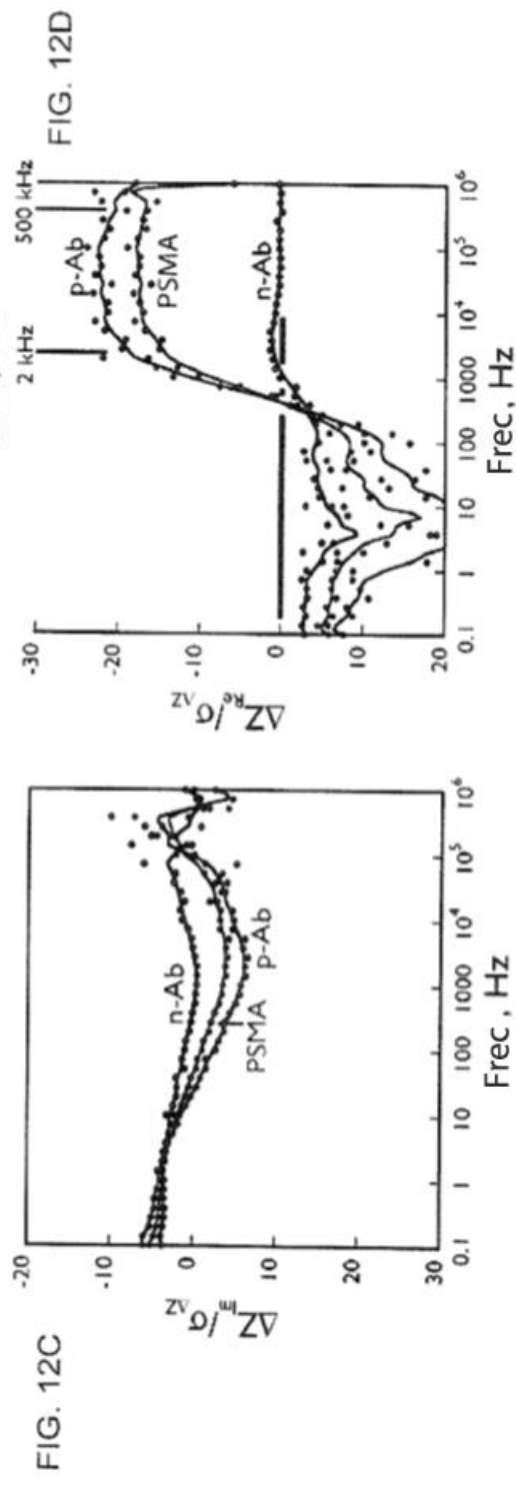
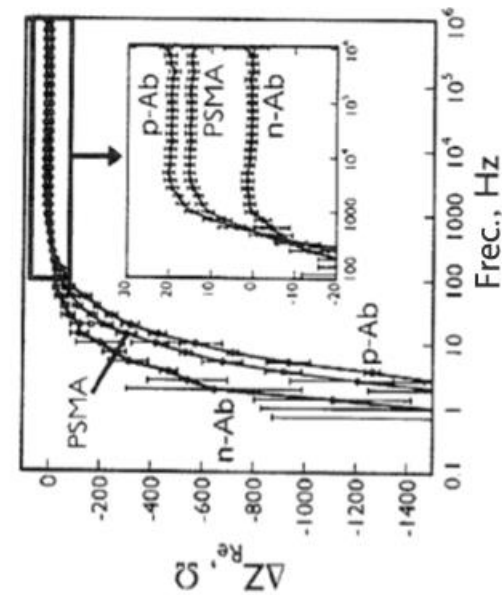
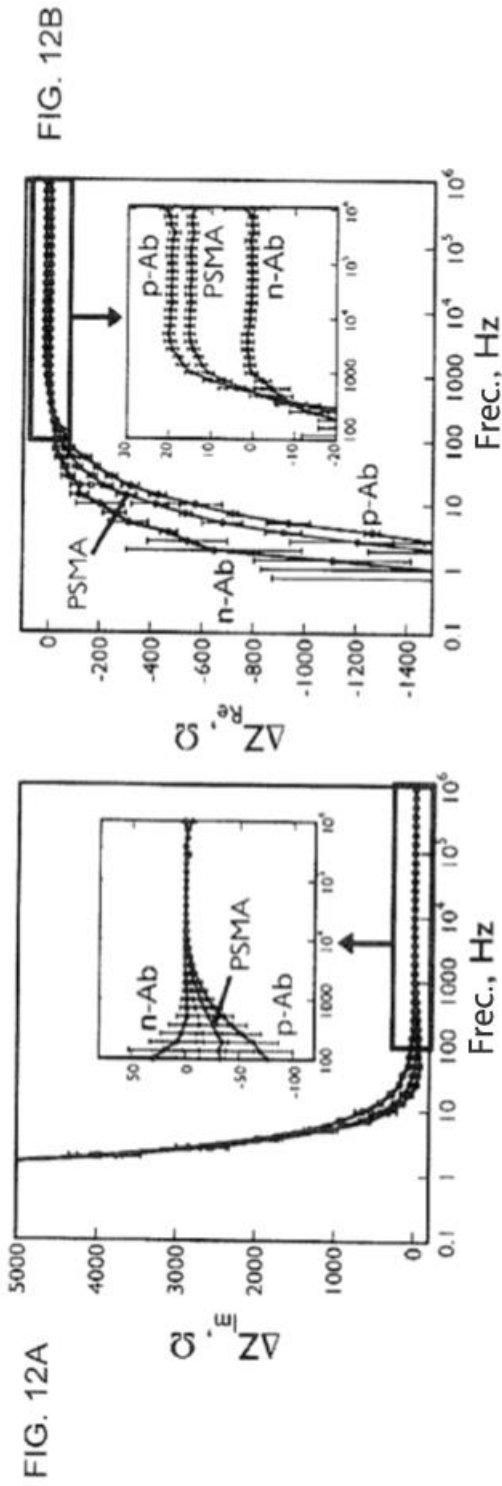


FIG. 11A



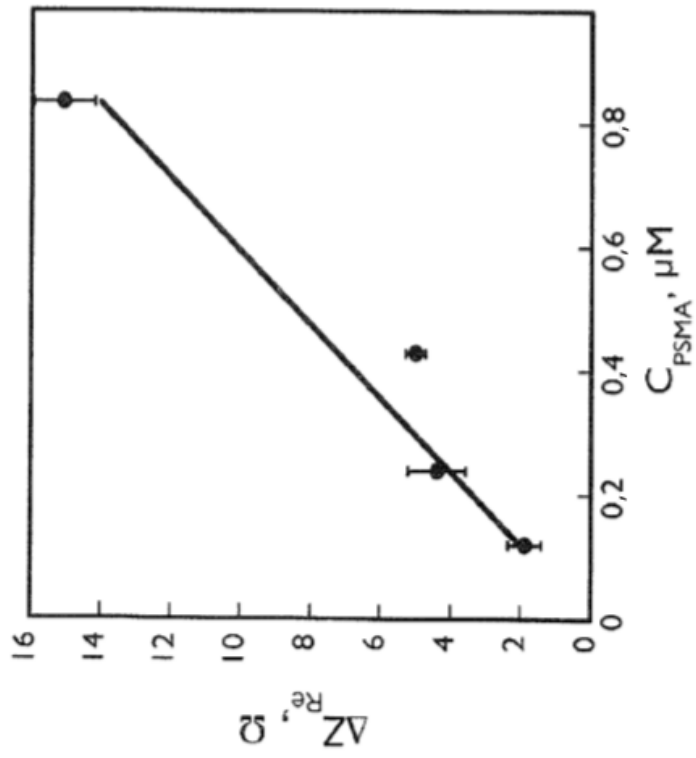


FIG. 13B

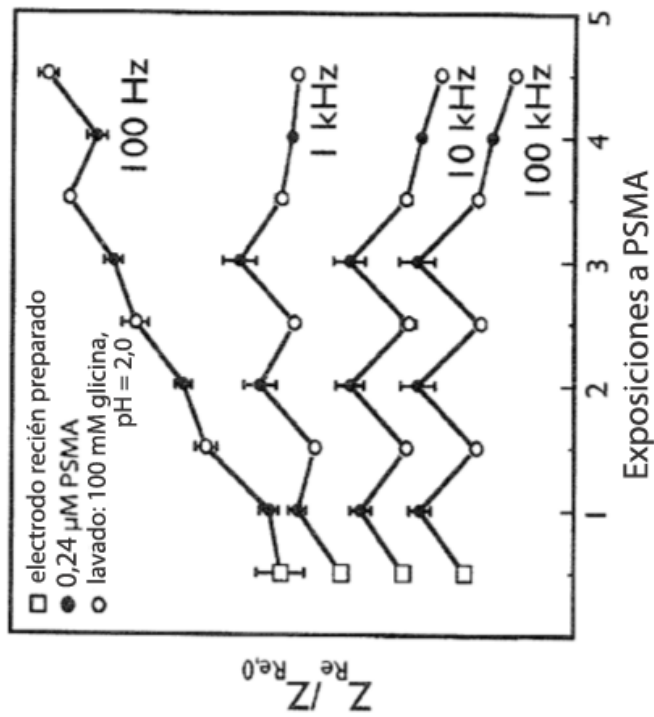


FIG. 13A

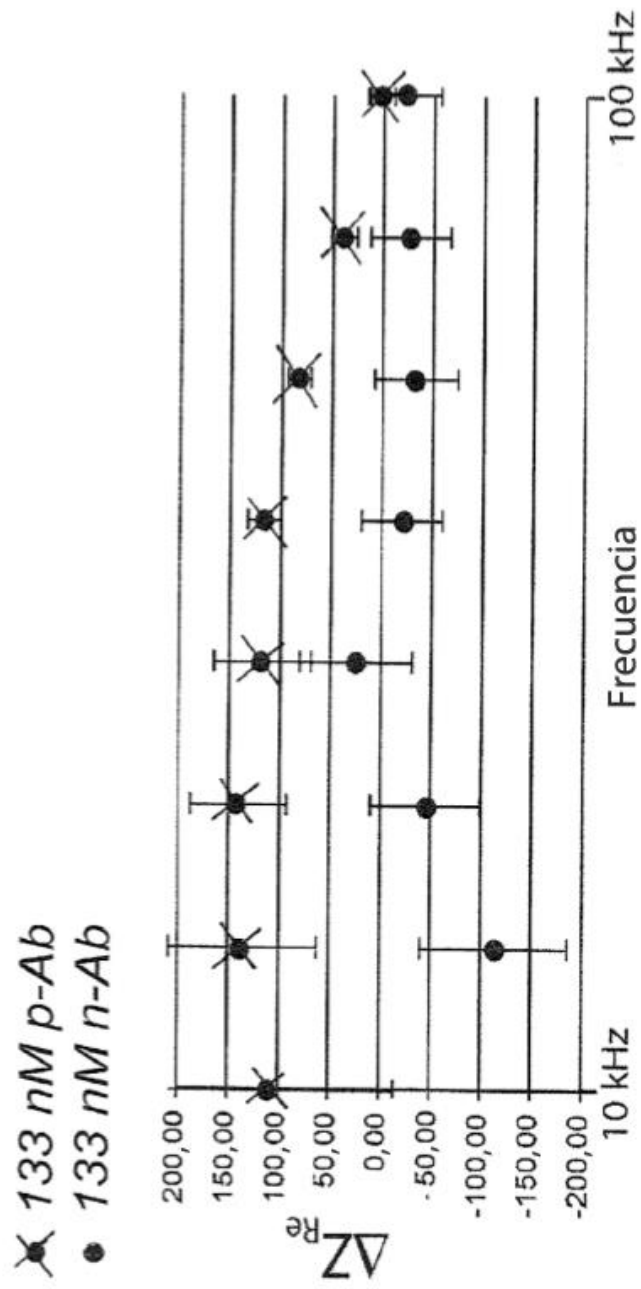


FIG. 14