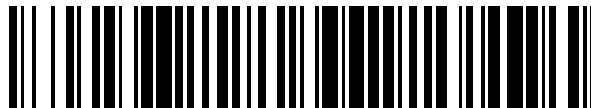


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 948**

51 Int. Cl.:

G01N 27/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2009** **E 17165963 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 3279651**

54 Título: **Métodos que utilizan microelectrodos y dispositivos biosensores que incorporan los mismos**

30 Prioridad:

02.09.2008 US 93667 P

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

26.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 732 948 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

Métodos que utilizan microelectrodos y dispositivos biosensores que incorporan los mismos

Antecedentes de la invención

5 El análisis genómico está revolucionando el diagnóstico temprano de la enfermedad y mejorando dramáticamente la atención al paciente (McGuire et al. *Science* 317: 1687, Srinivas et al., *Lancet Oncol.* 2: 698). Las micromatrices (Drmanac et al., *Science* 260: 1649, Hacia et al., *Nat. Genet.* 14: 441) y las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., *Science* 230: 1350) han ayudado, como herramientas, a encabezar esta revolución, permitiendo el descubrimiento y el desarrollo inicial de ensayos para pruebas en pacientes (Morris et al, *Curr. Opin. Oncol.* 19: 547). Sin embargo, extender el alcance de la revolución genómica a la cabecera del paciente exige herramientas rentables para el perfil individual de biomarcadores evaluado en relación con un estado de enfermedad postulado. Específicamente, las herramientas que permiten la atención de rutina del paciente serían preferiblemente más simples, más portátiles y menos costosas que los métodos basados en PCR, pero deberían conservar un alto grado de selectividad y sensibilidad.

15 El análisis de biomarcadores basado en la lectura electrónica ha sido citado por mucho tiempo como una metodología prometedora que permitiría una nueva familia de dispositivos basados en chips con un coste y sensibilidad adecuados para las pruebas médicas (Drummond et al., *Nat. Biotechnol.* 21: 1192, Katz et al., *Electroanalysis* 15: 913). La sensibilidad de la lectura electrónica es en principio suficiente para permitir la detección directa de pequeñas cantidades de moléculas de analito con una instrumentación simple. Sin embargo, a pesar de los tremendos avances en esta área, así como en los campos relacionados que trabajan hacia nuevos diagnósticos (Clack et al., *Nat. Biotechnol.* 26:825, Geiss et al., *Nat. Biotechnol.* 26 :317, Hahn et al., *Nano Lett.* 4 :51, Munge et al., *Anal. Chem.* 77 :4662, Nicewamer-Pena et al., *Science* 294 :137, Park et al., *Science* 295 :1503, Sinensky et al., *Nat. Nano.* 2 :653, Steemers et al., *Nat. Biotechnol.* 18:91, Xiao et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129:11896, Zhang et al., *Nat. Nano.* 1:214, Zhang et al., *Anal. Chem.* 76 :4093, Yi et al., *Biosens. Bioelectron.* 20:1320, Ke et al., *Science* 319:180, Armani et al., *Science* 317:783), los chips multiplexados actuales todavía tienen que lograr la detección electrónica directa de biomarcadores en muestras celulares y clínicas. Los desafíos que han limitado la implementación de tales dispositivos provienen principalmente de la dificultad de obtener límites de detección muy bajos en presencia de altos niveles de ruido de fondo presentes cuando se ensayan muestras biológicas complejas, y el desafío de generar sistemas multiplexados que sean altamente sensibles y específicos.

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

45 Se ha investigado el uso de electrodos de nanoalambres para la detección de proteínas y ácidos nucleicos ultrasensibles (Gasparac et al. *J Am Chem Soc* 126: 12270). El uso de esta plataforma de electrodos permite la detección electroquímica de los niveles picomolares de analitos, un nivel de sensibilidad que no es posible utilizando materiales a macroescala. Aunque se ha informado de que los nanoalambres son capaces de detectar los niveles de analitos attomolares, esto en realidad corresponde a los niveles picomolares cuando se trata con los volúmenes que típicamente se utilizan para el análisis. También se ha demostrado que los electrodos modificados con nanopartículas pueden exhibir varias ventajas sobre los macroelectrodos convencionales, tales como la mejora del transporte de masas, la catálisis, el área de superficie altamente efectiva y el control sobre el microentorno del electrodo (Katz et al. *Electroanalysis* 2004, 16, 19-44, Welch et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 601-619). La fabricación de matrices de electrodos de nanoalambres, sin embargo, no es trivial.

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

El análisis de paneles de biomarcadores de ácidos nucleicos o proteínas ofrece valiosa información de diagnóstico y pronóstico para la toma de decisiones clínicas. Los métodos existentes que ofrecen la especificidad y la sensibilidad para perfilar muestras clínicas suelen ser costosos, lentos y seriales. Por lo tanto, existe la necesidad de un dispositivo ultrasensible para detectar biomarcadores de una manera multiplexada.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención presenta microelectrodos nanoestructurados (NMEs). Los NME son electrodos, que se nanotexturan y, por lo tanto, tienen un área de superficie aumentada. Los NME preferidos están comprendidos de un metal noble, (por ejemplo, oro, platino, paladio, plata, osmio, indio, rodio, rutenio); aleaciones de metales nobles (por ejemplo, oro-paladio, plata-platino, etc.); polímeros conductores (por ejemplo, polipirol (PPY)); metales no nobles (por ejemplo, cobre, níquel, aluminio, estaño, titanio, indio, tungsteno, platino); óxidos metálicos (por ejemplo, óxido de zinc, óxido de estaño, óxido de níquel, óxido de estaño e indio, óxido de titanio, óxido de titanio dopado con nitrógeno (TiOxNy); siliciuros metálicos (siliciuro de níquel, siliciuro de platino); nitruros metálicos (nitruro de titanio (TiN), nitruro de tungsteno) (WN) o nitruro de tantalio (TaN), carbono (nanotubos, fibras, grafeno y amorfos) o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los NME de los materiales descritos anteriormente son altamente conductores y forman enlaces fuertes con sondas (por ejemplo, ácidos nucleicos y péptidos). Los NME preferidos tienen una altura en el rango de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 micrómetros (pm), por ejemplo en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 micrómetros (por ejemplo, 10 micrómetros); un diámetro en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 micrones y tienen una morfología a nanoescala (por ejemplo, están nanoestructuradas en una escala de longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 nanómetros y más preferiblemente en el rango de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 nanómetros). Los NME pueden tener cualquiera de una variedad de formas, incluyendo hemisférica, irregular (por ejemplo espigado, cíclico (similar a un alambre) o fractal (por ejemplo dendrítico). La superficie de un NME se puede recubrir adicionalmente con un material, que mantenga la alta conductividad del electrodo, pero facilite la unión con una sonda. Por ejemplo, los NME que contienen nitrógeno (por ejemplo, TiN, WN o TaN) pueden unirse con un grupo funcional de amina de la sonda. De manera similar, la química del silicio/silica como parte del NME puede unirse con un grupo silano o siloxano en la sonda.

En otro aspecto, la invención presenta un NME asociado con una sonda. En una realización, la sonda es un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN), un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un análogo de los mismos, que incluye, por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (ANP), que contiene un esqueleto compuesto por unidades de N-(2-aminoetil)glicina enlazadas por péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados u oligómeros de morfolino fosforodiamidato. Bajo condiciones apropiadas, la sonda puede hibridar con un ácido nucleico complementario para proporcionar una indicación de la presencia del ácido nucleico en la muestra. En otra realización, la sonda es un péptido o proteína (por ejemplo, un anticuerpo) que puede unirse o de otra manera, interactuar con un objetivo biomarcador (por ejemplo, un receptor o un ligando) para proporcionar una indicación de la presencia de ligando o receptor en la muestra. La sonda puede incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un NME. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones bicatenarias y/o monocatenarias, enlazadores poliT, dúplex bicatenarios como enlazadores rígidos y espaciadores PEG.

En un aspecto adicional, la invención presenta una pluralidad de NMEs dispuestos en un sustrato. Los sustratos preferidos comprenden un material semiconductor, tal como silicio, sílica, cuarzo, germanio, arseniuro de galio, carburo de silicio y compuestos de indio (por ejemplo, arseniuro de indio, indio, antimonida y fosfuro de indio), sulfuro de selenio, cerámica, vidrio, plástico, policarbonato u otro polímero o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los sustratos pueden incluir opcionalmente una capa de pasivación, que está compuesta de un material, que ofrece una alta resistencia y mantiene una pequeña área de superficie activa. Ejemplos de materiales apropiados incluyen: dióxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de silicio dopado con nitrógeno (SiOxNy) o paraliño. En ciertas realizaciones, la pluralidad de los NME dispuestos en el sustrato incluye sondas junto con espaciadores de monocapa, que minimizan la densidad de la sonda, maximizando así la eficiencia de complejación. Los espaciadores de monocapa preferidos tienen una afinidad por el metal y pueden comprender, por ejemplo, un alcohol tiol, tal como mercaptohexanol, alcanotioles, cisteína, cistamina, tiol-aminas, tioles aromáticos (por ejemplo, benceno tiol, ditiol), ácidos fosfónicos o ácidos fosfínicos.

Otro aspecto representa dispositivos biosensores, tales como circuitos integrados, que comprenden, por ejemplo, un sustrato; un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato; una capa aislante o de pasivación que cubre el cable, teniendo la capa aislante una abertura que expone una porción del cable; y un microelectrodo nanoestructurado en comunicación eléctrica con la porción expuesta del cable, estando el microelectrodo adaptado para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular (por ejemplo, hibridación de ácido nucleico o unión de proteína a proteína).

En todavía otro aspecto, la invención representa métodos para fabricar los NME. El uso de la electrodeposición para cultivar microelectrodos nanoestructurados a partir de una semilla de NME permite que los tamaños y las morfologías de estas estructuras se controlen con precisión, y la fabricación versátil de electrodos compuestos de una o una variedad de sustancias. Los NME pueden prepararse en un dispositivo biosensor, tal como un formato basado en chip, de tal manera que se puede hacer una serie de NMEs en un solo chip para permitir experimentos multiplexados. Este sistema de NME puede ser particularmente útil y versátil, permitiendo el ajuste de varios parámetros, que incluyen: el control a microescala del tamaño y la forma del NME, el control a nanoescala de la nanotextura del NME y la selección del material del NME.

Todavía otro aspecto representa métodos para fabricar dispositivos biosensores que tienen microelectrodos nanoestructurados. Por ejemplo, los métodos pueden comprender las etapas de proporcionar un sustrato y un cable

eléctricamente conductor sobre el sustrato, estando cubierto el cable por una capa aislante; grabar una abertura en la capa aislante para exponer una porción del cable; y electrodepositar un material eléctricamente conductor en la porción expuesta del cable para formar un microelectrodo nanoestructurado como se describe anteriormente.

5 En otro aspecto, se proporciona un cartucho biosensor que comprende: una cámara de muestra para contener una muestra biológica; una cámara biosensora para contener un dispositivo biosensor como se describe anteriormente y llevar a cabo un proceso biosensor.

10 En todavía otro aspecto, se proporciona una estación de trabajo de biosensores que comprende: un soporte de cartucho para contener un cartucho biosensor como se describe anteriormente; una punta de instrumento para acceder al cartucho biosensor; un mecanismo de selección para seleccionar un proceso biosensor a realizar; un procesador adaptado para llevar a cabo el proceso biosensor utilizando el cartucho biosensor y para determinar los resultados del proceso biosensor a partir de señales electrónicas generadas a desde el cartucho biosensor; y una pantalla para mostrar los resultados del proceso biosensor.

15 Un aspecto adicional representa métodos para llevar a cabo un proceso biosensor usando una sonda que contiene microelectrodos nanoestructurados incorporados en un dispositivo como se describió anteriormente; polarización del microelectrodo en relación con un electrodo de referencia; medir una carga de referencia o un flujo de corriente de referencia entre el microelectrodo y el electrodo de referencia; exponer el microelectrodo a un estímulo biomolecular (por ejemplo, hibridación entre una sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico complementario o unión entre una sonda peptídica y un asociado de unión presente en una muestra biológica); medir una carga o flujo de corriente generado en el microelectrodo en respuesta al estímulo biomolecular; y determinar la cantidad de estímulo biomolecular presente comparando la carga medida o el flujo de corriente medido contra la carga de referencia o el flujo de corriente de referencia.

20 Los NME son versátiles, robustos y fáciles de trabajar. Además, se pueden fabricar utilizando los procedimientos de fabricación de fundición CMOS de silicio existentes para la fabricación de metal superior, o simples extrapolaciones de los mismos, tal como la deposición electrolítica o la electrodeposición en capas de metal superior de una fundición CMOS, lo que permite que la fabricación de NME se integre fácilmente en las instalaciones de fabricación existentes. Además, los NME pueden unirse consistentemente a las moléculas de sonda. Además, los NME promueven el fácil acceso de las moléculas diana de tal manera que, cuando una molécula diana que es complementaria a la molécula de la sonda unida al NME entra en proximidad con esa sonda, la hibridación o la unión de proteína a proteína ocurre con alta probabilidad. Los NME son además compatibles con el rendimiento de la electroquímica electrocatalítica empleada en la lectura del evento de hibridación.

Otras características y ventajas de las invenciones divulgadas en este documento se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 es un esquema de un dispositivo biosensor de NME;

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

40 La Figura 4 son imágenes SEM de los NME con grados crecientes de nanoestructuración;

La Figura 5 ilustra las etapas involucradas en la detección de secuencias específicas utilizando un NME;

La Figura 6 es una vista en sección transversal de un circuito integrado que tiene un NME;

La Figura 7 es un diagrama de circuito de un circuito que se puede usar con un NME;

La Figura 8 es una ilustración de un dispositivo biosensor que tiene una matriz de NMEs;

45 La Figura 9 es una ilustración de un dispositivo biosensor que tiene diferentes NME;

La Figura 10 es una ilustración esquemática de un cartucho biosensor; y

La Figura 11 es una ilustración esquemática de una estación de trabajo biosensor.

Descripción detallada de la invención

50 La presente divulgación describe microelectrodos nanoestructurados (NMEs), que pueden usarse en un dispositivo biosensor, tal como un chip biosensor.

NMEs

La Figura 1A muestra un diagrama esquemático de un dispositivo de ejemplo que incorpora los NME. En el ejemplo que se muestra, el dispositivo es un chip que tiene una matriz de ocho cables. En este ejemplo, el NME se forma en cables de oro que se estrechan a un ancho de 5 micrones. El cable se proporciona sobre un sustrato de Si y SiCte, aunque se pueden usar otros materiales de sustrato adecuados. Sobre la parte superior del cable, se deposita una capa aislante, tal como SiO₂, para aislar eléctricamente y pasivar el cable. Una abertura, en este caso un orificio de 500 nm, se crea en la capa aislante para exponer una porción del cable.

La Figura 1B es una vista lateral de la porción del chip donde se encuentra la abertura, que muestra las capas del dispositivo. Las técnicas de fotolitografía más comúnmente conocidas pueden ser adecuadas para crear una abertura, tal como aberturas de 100 nm a 1 µm de diámetro. Esto se puede lograr típicamente en instalaciones de fabricación existentes con alta robustez y capacidad de reproducción. Dado que solo esta superficie expuesta es electroquímicamente activa, la electrodeposición (Menke et al. Nature Mater. 2006, 5, 914-919) puede usarse para hacer crecer un NME dentro de este espacio.

Figura 1C es un esquema de una sección transversal de un ejemplo de deposición de NME, utilizando Pd para el NME. Este proceso se describirá con mayor detalle a continuación.

Ahora se hace referencia a la Figura 2, que también ilustra la formación de un NME en un chip. Como en la figura 1A, se proporcionan pequeños electrodos in situ en un chip, con la posición y el contacto eléctrico de los NME definidos fotolitográficamente. Como en la Figura 1, este chip es un chip pasivo multiplexado 8 veces. En un sustrato de silicio, se modela una capa de oro de ~350 nm de espesor, utilizando técnicas de fotolitografía convencionales, para conectar ocho conectores de Au de 5 µm de ancho a grandes almohadillas metálicas para la conexión a instrumentos fuera del chip. Se deposita y modela una capa de SiO₂ aislante sin agujeros para pasador para crear aberturas de ~500 nm (por ejemplo, mediante grabado) al final de cada uno de los cables de Au, para exponer una sección del cable. Luego se coloca un NME de metal en esta abertura usando electrodeposición.

El NME puede comprender diferentes materiales conductivos. Algunos ejemplos de los NME se han formado de la siguiente manera, aunque las variaciones son posibles y se describirán con mayor detalle a continuación: Los NME de Pd fractales ramificados se depositaron en una solución acuosa que contiene 5 mM de H₂PdCl₄ y 0.5 M de HClO₄ utilizando una amperometría de potencial de DC a -250 mV durante 15 s. Los NME de Pd hemisféricos con rugosidad a nanoescala se depositaron en una solución acuosa que contenía 5 mM de H₂PdCl₄ y 0.5 M de HCl utilizando una amperometría de potencial de DC a -100 mV durante 300 s. Los NME de Pd semiesféricos lisos se fabricaron en la misma solución a 0 mV durante 300 s. Los NME de Au se fabricaron en un baño de oro que contenía una solución 0.01 M de HAuCl₄ y 0.5 M de H₂SO₄ a -100 mV durante 40 segundos. Los NME de Pt se fabricaron en un baño de platino que contenía una solución 5 mM de H₂PtCl₆ y H₂SO₄ 0.5 M a -100 mV durante 500 s. El tamaño y la morfología del NME se pueden controlar variando la concentración de sal metálica, el tipo y la concentración del electrolito de soporte y el potencial y la duración de la electrodeposición.

La Figura 3 es un esquema de un NME con sondas con espaciadores en la monocapa de la sonda y entre el electrodo y la sonda. Una solución química que contiene un catión metálico se puede poner en comunicación con la superficie del NME y un electrodo de referencia. El electrodo de referencia puede ser un NME o un electrodo convencional en el mismo cable. Se puede proporcionar una polarización eléctrica entre el NME y el electrodo de referencia. La solución química se puede eliminar y lavar los electrodos. Una solución que contiene la molécula de la sonda puede ponerse en comunicación con la superficie del NME. La molécula de la sonda se puede modificar o funcionalizar de tal manera que se una a la superficie del NME. Por ejemplo, la molécula de la sonda puede estar funcionalizada con un grupo tiol, amina o carboxilato.

Los NME con nanoestructuración creciente se muestran en la Figura 4. Inesperadamente, la variación de las condiciones de electrodeposición permitió el crecimiento de microelectrodos hemisféricos extremadamente suaves (izquierda); estructuras fractales de nanoescala altamente ramificadas (derecha); o hemisferios con rugosidad a nanoescala (centro). La estructura de la izquierda se realizó con HC 1 como electrolito de soporte con un potencial aplicado de 0 mV. Las estructuras centrales también se hicieron con HC1 como electrolito de soporte pero con un potencial aplicado de -100 mV. La estructura de la derecha se realizó con HClO como electrolito de soporte y un potencial aplicado de -250 mV. La barra de escala en la figura corresponde a 5 µm a menos que se indique otra cosa.

La Figura 5 ilustra etapas involucradas en la detección de secuencias específicas (Lapierre et al., Anal. Chem. 75: 6327, Ratilainen et al., Biochemistry 39: 7781, Tomlins et al., Science 310: 644). En este ejemplo, Los NME de Pd primero se modifican con secuencias de sonda derivadas de tiol, y luego se hibridan las secuencias diana. La presencia del objetivo se transduce luego utilizando un sistema informador electrocatalítico. La electrocatalisis proporciona amplificación electrónica, o ganancia, que facilita la lectura de alta sensibilidad: cientos de electrones pueden resultar de cada evento de complejación biomolecular. La metodología utilizada aquí se basa en el receptor de electrones primario Ru(NH₃)₆³⁺, que es atraído electrostáticamente a las superficies de los electrodos a niveles que están correlacionados con la cantidad de ácido nucleico unido. La inclusión de Fe(CN)₆³⁻ durante la lectura electroquímica sirve para regenerar el sustrato de Ru(III), ya que la especie de Fe(III) es incluso más fácil de reducir, pero se repele

electrostáticamente desde el electrodo y, por lo tanto, solo sufre una reducción química por Ru(II). Este método también está libre de etiquetas y no requiere que la muestra se procese de ninguna manera.

5 El dispositivo biosensor puede proporcionarse en forma de un chip, tal como un chip de circuito integrado (IC). En general, un IC que incorpora el NME puede tener un sustrato con un cable eléctricamente conductor que está cubierto por una capa aislante. La capa aislante tiene una abertura que expone una parte del cable, y el NME se proporciona en la porción expuesta del cable. El NME responde a un estímulo biomolecular. En particular, el NME puede funcionalizarse con moléculas de sonda que experimentan una reacción de hibridación con una biomolécula diana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico), dando como resultado una carga generada en el NME. El IC también tiene un almacenamiento de carga (por ejemplo, un condensador o una batería) en comunicación eléctrica con el cable para almacenar esta carga generada. En el uso típico, el NME puede estar expuesto a una muestra durante un tiempo conocido o un período de integración, y la carga almacenada durante ese tiempo sería indicativa de la presencia y/o cantidad de la biomolécula diana.

10 La carga almacenada puede comunicarse a un dispositivo informático para análisis, o puede mostrarse (por ejemplo, a través de un componente de pantalla digital) para la lectura directa de la carga almacenada después del período de integración.

15 Dicho IC puede fabricarse utilizando un equipo de fabricación de IC común, lo que permite que este dispositivo se fabrique fácilmente y sea menos costoso que otras formas de microelectrodos biosensores. Los materiales utilizados pueden ser los que ya se utilizan comúnmente en la fabricación de IC. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de silicio, cuarzo, vidrio, cerámica, sílica, zafiro, arseniuro de galio u otros materiales que se usan actualmente para los CI. Los sustratos o soportes pueden incorporar material conductor para servir como un electrodo. También se pueden utilizar soportes conductivos con una superficie de oro. Los soportes usualmente comprenden una superficie plana (aplanada), o al menos una estructura en la que las sondas o p a interrogar están aproximadamente en el mismo plano. El soporte puede ser un electrodo, o puede estar unido a un electrodo.

20 El cable puede estar hecho de Au, Al, W, TiN, polisilicio u otros materiales cables de uso común. El IC puede incluir un transistor, tal como un transistor de efecto de campo (FET) que incluye FETs de canal de silicio de tipo n y FETs de canal de silicio de tipo p, o un transistor bipolar que incluye transistores de unión bipolar n-p-n y transistores de unión bipolar p-n-p.

25 El IC puede proporcionarse con, sumergirse o exponerse de otro manera a una solución electrocatalítica en comunicación química y eléctrica con el NME. Esto puede ayudar en la generación de carga en el NME.

30 Ahora se hace referencia a la Figura 6. Esta figura muestra una sección transversal de un circuito integrado adecuado para detectar la presencia de biomoléculas en una muestra biológica. El sustrato (1) es un sustrato de dispositivo semiconductor convencional tal como silicio. El canal de un transistor (2), un óxido de compuerta (3) y un electrodo de compuerta de polisilicio (4) se muestran para ilustrar el uso de la electrónica CMOS convencional para formar los transistores del circuito integrado. Se usa un metal (5) para poner en contacto el electrodo de la compuerta. Un óxido de pasivación (6) separa los niveles de transistor de silicio por debajo de la superficie superior del chip de arriba. Una serie de viales (7) metálicos e interconexiones proporcionan rutas selectivas para la comunicación eléctrica entre la capa del transistor y el (los) electrodo (s) superior (es). Una superficie superior sustancialmente plana es una combinación heterogénea de electrodos (9) superiores y material (8) aislante superior. La figura ilustra un NME (10) provisto en el electrodo, por ejemplo, utilizando los métodos descritos anteriormente. La figura ilustra biomoléculas (11) de sonda, tal como los ácidos nucleicos terminados con tiol que se muestran para una hibridación eficiente con moléculas diana complementarias. Se puede emplear una solución (12) electrocatalítica para proporcionar una lectura catalítica de la hibridación con las biomoléculas (11). Los potenciales eléctricos se transmiten y las corrientes fluyen de forma continua desde el NME (10) a través de los contactos (9) (7) (5) (4) eléctricos hasta el circuito electrónico que se encuentra debajo.

35 Ahora se hace referencia a la Figura 7, que muestra un diagrama de circuito de un circuito de ejemplo que puede usarse con el NME divulgado. En este ejemplo, el circuito puede proporcionar las siguientes funciones: polarización del NME funcionalizado con la sonda; integración de la corriente que fluye a través del NME en un almacén de carga que tiene una capacidad conocida de almacenamiento de carga; lectura del voltaje en el almacén de carga; y la selección del almacén de carga o NME de interés cuando se proporciona una matriz bidimensional de almacenes y electrodos en el contexto de un chip de matriz altamente multiplexado.

40 Ahora se describen los componentes del circuito de ejemplo. Se proporciona un voltaje de polarización en V_{bias} ; una selección típica de polarización puede estar en el rango de aproximadamente 0.1 a 2.8 V. Se proporciona un voltaje de polarización V_{biasD} en el drenaje de la fuente-seguidor; una selección típica puede estar en el rango de aproximadamente 0.1 a 2.8 V. Se proporciona un voltaje de polarización V_{biasR} en el nodo de reinicio; una selección típica puede ser un valor ajustable entre aproximadamente -2 V y 2.8 V. Los voltajes de señal son V_{src} , que pueden estar típicamente en el rango de aproximadamente 1.5 – 2.5 V. El voltaje de columna V_{col} puede estar en el rango de aproximadamente 1.5 V - 0.5 V. Las señales de control de tiempo incluyen que para la selección de fila (por ejemplo, el rango puede ser de aproximadamente 0-2.8 V) y para el restablecimiento (por ejemplo, el rango puede ser de

aproximadamente 0-4 V). Los transistores pueden ser el transistor de reinicio Tr (Reinicio), el transistor de búfer de lectura TR (seguidor de fuente) y el transistor de selección de fila TR (selección de fila).

Las polarizaciones anteriores, los voltajes de señal y las señales de control de temporización son solo ejemplos y se pueden usar otros valores. Estas polarizaciones, voltajes y señales pueden seleccionarse o ajustarse para adaptarse a ciertas aplicaciones o condiciones de fabricación, como se conoce comúnmente en la técnica. En este ejemplo, el NME funcionalizado con la sonda puede incluir un NME funcionalizado utilizando una sonda de ácido nucleico tiolado, por ejemplo una sonda como la descrita anteriormente. V_{src} se aplica al electrodo funcionalizado con la sonda y V_{biasR} se aplica a un segundo electrodo, que puede ser un NME o cualquier otro electrodo común, en comunicación eléctrica con la solución electrocatalítica. Esto da como resultado una diferencia de voltaje entre el electrodo funcionalizado con la sonda y la solución electrocatalítica. Por lo tanto, una corriente puede fluir como consecuencia de esta diferencia de potencial. La cantidad de corriente que fluye puede depender típicamente de la cantidad de hibridación en el NME funcionalizado con sonda, es decir, la corriente puede ser indicativa de la cantidad de objetivo así detectada por el NME.

Ahora se describe la operación del circuito de ejemplo. Con el fin de capturar la corriente que fluye, $I_{sentido}$, el transistor de reinicio se enciende al configurar el 'reinicio' del nodo lo suficientemente alto (por ejemplo, hasta 4V, que puede ser a través de una bomba de carga en el chip o un circuito regulador como se conoce comúnmente en la técnica) de modo que el nodo 11 se cargará a un voltaje igual a V_{bias} (nodo 6) que se puede establecer típicamente en el riel de suministro: por ejemplo, 2.8V. Esta es la fase de reinicio. Una vez que se completa esta operación de 'reinicio', el Nodo 5 puede configurarse en OV para apagar el transistor de reinicio Tr(Reinicio) (1). Al hacerlo, la inyección de carga y los efectos parásitos de alimentación capacitiva causarán que el nodo 11, que ahora se convierte en un nodo flotante, caiga en aproximadamente 300 mV. Por lo tanto, después de la operación de 'reinicio', el valor real de voltaje de 'reinicio' en el nodo 11 es aproximadamente 2.5V. En este momento, el flujo $I_{sentido}$ de corriente depende del voltaje aplicado (es decir, $V_{src}-V_{biasR}$). Dado que V_{biasR} puede ajustarse arbitrariamente a cualquier nivel de voltaje de -2V a 2.8V, se puede ajustar la diferencia de potencial aplicada. El $I_{sentido}$ de corriente descarga la capacitancia parásita en el nodo V_{src} (11) y su nivel de voltaje cae a una tasa que depende del valor de la capacitancia parásita en V_{src} (nodo 11), así como el flujo de $I_{sentido}$ durante el tiempo de integración. Después de un tiempo de integración específico, el voltaje integrado resultante en el nodo 11 se leerá a través de los transistores TR (fuente-seguidor) y TR (selección de fila), el transistor de memoria intermedia del seguidor de fuente y el transistor de selección de fila, configurando el nodo SEL (8) a un nivel alto (2.8V).

El almacén de carga que se descarga en el nodo 11 puede comprender la capacitancia parásita de uno o más de los transistores que están en comunicación eléctrica con el electrodo de la región de pixel en VSRC (nodo 11). El electrodo en VSRC (nodo 11) puede estar en comunicación eléctrica con la compuerta de un transistor, tal como Tr (seguidor de fuente) 2, que proporciona una capacitancia parásita. En una realización de ejemplo, el almacén de carga puede proporcionarse al menos en parte por una capacitancia parásita entre la compuerta y el drenador del transistor seguidor de fuente, Tr(seguidor de fuente) 2, y una capacitancia parásita entre la fuente y el sustrato del transistor de reinicio, Tr(Reinicio) 1. Estas son capacitancias parásitas entre las estructuras sobre el sustrato semiconductor (por ejemplo, el poli, n- pozos y sustrato) sobre el que o en el que se forma el circuito de pixel. En una realización de ejemplo, estas capacidades parásitas pueden estar en el rango de aproximadamente 1-2 femtoFaradios o más generalmente en el rango de aproximadamente 0.5 a 3 femtoFaradios o cualquier rango subsumidos en el mismo. Los contactos con el NME funcionalizado con sonda pueden formarse en capas diferentes por encima de las regiones del sustrato semiconductor utilizado para formar los transistores. En una realización alternativa, la polaridad de la polarización puede ser invertida y la capacitancia parásita en VSRC puede ser cargada en lugar de descarga durante el periodo de integración.

Ahora se hace referencia a la Figura 8, que muestra una vista superior de un IC de ejemplo que tiene una matriz multiplexada de los NME con funcionalidad de sonda direccionables individualmente. Por direccionable individualmente, se entiende que cada NME puede ser accedido eléctricamente de manera individual, de tal manera que la corriente o carga generada por cada NME puede medirse individualmente. En este ejemplo, los NME están dispuestos en forma de fila-columna. Hay n filas y m columnas para un total de m x n NME independientes. Si solo hubiera una fila o columna de NME, entonces puede que no sea necesario tener circuitos de dirección de fila/columna. Sin embargo, cuando se desean grandes números totales de los NME en un solo dispositivo, puede ser más eficiente disponerlos en una cuadrícula bidimensional o similar, y por lo tanto, el acceso eléctrico independiente a cada NME puede ser útil. Esto se puede lograr de manera eficiente utilizando los circuitos ilustrados en la Figura 7. En esta metodología, la carga asociada con la corriente que fluye a través de cada NME se integra en un almacenamiento de carga, tal como un condensador; y se puede leer un voltaje proporcional a la carga almacenada para el NME en una fila particular al establecer el nodo SEL (8) a un nivel alto y monitorizar el voltaje en esa columna V_{col} .

La figura ilustra que, para cada columna, puede existir una señal dependiente del tiempo (cuya dependencia del tiempo puede determinarse mediante la sincronización del circuito de dirección de fila) que, en algunas realizaciones, puede alimentarse, en casos con la ayuda de búfer electrónico o amplificación, en un convertidor de analógico a digital. El convertidor de análogo a digital puede aceptar señales que tengan un cambio de voltaje predeterminado (tal como 0-1 V, típicamente) y, para cada canal de entrada, puede realizar una operación de cuantificación en la cual se estima una representación digital del nivel análogo en esa señal. La salida del convertidor A/D es una corriente digital que combina paralelismo (por ejemplo, múltiples alambres paralelos, cada uno correspondiente a una figura significativa

en la representación binaria de los valores) y temporización en serie (por ejemplo, una representación temporizada de elementos de datos secuenciales que corresponden, por ejemplo, a diferentes NME funcionalizados con sonda).

Ahora se hace referencia a la Figura 9, que muestra tres NME adyacentes a lo largo de una sola fila, en una configuración que puede proporcionarse en un dispositivo biosensor o IC como se describió anteriormente. Estos tres NME se leen utilizando tres columnas diferentes j , $j+1$, y $j+2$. Esta figura ilustra un número de características con respecto a las diferencias entre los NME.

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

Los NME E_{ij} , E_{ij+i} , y E_{ij+2} se muestran que tienen diferentes morfologías y/o tamaños, y diferentes grados de nanoestructuración. Como se discutió anteriormente, diferentes morfologías y/o tamaños pueden proporcionar tanto diferentes límites de detección, como diferentes rangos dinámicos, en la detección de moléculas diana. Al incorporar los NME que tienen diferentes morfologías y/o grados de nanoestructuración en un dispositivo, puede ser posible expandir el rango dinámico de concentraciones objetivo que pueden detectarse utilizando un solo dispositivo. En resumen, el uso de diferentes morfologías, tamaños y/o nanoestructuras de NME puede permitir la detección de un rango más amplio de concentraciones de una especie objetivo dada que lo que se lograría de otra manera si solo se proporcionara una morfología/nanoestructuración en un dispositivo biosensor.

Los NME E_{ij+i} y E_{ij+2} también se representan como funcionalizadas utilizando diferentes clases de moléculas de sonda. Por ejemplo, E_{ij+i} puede funcionalizarse usando un ácido nucleico tal como PNA, y E_{ij+2} puede funcionalizarse usando anticuerpos que se unen al electrodo. En resumen, el uso de diferentes clases de moléculas de sonda puede permitir la detección de diferentes clases de biomoléculas diana, por ejemplo, que varían desde ADN a ARN a micro-ARN a proteínas, utilizando un único dispositivo biosensor.

Cartucho biosensor y estación de trabajo.

El dispositivo biosensor como se describe anteriormente puede incorporarse en un cartucho biosensor. Un cartucho de este tipo puede contener cámaras para el procesamiento de muestras, tales como la ruptura y la purificación de ácidos nucleicos a base de perlas o resinas, así como una cámara para el dispositivo biosensor. El cartucho puede estar autocontenido, por ejemplo, todos los reactivos necesarios pueden estar contenidos en la tapa del cartucho. El cartucho puede ser reutilizable, o puede ser desechable. Un cartucho desechable puede minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.

El cartucho se puede utilizar en una estación biosensora de trabajo para coordinar y llevar a cabo el proceso biosensor. Los componentes de la estación de trabajo pueden incluir soportes de muestra, puntas de instrumentos tales como pipeteadores para la manipulación de la muestra, un módulo de identificación de la muestra, un mecanismo de selección para seleccionar una prueba a realizar, una pantalla electrónica para indicar los resultados de una prueba biosensora y un procesador para la gestión de estos componentes y la realización de las pruebas seleccionadas. La estación de trabajo puede contener un número de cartuchos diferentes al mismo tiempo (por ejemplo, diez o más). La estación de trabajo puede permitir el acceso aleatorio a los cartuchos - es decir, se pueden realizar pruebas independientes en cualquier momento en cualquier cartucho de la estación de trabajo. La estación de trabajo puede tener puntas de instrumentos desechables, que serían la única parte de la estación de trabajo que entra en contacto directo con la muestra y los reactivos. Las puntas desechables, junto con los cartuchos desechables, pueden minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras analizadas en la estación de trabajo.

En general, un cartucho biosensor puede tener una primera cámara para contener la muestra a analizar, y una segunda cámara que contiene el dispositivo biosensor tal como se describió anteriormente. Puede haber cámaras de adición para realizar otras acciones en la muestra, tal como la purificación y/o la subdivisión (por ejemplo, a través de medios químicos, mecánicos o vibracionales). Se puede llevar a cabo algún procesamiento y alteración de la muestra en la primera cámara. La muestra puede introducirse desde la primera a la segunda cámara para su detección por el dispositivo biosensor en la segunda cámara. Puede haber un intervalo de tiempo preestablecido desde la activación del dispositivo o el inicio de la prueba hasta la introducción de la muestra en la segunda cámara. Este intervalo de tiempo puede permitir que el dispositivo biosensor se polarice adecuadamente o de otra manera se prepare para la prueba. La carga o el flujo de corriente generado en el dispositivo biosensor se puede medir después de un período de integración, como se describió anteriormente.

Ahora se hace referencia a la Figura 10, que muestra un ejemplo de un cartucho biosensor y las etapas para usar tal cartucho. En este ejemplo, el cartucho tiene tres cámaras, una cámara de muestra que contiene la muestra, una cámara de purificación para purificar la muestra y un biosensor para realizar la biosensación. Como se muestra en este ejemplo, la tapa del cartucho está provista de cápsulas que contienen reactivos para cada cámara, y a través de las cuales se puede insertar una punta de instrumento. Esto permite que el cartucho sea autocontenido, ya que contiene

los reactivos adecuados para llevar a cabo la operación de biodetección y se adapta a las sondas particulares y/o biomoléculas diana del dispositivo biosensor que se está utilizando. En este ejemplo, la cámara de muestra tiene una cápsula, para acceder a la muestra. La cámara de purificación tiene tres cápsulas: dos que contienen un reactivo de lavado y una que contiene un regulador de elución. La cámara biosensora tiene tres cápsulas, cada una contiene una mezcla electroquímica que contiene analitos para el dispositivo biosensor. La punta del instrumento se puede insertar secuencialmente en cada cápsula, con el fin de llevar a cabo la operación biosensora. Por ejemplo, la cápsula en la cámara de muestra puede contener un regulador de lisis que contiene productos químicos no tóxicos (por ejemplo, urea o formamida); las cápsulas, una en la cámara de purificación, pueden tener dos cápsulas que contienen un regulador de lavado y el regulador de elución puede ser un regulador estándar, tal como uno que contiene niveles bajos de sodio, cloruro y sal de tris; Las cápsulas en la cámara biosensora pueden contener grupos informadores redox tales como hexamina de rutenio, ferricianuro y un regulador que contiene sodio, fosfato, cloruro y magnesio.

En uso, la muestra se extrae primero de la cámara de muestra a través de su cápsula única. La muestra se introduce luego en la cámara de purificación, donde se lava dos veces a medida que la punta del instrumento se introduce a través de las dos cápsulas de lavado y se introduce el regulador de elución. A través de este proceso, la muestra puede prepararse para la biodetección mediante el dispositivo biosensor. Por ejemplo, en el caso de una muestra de ácido nucleico, el proceso en la cámara de purificación puede aislar el ARN o el ADN en la muestra. La muestra purificada se introduce luego en la cámara biosensora, a través de cada cápsula electroquímica. El dispositivo biosensor en la cámara biosensora puede entonces detectar cualquier biomolécula diana presente en la muestra, y la corriente o carga generada puede medirse. Cuando el cartucho se usa en una estación de trabajo, el procesador en la estación de trabajo puede leer esta corriente o carga generada y determinar la presencia de la biomolécula diana con base en esta lectura.

Ahora se hace referencia a la Figura 11, que muestra un ejemplo de una estación de trabajo biosensor. Esta estación de trabajo incluye un lector de códigos de barras, que permite la identificación de muestras utilizando códigos de barras exclusivos proporcionados en cada cartucho. La estación de trabajo tiene un mecanismo de selección, en este ejemplo, una pantalla táctil que permite la selección de una prueba en particular para llevar a cabo. También hay un contenedor de desechos para eliminar cualesquier desechos generados por el proceso biosensor. El procesador de la estación de trabajo puede estar conectado a un dispositivo de computación externo, tal como otra estación de trabajo, para un análisis adicional. Esta conexión puede ser a través de una red inalámbrica. La estación de trabajo puede ser relativamente pequeña (por ejemplo, una huella de 1.5 x 1 pie), lo que permite comodidad y uso.

Métodos de uso

Se describen ahora los métodos para usar los NME y dispositivos que comprenden los mismos. Se puede proporcionar un dispositivo con el NME ya funcionalizado con una molécula de sonda, o la molécula de sonda puede unirse al NME cuando se prepara el dispositivo para su uso. El dispositivo es entonces polarizado para su uso, por ejemplo, agregando un informador electrocatalítico y esperando un cierto intervalo de tiempo. Además del NME, puede haber un electrodo de referencia, que puede o no ser un NME, en contacto con el informador electrocatalítico pero no en contacto con la muestra. El flujo de corriente o la polarización de voltaje generada durante este intervalo de tiempo entre el NME y el electrodo de referencia se puede medir y registrar como el punto de referencia. El NME es entonces expuesto a una muestra de interés y se puede medir el flujo de corriente o carga generada durante un cierto intervalo de tiempo (también denominado período de integración). Al comparar la diferencia en el flujo de corriente o la carga entre el intervalo de tiempo de exposición y el intervalo de tiempo de polarización, se puede determinar la concentración, la unión y/o la cantidad de biomolécula diana en la muestra.

Los dispositivos que comprenden los NME, como se describe en el presente documento, se pueden usar junto con las sondas apropiadas para detectar la presencia o ausencia de biomarcadores particulares en una muestra. Una "muestra" o "muestra biológica" como se refiere aquí a cualquier material natural (por ejemplo, vegetal, animal, de algas, bacteriano o viral) o sintético que contenga ADN, ARN y/o proteínas, incluyendo, por ejemplo, muestras clínicas, tales como tejidos, cultivos celulares o fluidos aislados de un individuo (incluidos, sin limitación, sangre, plasma, masa de tejido, líquido cefalorraquídeo, linfa, lágrimas, orina, saliva, moco, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo y secciones de tejido), del ambiente (por ejemplo, agua, alimentos o muestras de aire). Las muestras biológicas pueden procesarse adicionalmente a través de una variedad de medios, incluida la lisis (eléctrica, mecánica y química), la electroforesis y la digestión enzimática. La mayoría de las veces, la muestra ha sido eliminada de un organismo, pero el término "muestra biológica" también puede referirse a células o tejido analizado in vivo, es decir, sin eliminación. Típicamente, una "muestra biológica" contendrá células, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina. "Una muestra biológica" se refiere además a un medio, tal como un caldo o gel nutriente en el que se ha propagado un organismo, que contiene componentes celulares, tales como proteínas o moléculas de ácido nucleico.

Las sondas para uso con los NME descritos al instante pueden estar compuestas de ácidos nucleicos. Una "sonda de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN), un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un análogo de los mismos, que incluye, por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (ANP), que contiene un esqueleto compuesto de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa enlazada por enlazamientos de fosfodiesterasa) capaces de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, usualmente a través de un par de bases

- complementarias, usualmente a través de formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en este documento, una sonda de ácido nucleico puede incluir unidades estructurales naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas en bases (7-desazaguanosina, inosina, etc.) o en azúcar. Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Un experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Al analizar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. Los métodos para detectar ácidos nucleicos diana utilizando sondas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 7,361,470 titulada "Electrocatalytic Nucleic Acid Hybridization Detection". y US 2005/0084881 del mismo nombre.
- "Hibridación" se refiere a cualquier proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través del emparejamiento de bases. Las "condiciones de hibridación" se refieren a las condiciones bajo las que se utilizan moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Tales condiciones estándar se divulgan, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook et al., *Ibid.*, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad (véase específicamente, páginas 9.31- 9.62). Además, las fórmulas para calcular la hibridación apropiada y las condiciones de lavado para lograr la hibridación que permite grados variables de desajuste de nucleótidos se divulgan, por ejemplo, en Meinkoth et al., 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284; Meinkoth et al., *Ibid.*, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los ejemplos no limitantes de condiciones de hibridación incluyen condiciones de hibridación de baja rigurosidad, condiciones de hibridación de rigurosidad moderada y condiciones de hibridación de alta rigurosidad.
- En otra realización, la sonda es un péptido (que comprende, por ejemplo, 4-40 aminoácidos) o proteínas (por ejemplo, un anticuerpo) que puede unirse a o de otra manera interactuar con un objetivo biomarcador (por ejemplo, un receptor o un ligando) para proporcionar una indicación de la presencia del ligando o receptor en la muestra. Los métodos para detectar analitos utilizando péptidos o sondas de proteínas se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO 2007/094805 (PCT/US2006/013771) titulada "Method for Electrocatalytic Protein Detection".
- Las sondas pueden incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un NME. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones de doble cadena y/o de cadena individual, enlazadores de poliT, dúplex de doble cadena como enlazadores rígidos y espaciadores de PEG.
- Como se describió anteriormente, la nanoestructura de la superficie del NME puede controlarse y puede influir en la sensibilidad y/o la eficiencia de un dispositivo que tenga el NME. En el Ejemplo 1, se investigó la influencia de la nanoestructura de superficie en la eficiencia de detección de los ácidos nucleicos. Se compararon dos tipos diferentes de NME: se comparó un NME más finamente nanoestructurado obtenido con un bajo potencial de deposición con uno de textura más gruesa obtenido con un potencial de deposición más alto.
- Si bien se pudieron detectar concentraciones tan bajas como 1 pM con el NME más finamente nanoestructurado obtenido con un bajo potencial de deposición, el límite de detección se incrementó a 10 pM para el de textura más gruesa obtenido con un potencial de deposición más alto. Estos resultados demuestran que la nanoestructura incrementada contribuye a capacidades de biodetección más sensibles en una plataforma de electrodos. Este análisis reveló que los NME más finamente estructurados mostraron una mayor capacidad de respuesta a las concentraciones sub-nM de secuencias diana.
- La sensibilidad de 10 aM observada aquí con los NME divulgados y el sistema informador electrocatalítico proporciona un bajo límite de detección para un sensor libre de etiquetado y de PCR; el límite de detección corresponde a la detección de < 100 copias de la secuencia diana. Mientras que la medición de 60-1000 copias de la secuencia diana se ha logrado previamente con detectores electroquímicos que explotan la lectura catalítica de multietapas (Munge et al., *Anal. Chem.* 77: 4662, Nicewamer-Pena et al., *Science* 294: 137, Park et al., *Science* 295: 1503, Sinensky et al., *Nat. Nano.* 2: 653, Steemers et al., *Nat. Biotechnol.* 18:91, Xiao et al., *J. Am. Chem. Soc.* 129 : 11896, Zhang et al., *Nat. Nano.* 1: 214, Zhang et al., *Anal. Chem.* 76: 4093), el dispositivo divulgado proporciona esta medición en una plataforma basada en chip con lectura de una sola etapa.
- El Ejemplo 2 describe el uso de una plataforma de electrodos multiplexados, como se describe en este documento, para leer directamente un panel de biomarcadores de cáncer en muestras clínicamente relevantes utilizando señales electrónicas. El sistema combina electrodos nanotexturados con una lectura catalítica rápida para lograr un objetivo de larga data: el análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer utilizando una plataforma económica y práctica.
- El ejemplo 3 describe el uso de un chip basado en NME para detectar microRNA, uno de los objetivos de detección más desafiantes. La lectura electrónica de los perfiles de microARN ofrece un método rápido, pero altamente preciso, para analizar directamente las muestras de ARN en busca de secuencias específicas sin la necesidad de una amplificación objetivo.
- Aunque los ejemplos proporcionados están dirigidos a la detección de biomarcadores de cáncer, otras aplicaciones pueden ser posibles para el dispositivo de NME, que puede implicar la detección de ADN, ARN y/o proteínas. Ejemplos incluyen el perfil de los genes del cáncer de mama (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de ARN);

perfiles de genes relacionados con la leucemia (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de ARN); perfiles de mutaciones del citocromo P450 que afectan el metabolismo del fármaco (por ejemplo, Warfarina) (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de ADN y ARN); perfiles de mutaciones asociadas con enfermedades genéticas (por ejemplo, fibrosis quística) (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de ADN); detección y tipificación de virus (por ejemplo, VPH y VIH) (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de ADN y ARN); detección de proteínas relacionadas con el cáncer utilizando un formato de inmunoensayo electroquímico (por ejemplo, antígeno prostático específico (PSA)) (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de proteínas); y detección de micro ARNS para identificar el cáncer. Los dispositivos biosensores que incorporan estos NME pueden adaptarse para detectar estas otras biomoléculas uniendo sondas adecuadas al NME y/o seleccionando una reacción electrocatalítica adecuada para ser detectada, como se conoce comúnmente en la técnica.

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

Ejemplo 1. Parámetros para la fabricación de los NME

En este ejemplo, se usó Pd como material de electrodo. Para investigar la dependencia del tiempo de la electrodeposición, las estructuras de los NME de Pd que se someten a electrodeposición se monitorizaron en función del tiempo. Los experimentos de electrodeposición dependientes del tiempo se realizaron a -100 mV utilizando HCl 0.5 M como electrolito de soporte. Las estructuras de Pd se formaron para (a) 25, (b) 50, (c) 125, (d) 250 y (e) 500 s. Después de 50 s, se observaron estructuras con diámetros promedio de 1.3 μm y alturas de 0.5/ μm , y después de 500 s los electrodos de Pd tenían típicamente 8 μm y 5 μm de diámetro y altura. Las estructuras más pequeñas hechas con tiempos de deposición más cortos exhiben típicamente depresiones en el centro de los microelectrodos, lo que puede indicar que la nucleación se produce preferentemente en el límite de la abertura.

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

Las estructuras de Pd se formaron a (a) 0 mV, (b) -100 mV, (c) -250 mV y (d) -400 mV durante 250 s con el uso de HCl 0.5 M como electrolito de soporte. Se encontró que los potenciales de deposición más negativos conducen típicamente a microestructuras más grandes, pero menos compactas. A un potencial de deposición de 0 mV, se obtuvo una estructura en forma de torta de 3.5/ μm de diámetro y 0.7 μm de altura. Cuando el potencial aplicado se cambió a -100 mV, se obtuvo una microestructura más áspera que también era más grande en tamaño (diámetro promedio = 5 μm y altura = 2.5 μm). La nanotextura obtenida es un agregado irregular de nanopartículas muy pequeñas. Cuando se aplicó un potencial más negativo de -250 mV, se obtuvo una microestructura fractal dendrítica y se encontró que su diámetro y altura aumentaron además 11 y 6/ μm , respectivamente. Si el potencial aumentaba aún más (por ejemplo, a -400 mV), la estructura del microelectrodo se hacía más abierta y la estructura ya no es continua.

El comportamiento electroquímico de los NME de Pd formados como una función del potencial se estudió mediante voltamperometría cíclica (CV). La respuesta electroquímica de los NME se monitorizó en una solución que contenía Ru(NH₃)₆³⁺ y fosfato de sodio 0.09 M, a una tasa de barrido de 100 mV/s. Como era de esperar, se observan voltamogramas de estado estable para cada electrodo, consistente con las dimensiones de microescala de los electrodos. Para los electrodos fabricados utilizando potenciales de deposición de 0, -100 o -250 mV, las corrientes observadas están bien correlacionadas con el tamaño del electrodo. Es decir, cuanto mayor sea el diámetro del NME (es decir, formado a un mayor potencial aplicado), mayor será la corriente de respuesta observada. Sin embargo, para estructuras hechas a -400 mV, las corrientes observadas fueron menores de lo esperado con base en el tamaño del microelectrodo, lo que indica que la discontinuidad de la estructura del electrodo puede conducir a una mala conectividad eléctrica y pérdida de área de trabajo.

Por lo tanto, los potenciales de deposición moderados parecen proporcionar la nanotextura más pronunciada mientras se mantiene la integridad del NME resultante, ya que se forman pequeñas nanopartículas en la superficie de los microelectrodos. Parece que proporcionar un potencial impulsor demasiado grande para la reacción de deposición acelera la cinética hasta un punto donde se forman nanopartículas de metal sin una fuerte conectividad al núcleo del NME.

La morfología de NME también puede controlarse mediante efectos de electrólitos. Los NME de Pd se formaron a -100 mV durante 250 s utilizando (a) H₂SO₄ 0.5 M y (b) HClO₄ 0.5 M como el electrolito de soporte. Estas estructuras se formaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, donde se usó HCl como electrolito de soporte. Las estructuras formadas en H₂SO₄ y HClO₄ fueron significativamente más grandes que las formadas en HCl y, de manera interesante, los tres mostraron diferentes tipos de nanoestructuración. Los NME fabricados en HClO₄ mostraron la mejor nanoestructura, con características tan pequeñas como 10-20 nm presentes. En el HCl, el electrodo era más compacto y la nanoestructuración era del orden de 100 nm. La nanoestructuración más gruesa se obtuvo en H₂SO₄, donde las partículas que comprenden el electrodo eran más grandes que 200 nm. Estas observaciones indican que la morfología de NME también se puede controlar variando el electrolito de soporte utilizado para la electrodeposición.

Típicamente, las estructuras dendríticas para el NME dependen de las condiciones durante la fabricación, incluidas las concentraciones de la solución de electrodeposición, la selección del metal que se va a electrodepositar y el potencial aplicado durante la electrodeposición. Estos parámetros son fácilmente controlables. Por ejemplo, puede ser deseable controlar la concentración y la pureza de los reactivos utilizados en la electrodeposición dentro del 5%. La selección del metal es fácil de controlar siempre que la pureza de los reactivos sea alta, simplemente obteniendo el material correcto. El potencial durante la electrodeposición se puede controlar fácilmente dentro de unos pocos mV, lo cual es suficiente para controlar el tamaño y la morfología del NME resultante.

Ejemplo 2. Perfilado directo de los biomarcadores de cáncer de próstata en tejido tumoral utilizando un circuito integrado de microelectrodo nanoestructurado multiplexado

20 Materiales y métodos

Fabricación de chips. Los chips fueron fabricados en el Canadian Photonics Fabrication Center. Las obleas de silicio de 3" se pasivaron utilizando una capa gruesa de dióxido de silicio cultivado térmicamente. Se depositó una capa de oro de 350 nm sobre el chip utilizando evaporación de oro asistida por haz de electrones. La película de oro se modeló utilizando una fotolitografía estándar y un proceso de despegue. Se depositó una capa de dióxido de silicio aislante de 500 nm utilizando deposición química de vapor, se imprimieron aberturas de 500 nm en los electrodos utilizando fotolitografía estándar y se expusieron almohadillas de enlace de 2 mm x 2 mm utilizando fotolitografía estándar.

Fabricación de microelectrodos nanoestructurados. Los chips se limpiaron enjuagando con acetona, IP A y agua DI durante 30 segundos y se secaron con un flujo de nitrógeno. Toda la electrodeposición se realizó a temperatura ambiente con un potencióstato Epsilon de Bioanalytical Systems con un sistema de tres electrodos con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Se utilizaron aberturas de 500 nm en los electrodos fabricados como electrodos de trabajo y se pusieron en contacto utilizando las almohadillas de unión expuestas. Los NME de platino se fabricaron en un baño de platino que contenía una solución 5 mM de H₂PtCl₆ y HClO₄ 0.5 M a -250 mV durante 10 s utilizando una amperometría de potencial de DC.

Preparación y purificación de oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos sintéticos se purificaron rigurosamente mediante HPLC en fase reversa. Las siguientes sondas y secuencias diana se usaron en experimentos. Seq. P1. Sonda de fusión de tipo III(PNA): NH₂-Cys-Gly-ATA AGG CTT CCT GCC GCG CT-CONH₂ (SEQ ID NO. 1), Seq. P2. Type I fusion probe (PNA): NH₂-Cys-Gly-CTG GAA TAA CCT GCC GCG CT-CONH₂ (SEQ ID NO. 2), Seq. P3. Sonda de fusión de tipo VI (PNA): NH₂-Cys-Gly-ATA AGG CTT CTG AGT TCA AA-CONH₂ (SEQ ID NO. 3), Seq. T1 (Tipo III TMRSS2: Diana de ADN de fusión ERG): 5' AGC GCG GCA GGA AGC CTT AT3' (SEQ ID NO. 4), Seq. T2 (WT TMRSS2 diana de ADN): 5'AGC GCG GCA GGT CAT 10 ATT GA3' (SEQ ID NO. 5), Seq. T3 (WT ERG Diana de ADN): 5'TCA TAT CAA GGA AGC CTT AT3' (SEQ ID NO. 6), Seq. T4 (diana de ADN no complementaria): 5'TTT TTT TTT TTT TTT TT3' (SEQ ID NO. 7). Los oligonucleótidos se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y coeficientes de ext. calculados utilizando: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Modificación de los NME con sondas de PNA. Una solución que contenía PNA de cadena individual tiolada 500 nM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y cloruro de sodio 25 mM se calentó a 50°C durante 10 minutos. Luego se agregó una cantidad adecuada de MCH 10 mM para hacer la concentración final de MCH de 100 nM. Se depositaron 0,5-10 µL (dependiendo del grado de multiplexación) de esta mezcla sobre los NME en una cámara de humedad oscura durante la noche a 4 °C. Los NME se enjuagaron en fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y en regulador de NaCl 25 mM antes de la medición.

Mediciones electroquímicas. Las señales electroquímicas se midieron en soluciones que contenían Ru(NH₃)₆³⁺ 10 µM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7), cloruro de sodio 25 mM y Fe(CN)₆³⁻ 4 mM. Las señales de voltametría diferencial de pulso (DPV) antes y después de la hibridación se midieron usando una etapa potencial de 5 mV, amplitud de pulso de 50 mV, ancho de pulso de 50 ms y un período de pulso de 100 ms. Las señales de voltametría cíclica antes y después de la hibridación se recolectaron con una tasa de barrido de 100 mV/s. La limitación de la corriente reductora (I) se cuantificó restando el fondo a 0 mV de la corriente catódica a -300 mV en una señal de voltametría cíclica. Los cambios de señal correspondientes a la hibridación se calcularon de la siguiente manera: AI = (I_{ds}-I_{ss})/I_{ss} x 100% (ss = antes de la hibridación, ds = después de la hibridación).

Protocolo de hibridación. Las soluciones de hibridación típicamente contenían secuencias diana en fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y NaCl 25 mM. Los electrodos se incubaron a 37 °C en una cámara de humedad en oscuridad durante 60 minutos y se lavaron abundantemente con regulador antes del análisis electroquímico.

- 5 Aislamiento de ARNm. Los ARNm se extrajeron de líneas celulares y muestras de tejido del paciente con el kit Dynabeads mRNA Direct (Invitrogen). Se obtuvieron dos muestras típicas de tejido de cáncer de próstata de prostatectomías radicales obtenidas de Cooperative Human Tissue Network. El tejido se almacenó a -85 °C hasta que se seleccionó tejido rico en tumores para la extracción de ARNm. Las concentraciones de dianas de ARNm se midieron mediante NanoDrop ND-1000 de Thermo Fisher Scientific (EE. UU.). Todas las secuencias de fusión se confirmaron mediante RT-PCR y secuenciación directa.
- 10 Mediciones cinéticas de la hibridación de ADN en los NME. Los NME modificados con PNA (seq. 2) se prepararon como se describe anteriormente. Los NME enjuagados se sumergieron en una solución que contenía Ru(NH₃)₆³⁺ 10 μM, Fe(CN)₆³⁻ 3-4 mM, diana de ADN 100 fM (seq. 4 a 7), fosfato de sodio 25 mM (pH 7) y NaCl 25 mM. Las señales de CV electrocatalíticas se obtuvieron como se describe anteriormente. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C.

Resultados y discusiones

- 15 Se busca generar una plataforma basada en nanomateriales para bioanálisis ultrasensible que sea i) altamente robusta y no complicada de fabricar; ii) multiplexada y escalable; y iii) sensible y específica cuando se presentan con muestras biológicas heterogéneas. Para satisfacer los requisitos i) y ii) requerimos un medio para lograr la colocación reproducible de cada elemento de detección individual mediante un protocolo escalable. Para abordar el requisito iii), se intenta incorporar características de nanoescala en nuestra matriz de detección. Sin embargo, la producción de elementos detectores nanoestructurados en conjunto puede requerir mucho trabajo y es propensa a una baja reproducibilidad. La litografía de haz de electrones proporciona el control necesario sobre las características de nanoescala y su ubicación; sin embargo, es una técnica en serie que actualmente no es adecuada para la producción de chips de bajo coste y alto volumen. Nuestra metodología fue, en cambio, utilizar una fotolitografía convencional rentable para colocar y abordar nuestros electrodos; y luego encontrar un medio para lograr, con un alto grado de reproducibilidad, la nanoestructuración de estos microelectrodos.

- 20 Se construyó un chip multiplexado de 8 pliegues modelando una capa de oro de 350 nm de espesor en un chip de silicio para crear ocho alambres de Au de 5 p.m. de ancho unidos a grandes almohadillas de metal que servirían como contactos externos. El SiO₂ se depositó entonces como una capa de pasivación y se modeló para crear aberturas con diámetros de 500 nm al final de cada uno de los alambres de Au. Estas aberturas se crearon para servir como plantillas individuales para el crecimiento local y controlado de nanoestructuras. Luego se utilizó la electrodeposición de paladio para depositar el metal en las aberturas estampadas. Se descubrió que se podía regular el tamaño de las nanoestructuras variando el tiempo de deposición. Los inventores fueron capaces de limitar fácilmente el diámetro de las estructuras al régimen de ultramicroelectrodos (<10 μm). Bajo condiciones que permiten una rápida deposición del metal, las superficies de los microelectrodos mostraron un alto nivel de nanoestructuración, con tamaños de características de aproximadamente 20 nm. Estas estructuras mostraron un comportamiento ideal de microelectrodos, exhibiendo bajas corrientes capacitivas y altas corrientes de meseta en estado estable.

- 30 Con el fin de hacer que estos microelectrodos nanoestructurados (NME) funcionen como biosensores de ácidos nucleicos, se modificaron con sondas de ácidos nucleicos peptídicos tiolados (ANP). Se ha demostrado anteriormente que el uso de PNA como una molécula de sonda aumenta la sensibilidad de los ensayos de biodetección y es particularmente ventajoso en los ensayos electroquímicos porque produce corrientes de fondo reducidas. Para transducir la hibridación de ácidos nucleicos en una señal eléctrica, se empleó un sistema informador electrocatalítico desarrollado previamente por nuestro laboratorio. (Lapierre, M. A. et al., Anal. Chem. 2003, 75, 6327-6333). Este sistema informador se basa en la acumulación de Ru(NH₃)₆³⁺ en las superficies de los electrodos cuando se unen especies polianiónicas como los ácidos nucleicos, y la catálisis de la reducción de Ru(III) a través de la inclusión de Fe(CN)₆³⁻, que regenera Ru(III) y permite múltiples reducciones por centro metálico. Cuando los NME modificados con PNA fueron expuestos con una secuencia complementaria, los cambios de señal detectables podrían detectarse claramente a través del rango de concentración femtomolar. Se observaron cambios de señal insignificantes con secuencias completamente no complementarias.

- 50 Los biomarcadores de cáncer seleccionados para el análisis en esta plataforma son un grupo de fusiones de genes específicas para el cáncer de próstata. Estas fusiones, resultantes de una translocación cromosómica que se une a los genes ERG y TMPRSS2, se descubrieron recientemente y aparecen en al menos el 50% de los tumores de próstata. Además, hay ~ 20 tipos de secuencia que representan diferentes sitios de fusión, y el tipo exacto de fusión presente en un tumor parece correlacionarse con su agresividad y potencial metastático. Estas secuencias son, por lo tanto, no solo marcadores de diagnóstico prometedores, sino también factores con valor de pronóstico.

- 55 Para determinar si los sensores de NME podrían discriminar las secuencias de fusión génica de las secuencias de tipo silvestre que serían semicomplementarias, un sensor modificado con una sonda complementaria al sitio de empalme de la fusión Tipo III fue expuesto con: (1) la diana de fusión (seq. T1), (2) la secuencia correspondiente al gen TMPRSS2 de tipo silvestre (seq. T2), y (3) una secuencia correspondiente al gen ERG de tipo silvestre (seq. T3). También se ensayó un control completamente no complementario (seq. T4). Con un tiempo de hibridación de 60

minutos, se observaron grandes aumentos de señal con el objetivo totalmente complementario, mientras que se observó un cambio de señal mucho menor con el TMPRSS2 diana. El ERG diana produjo un cambio de señal incluso más bajo, y el observado con la secuencia no complementaria fue despreciable. El TMPRSS2 diana se une a la porción de la sonda ubicada al final de la secuencia no unida al electrodo, mientras que el ERG diana se une a la porción de la sonda ubicada en el extremo enlazado a la superficie del electrodo. Los diferentes niveles de señal observados indican que el lado más accesible de la sonda puede unirse mejor a las moléculas diana entrantes, mientras que la hibridación con la parte más oculta de la secuencia es ineficiente.

Para determinar si la hibridación de las diferentes dianas requirió el período de tiempo completo de 60 minutos originalmente probado para una lectura precisa, las señales electrocatalíticas se monitorizaron en una variedad de intervalos dentro de la ventana originalmente probada. De manera interesante, el aumento de las señales es muy rápido, con cambios de corriente significativos observados en 2 minutos. Sin embargo, durante el período total de 60 minutos, las señales para las secuencias semicomplementarias y no complementarias caen notablemente; con 20-50% de la señal de 2 minutos desapareciendo en 60 minutos. Parece que para las secuencias que no son completamente complementarias, se produce alguna unión no específica en los primeros minutos de exposición del sensor de NME a la solución objetivo, pero estos complejos no permanecen estables y no permanecen inmovilizados en el electrodo. Por lo tanto, mientras que las secuencias no complementarias se pueden discriminar de las secuencias complementarias con tiempos de hibridación cortos, los tiempos más largos aumentan los cambios de señal diferencial y, por lo tanto, el grado de especificidad.

El rendimiento de estos microelectrodos nanoestructurados como detectores de ácidos nucleicos indicó que las estructuras modeladas eran de hecho sensibles y específicas cuando se utilizaban bajo condiciones de hibridación apropiadas. Por lo tanto, se intentó probar que los NME basados en chips multiplexados podrían usarse para analizar biomarcadores de cáncer presentados en muestras biológicas heterogéneas. Para explorar esta capacidad, se evaluaron los extractos celulares y las muestras de tumores de pacientes con cáncer de próstata para determinar si la sensibilidad y especificidad del sistema eran lo suficientemente sólidas para las pruebas clínicas.

Para determinar si se podrían detectar fusiones de genes asociados con el cáncer de próstata utilizando el chip de NME, primero se analizaron el ARNm aislado de dos líneas celulares de cáncer de próstata: VCaP y DU 145. La primera línea celular es positiva de fusión tipo III, y la última es negativa de fusión. No se produjeron cambios de señal apreciables cuando se incubaron 10 ng de ARNm de la línea celular que carece de esta secuencia con un NME que muestra una sonda complementaria a la fusión de tipo III (seq. P1), mientras que se observaron grandes aumentos de la señal en presencia de ARNm 10 ng de la línea celular que contiene la fusión tipo III. Además, la modificación de los NME con una sonda complementaria a una fusión diferente (seq. P2) no produjo una señal significativa con una muestra de ARNm positiva. La detección del gen fusionado es por lo tanto altamente específica. Estos resultados son significativos, ya que la eficiencia en el uso de la muestra (10 ng) y el tiempo total requerido para el análisis (menos de 1.5 horas) mejoran significativamente otros métodos de detección como la hibridación in situ fluorescente (FISH) y la secuenciación.

La aplicación definitiva del chip de NME es el análisis directo, multiplexado de un panel de biomarcadores de cáncer en muestras de pacientes relevantes. Para probar el rendimiento de nuestro dispositivo para este tipo de aplicación, analizamos un panel de muestras de ARNm recolectadas de líneas celulares y muestras de tumores clínicos para una serie de fusiones de genes. Obtuvimos un grupo de muestras que permitirían la detección de los tres tipos más comunes de fusiones genéticas de cáncer de próstata: tipo I, tipo III y tipo VI. Diferentes resultados clínicos se asocian con estas secuencias, siendo las fusiones de tipo III las más comunes, pero se correlacionan con tasas bajas de recurrencia de cáncer, mientras que las fusiones de tipo I y VI están correlacionadas con los cánceres agresivos con altos niveles de recurrencia. Por lo tanto, es de gran interés poder diferenciar estas fusiones en tumores, y un método que permita evaluar su presencia o ausencia de forma rápida y directamente sería valioso en su estudio y validación posteriores como biomarcadores de diagnóstico.

Las sondas complementarias a cada una de las tres fusiones se depositaron en sus respectivos electrodos en chips de NME, y se perfilaron 5 muestras de ARNm diferentes para la presencia de diferentes fusiones de genes en un formato multiplexado. Se analizaron tres líneas celulares: VCap (tipo III positivo), 28 NCI-H660 (tipo III y VI positivo) y DU145 (fusión negativa). Además, se analizaron dos muestras de tumores (tejidos recolectados mediante prostatectomías radicales), uno que fue positivo para la fusión de tipo I, y uno que fue positivo para la fusión de tipo III, como se confirmó mediante secuenciación convencional. En cada caso, todos los experimentos tomaron menos de 2 horas y requirieron solo 10 ng de ARNm. Al analizar las señales electroquímicas recolectadas en los NME que muestran diferentes sondas, se verificó la identidad de los genes fusionados presentes en cada muestra. Por ejemplo, en la muestra de paciente que contiene la fusión de tipo I (verificada por secuenciación), los valores de corriente observados en cada NME modificados por sonda disminuyeron en el siguiente orden: I >>>> III > VI. En la muestra del paciente que contiene la fusión de tipo III, las señales electrónicas apuntaron nuevamente a la identidad correcta de la fusión con la sonda III >>>> I > VI. Estos resultados, y los obtenidos con el ARN celular DU145, VCaP y H660, donde el perfilado electrónico denominó correctamente ausencia o presencia de fusiones de genes, indican que los chips de NME pueden perfilar estos importantes biomarcadores en muestras complejas y distinguir los perfiles de biomarcadores asociados con diferentes resultados clínicos.

La plataforma de detección que se describe aquí no solo es específica, sensible y robusta, sino que también es práctica y escalable. El método de fabricación reproducible que se escogió es susceptible a la producción de chips modificados con sonda que utilizan las mismas tecnologías fotolitográficas de uso generalizado en la fabricación de microchips de electrónica de consumo; y solo se necesita una instrumentación simple y económica para la lectura. No se requieren microfluidos para el análisis automatizado, ya que la hibridación se puede realizar y leer en un solo recipiente de reacción. Este sistema representa una alternativa atractiva a los métodos basados en PCR que son sensibles pero difíciles de automatizar en un entorno clínico.

En resumen, la nueva plataforma de electrodos multiplexados que describimos aquí es la primera en leer directamente un panel de biomarcadores de cáncer en muestras clínicamente relevantes utilizando señales electrónicas. La matriz que permite estas mediciones cuenta con microelectrodos que poseen nanotexturas controlables y versátiles, esenciales para la sensibilidad. El sistema combina estos electrodos nanotexturados con una lectura catalítica rápida para lograr un objetivo de larga data: el análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer utilizando una plataforma económica y práctica.

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

15 Materiales y métodos

Materiales. 6-mercapto-1-hexanol (97% MCH), cloruro de hexaamina rutenio (99.9 +%), ferricianuro de potasio (99%) y cloruro de paladio (II) (99.9 +%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON), se obtuvieron ácido perclórico (70%), acetona (grado ACS) y alcohol isopropílico (IPA, grado ACS) de EMD (Gibbstown, NJ). Los oligómeros de PNA tiolados se obtuvieron de Biosynthesis Inc (Lewisville, TX) con grado purificado por HPLC. PNA sondea un dipéptido Cys-Gly en su N-terminal. Gly actúa como un espaciador, mientras que Cys proporciona tiol libre para la inmovilización en la superficie del electrodo. MicroRNA sintéticos (extremo 5' fosforilados y purificados por HPLC) se obtuvieron de Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL). Todas las secuencias de PNA y ARN se muestran en la tabla SI que se proporciona en la información de soporte.

Fabricación de chips. Los chips fueron fabricados en el Canadian Photonics Fabrication Center. Las obleas de silicio de 3" se pasivaron utilizando una capa gruesa de dióxido de silicio cultivado térmicamente. Se depositó una capa de oro de 350 nm sobre el chip utilizando evaporación de oro asistida por haz de electrones. La película de oro se modeló utilizando una fotolitografía estándar y un proceso de despegue. Se depositó una capa de dióxido de silicio aislante de 500 nm utilizando deposición química de vapor, se imprimieron aberturas de 500 nm en los electrodos utilizando fotolitografía estándar y se expusieron almohadillas de enlace de 2 mm x 2 mm utilizando fotolitografía estándar.

Fabricación de microelectrodos nanoestructurados. Los chips se limpiaron enjuagando con acetona, IPA y agua DI durante 30 segundos y se secaron con un flujo de nitrógeno. Toda la electrodeposición se realizó a temperatura ambiente con un potenciostato Epsilon de Bioanalytical Systems con un sistema de tres electrodos con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Se utilizaron aberturas de 500 nm en los electrodos fabricados como electrodos de trabajo y se pusieron en contacto utilizando las almohadillas de unión expuestas. Se sumergió una porción de 2 mm del chip en el baño de recubrimiento que contenía cloruro de paladio (II) 5 mM y ácido perclórico 0.5 M, y se incubó durante aproximadamente 5 minutos antes del electrochapado. Las almohadillas de unión se mantuvieron libres de solución. Los NME de Pd se fabricaron utilizando una amperometría de potencial de DC a un potencial aplicado de -100 mV durante 6 s.

Modificación de NMEs con sondas de PNA. Las sondas de PNA tioladas monocatenarias se disolvieron en una solución reguladora (pH 7) que contenía fosfato de sodio 25 mM y cloruro de sodio 25 mM a una concentración de 500 nM. A continuación, la solución se calentó a 50 °C durante 10 minutos para disolver completamente las moléculas de PNA. Luego se agregó una cantidad adecuada de MCH 10 mM para hacer la concentración final de MCH de 100 nM. 10 µL de esta mezcla se depositaron rápidamente en un chip que mostraba los NME de Pd utilizando un micropipetador manual. Este chip cubierto con la solución de sonda de PNA se incubó luego en una cámara de humedad oscura durante la noche a 4 °C. Los NME de Pd modificados con sonda se enjuagaron vigorosamente con la solución reguladora anterior antes de las mediciones. Para experimentos multiplexados, se utilizaron chips con ocho cables individualmente direccionables.

Hibridación de objetivos. Las soluciones de hibridación contenían diversas concentraciones de objetivos en fosfato de sodio 25 mM (pH 7.0) y NaCl 25 mM. Los NME de Pd se incubaron con 10 µL de solución objetivo a 37 °C en una cámara de humedad durante 30 minutos para permitir que las moléculas de la sonda inmovilizadas se hibridaran con las moléculas objetivo. El chip se enfrió luego y se lavó vigorosamente con regulador antes del análisis electroquímico.

Mediciones electroquímicas. Las mediciones electroquímicas se realizaron con un analizador electroquímico (BASi, West Lafayette, EE. UU.) En una solución que contenía Ru(NH₃)₆³⁺ 10 mM, Fe(CN)₆³⁻ 4 mM, fosfato de sodio 3 mM 25 mM (pH 7,0) y NaCl 25 mM. La voltametría cíclica (CV) se realizó antes y después de la adición de soluciones objetivo a una tasa de barrido de 100 mV/s. La voltimetría diferencial de pulso (DPV) se realizó en una etapa potencial de 5 mV, amplitud de pulso de 50 mV, ancho de pulso de 50 ms y un período de pulso de 100 ms. Las señales de voltametría cíclica antes y después de la hibridación se recolectaron con una tasa de barrido de 100 mV/s. La limitación de la corriente reductora (I) se cuantificó restando el fondo a 0 mV de la corriente catódica a -300 mV en una señal de

voltametría cíclica. Los cambios de señal correspondientes a la hibridación se calcularon de la siguiente manera: $\Delta I = (I_{ds} - I_{ss}) / I_{ss} \times 100$ ($ss =$ antes de la hibridación, $ds =$ después de la hibridación). El límite de detección se determinó como la primera concentración donde la señal sustraída de fondo (ΔI no complementaria) fue 2 veces más alta que la desviación estándar de la muestra de control no complementaria 10 fM.

- 5 Generación de imágenes SEM. Se empleó el HITACHI S-3400 SEM (Hitachi High Technologies America, Inc., Pleasanton, CA) para estudiar la morfología y la dimensión de los NME electrochapados. El chip se fijó en un adaptador SEM de acero inoxidable utilizando una cinta adhesiva de carbón negro de doble cara. La imagen SEM se adquirió utilizando el modo de electrones secundarios a 20 kV.

- 10 Extracción de ARN para análisis de PCR y protocolo de amplificación. El ARN total se extrajo de líneas celulares con el kit mirVana (Ambion). La calidad de las muestras se evaluó mediante análisis de RT-PCR del control endógeno RNU44 utilizando el ensayo de microARN Applq de Biosystems. Este ensayo incluye una etapa de transcripción reversa (RT) utilizando el kit de transcripción reversa de microARN TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) en donde un cebador RT de tallo bucle se hibrida específicamente con una molécula mir y luego se transcribe de forma reversa con una transcriptasa reversa MultiScribe. En resumen, la mezcla de transcripción reversa incluye cebadores RT de tallo-bucle 50 nM, 1x regulador RT, 0.25 mM cada uno de los dNTP, 3.33 U/μL de transcriptasa reversa MultiScribe y 0.25 U/μl de inhibidor de RNasa. La reacción de 7.5 μl se incubó luego en un termociclador Applied Biosystems 7900 durante 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y luego se mantuvo a 4 °C. Los productos de RT se amplificaron posteriormente con cebadores específicos de secuencia (hsa-mir-21 cebador 4373090, y hsa-mir-205 cebador 4373093 de Applied Biosystems) utilizando el sistema PCR en tiempo real de Applied Biosystems 7900 HT. La mezcla de PCR de 10 μL contiene un producto de RT de 0.67 μl, una mezcla 1x4 TaqMan® Universal PCR Master, una sonda TaqMan® de 0.2 μM, un cebador de avance de 1.5 μM y un cebador reverso de 0.7 μM. Las reacciones se incubaron en una placa de 384 pozos a 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

- 25 Clonación y expresión de pre-miARN-21. El ADNc se produjo mediante la transcripción reversa de 500 ng de ARN total de células FaDu utilizando el kit de transcripción reversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 50 ng de ADNc como plantilla para la amplificación por PCR del bucle-tallo del premiRNA-21 con 1 HM de los cebadores MIR-F (CCT ACC ATC GTG AC A TCT CCA TGG) y MIR-R (ATG AGA ACA TTG GAT ATG GAT GGT). Las condiciones para la PCR fueron: 95 °C durante 2 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de la PCR se purificó con el kit de extracción de gel, Qiagen) y se clonó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen). Las colonias fueron recogidas y cultivadas en medio LB. El ADN plasmídico se purificó con el Mini Kit de Plásmidos (Qiagen) y se verificó el producto correcto, la orientación y la ausencia de mutaciones no deseadas con la secuenciación (ACGT corporation). El ADN plasmídico se digirió con NotI, que no genera extremos sobresalientes en 3' que producen ARN de vector de fondo alto durante la transcripción in vitro. Se utilizó 1 μg de ADN plasmídico linealizado como plantilla para la transcripción in vitro con el kit de transcripción de alto rendimiento AmpliScribe™ T3 (Epicentre Biotechnologies). Después de completar la transcripción reversa, se añadió DNasa I para digerir la plantilla de ADN y el ARN se purificó con el Kit PureLink Micro a Midi Total RNA Purification (Invitrogen). La concentración de ARN se determinó leyendo la absorbancia a 260 nm.

Resultados y discusiones

- 40 Los inventores se esforzaron en desarrollar un nuevo método para la creación de perfiles de microARN que contara con la conveniencia del análisis basado en matrices, pero aumentaría el poder de tal multiplexación con la excepcional sensibilidad requerida para analizar pequeñas muestras biológicas en busca de microARN de baja abundancia. Dado que los métodos convencionales basados en la fluorescencia no son lo suficientemente sensibles para monitorizar la hibridación de pequeñas cantidades de moléculas en secuencias de sondas unidas a la superficie con una instrumentación simple, en cambio, los inventores siguieron una metodología que emplea la lectura electrónica.

- 55 Con el fin de proporcionar una plataforma para la detección electrónica de microARN, se preparó un chip multiplexado que presentaba un patrón de electrodo generado por fotolitografía. Este chip se fabricó utilizando una oblea de silicón como base y se depositó un patrón de oro en su superficie para proporcionar un conjunto multiplexado de cables y contactos externos. Se depositó una capa de SiO sobre el oro para pasivar el metal, y luego, en la etapa final de fabricación, se abrieron aberturas de 500 nanómetros en el extremo de cada cable para exponer el oro. Para generar microelectrodos sobresalientes, se electrodepositó paladio en las aberturas. La etapa de electrodeposición se diseñó para producir microelectrodos altamente nanoestructurados (NMEs). Estudios previos han indicado que los elementos de detección nanoestructurados pueden presentar las sondas biomoleculares de manera más eficiente que los materiales a granel y facilitar las reacciones de complejación de la superficie, pero esta ventaja nunca se ha explotado para el perfilado biológico directo.

- 60 Para probar la sensibilidad y especificidad del chip electrónico en la detección de microARN, se modificaron los NME de Pd con sondas de PNA y se expusieron a ARN para la hibridación. La complejación se ensayó utilizando un sistema indicador rédox, que anteriormente demostró que exhibía sensibilidad femtomolar cuando se usaba junto con electrodos nanoestructurados y sondas de PNA. (R. Gasparac, et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 12270; Z. Fang, SO Kelley, Anal. Chem. 2009, 81, 612; MA Lapierre, et al., Anal. Chem. 2003, 75, 6327; MA Lapierre-Devlin, et al.,

Nano Lett. 2005, 5, 1051). Este sistema informador se basa en la acumulación de Ru(III) cuando los ácidos nucleicos se hibridan en la superficie de un electrodo, y las señales obtenidas de este informador se amplifican mediante la inclusión de ferricianuro, que puede regenerar químicamente el Ru(III) después de su reducción electroquímica. Las titulaciones de la secuencia de miR-21 mostraron cambios de señal detectables en relación con las secuencias de control no complementarias cuando las soluciones que contenían tan solo 10 aM del objetivo se expusieron a los NME basados en chips. Esto corresponde a 10 moléculas por microlitro de muestra. El nivel muy alto de sensibilidad está acompañado por un rango dinámico limitado de solo 10^2 , pero para la detección de microARNs, este compromiso es merecido debido a la baja abundancia de estas secuencias.

Se requieren específicamente dos criterios de detección adicionales cruciales en la detección de microARN. En primer lugar, las secuencias estrechamente relacionadas - diferentes por tan solo una base - deben distinguirse con precisión. En segundo lugar, se deben discriminar los apéndices de secuencia como los que se encuentran en los microARN maduros frente a los precursores. Los inventores buscan desafiar el sistema con cada uno de estos requisitos. Primero se investigó la especificidad del ensayo para las secuencias de microARN maduras. Esto se realizó analizando los cambios de señal observados cuando el chip se expuso a soluciones que contenían bien sea la forma precursora de miR-21 de longitud completa, de doble cadena, o la secuencia de miR-21 madura, de cadena simple y significativamente más corta. La señal obtenida para la estructura del precursor de horquilla se acercó a los niveles de fondo, mientras que se observó un cambio de señal robusto para el miR-21 maduro.

Se evaluó la sensibilidad de la metodología de detección a mutaciones puntuales mediante la monitorización de la respuesta de los elementos de detección modificados con la sonda a dos secuencias estrechamente relacionadas, miR-26a y miR-26b. Las sondas complementarias a cada secuencia se dispusieron en el chip, y se monitorizó la respuesta de estos elementos a las secuencias complementarias. La señal obtenida cuando se introdujo miR-26a fue aproximadamente 4 veces para la sonda miR-26a completamente coincidente sobre la sonda miR-26b no coincidente, y de manera similar, la señal obtenida cuando se introdujo miR-26b fue aproximadamente 4.5 veces más alta para la sonda miR-26b totalmente coincidente sobre su sonda de contraparte no coincidente. Estos resultados indican que este chip multiplexado puede discriminar con éxito secuencias de microARN estrechamente relacionadas.

Derivar una "huella digital" de la expresión de microARN a partir de líneas celulares que representan un tipo particular de tumor en relación con las células normales ha demostrado ser una metodología poderosa para identificar microARNs que pueden servir como biomarcadores en pacientes. Después de haber confirmado la especificidad y la sensibilidad del chip hacia los objetivos de microARN, se probaron utilizando muestras de ARN extraídas de células normales humanas y las derivadas de líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello humano que crecieron en cultivo. Por ejemplo, el ARN total extraído de la línea celular FaDu del cáncer escamoso hipofaríngeo humano y una línea celular epitelial oral normal se valoraron en un microelectrodo nanoestructurado que muestra una sonda complementaria a miR-205. Se obtuvo una señal positiva con tan solo 5 ng de ARN derivado de las células FaDu, mientras que las células epiteliales normales no produjeron ningún cambio de señal con hasta 20 ng de ARN. Esto indica que la respuesta de la señal corresponde a un marcador único presente en niveles significativamente más altos en las líneas celulares del cáncer.

Se perfilaron dos microARN diferentes, miR-21 y miR-205, y también se incluyó un ARN de control, RNU-44 en un panel de muestras de ARN total. Se emplearon tres líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello, y se comparó la respuesta del chip del microelectrodo a estas muestras de ARN total en relación con el ARN aislado de células epiteliales orales normales. Como se esperaba, los niveles de RNU-44, a juzgar por la respuesta electroquímica medida para cada muestra de ARN total expuesta a un elemento detector modificado con una sonda complementaria, se mantuvieron constantes en todas las cuatro líneas celulares. Sin embargo, las señales de miR-21 y miR-205 estaban ambas significativamente elevadas en las líneas celulares de cáncer. De hecho, se juzgó que los niveles de estos microRNA estaban presentes a niveles > 100 veces más altos en las líneas celulares de cáncer en relación con las células epiteliales normales. La sobreexpresión de estos objetivos se confirmó mediante PCR cuantitativa convencional (véase información de apoyo). Se ha observado previamente que tanto miR-21 como miR-205 están elevados en carcinomas escamosos primarios de cabeza y cuello humanos, lo que indica un potencial significativo para que estos microRNA sirvan como biomarcadores de diagnóstico para esta enfermedad maligna.

En conclusión, el chip de detección de microARN descrito aquí ofrece la sensibilidad y especificidad para el análisis de una nueva clase de biomarcadores de ácidos nucleicos que representan uno de los objetivos de detección más desafiantes. La lectura electrónica de los perfiles de microARN ofrece un método rápido - aunque altamente preciso - para analizar directamente las muestras de ARN en busca de secuencias específicas, y la falta de etiquetado o amplificación hace que esta metodología sea extremadamente sencilla y eficiente, características que no se pueden obtener con otras metodologías basadas en PCR o en hibridación.

Listado de secuencias

<110> THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO TAFT, BRADFORD SOLEYMANI, LEYLA FANG, ZHICHAO SARGENT, EDWARD KELLEY, SHANA

<120> MICROELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS Y DISPOSITIVOS BIODENSORES QUE INCORPORAN LOS MISMOS

<130> 109904-0004-EP1
 <140> EP09810953.1
 <141> 2009-09-01
 <150> PCT/CA2009/001212
 5 <151> 2009-09-01
 <150> 61/093,667
 <151> 2008-09-02
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética
 <220>
 <221> características_misceláneas
 <222> (1)..(20)
 <223> PNA
 20 <400> 1
 ataaggcttc ctgccgcgct 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética
 <220>
 <221> características_misceláneas
 30 <222> (1)..(20)
 <223> PNA
 <400> 2
 ctggaataac ctgccgcgct 20
 <210> 3
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda sintética
 <220>
 <221> características_misceláneas
- 5 <222> (1)..(20)
 <223> PNA
 <400> 3
 ataaggcttc tgagttcaaa 20
 <210> 4
- 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 15 <400> 4
 agcgcggcag gaagccttat 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 agcgcggcag gtcatttga 20
- 25 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 6
 tcatatcaag gaagccttat 20
 <210> 7
 <211> 20
- 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 7

tttttttt tttttttt 20

<210> 8

5 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

10 <400> 8

cctaccatcg tgacatctcc atgg 24

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 9

atgagaacat tggatgga tgg 24

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para llevar a cabo un proceso biosensor que comprende:
 - proporcionar un dispositivo biosensor, comprendiendo el dispositivo biosensor un sustrato, un cable eléctricamente conductor sobre el sustrato, una capa aislante dispuesta en el cable y que define una abertura que expone una porción del cable, y un microelectrodo nanoestructurado dispuesto en el cable y en comunicación eléctrica con la porción expuesta del cable, el microelectrodo nanoestructurado configurado para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular;
 - polarizar el microelectrodo nanoestructurado en relación con un electrodo de referencia;
 - medir una carga de referencia o un flujo de corriente de referencia entre el microelectrodo nanoestructurado y el electrodo de referencia;
 - exponer el microelectrodo nanoestructurado a un estímulo biomolecular;
 - medir una carga o un flujo de corriente generado en el microelectrodo nanoestructurado en respuesta al estímulo biomolecular; y
 - determinar la cantidad de estímulo biomolecular comparando la carga medida contra la carga de referencia o el flujo de corriente medido con el flujo de corriente de referencia.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la carga o el flujo de corriente generado en el microelectrodo se mide con un sistema informador electrocatalítico.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el sistema informador electrocatalítico comprende hexamina de rutenio, ferricianuro de potasio o una combinación de hexamina de rutenio y ferricianuro.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado está dispuesto en la abertura que expone una parte del cable.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la abertura está grabada en la capa aislante.
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en el que un material conductor se electrodeposita en la porción expuesta del cable para formar el microelectrodo nanoestructurado.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado es capaz de presentar una sonda biomolecular en una superficie del mismo.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado es nanotexturado.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado es espigado o fractal.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado comprende un material seleccionado del grupo que consiste en: un metal noble, una aleación de un metal noble, un polímero conductor, un óxido de metal, un siliciuro de metal, un metal nitruro, carbono o una combinación de cualquiera de los mismos.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el estímulo biomolecular es la hibridación de ácidos nucleicos o la unión de proteína a proteína.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microelectrodo nanoestructurado comprende además una sonda seleccionada del grupo que consiste en: moléculas de sonda tioladas, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, u oligómeros de morfolino y fosforodiamidato terminados con tioles, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, aminas, carboxilatos, proteínas o péptidos funcionalizados con moléculas de enlace adecuadas y anticuerpos funcionalizados con moléculas de enlace adecuadas.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se proporciona una pluralidad de microelectrodos nanoestructurados en una matriz, y cada microelectrodo nanoestructurado es direccionable individualmente.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la matriz se usa para el análisis multiplexado de biomarcadores de cáncer en una muestra biológica.
15. Un dispositivo biosensor que comprende:

- un sustrato;
- al menos un cable eléctricamente conductor en el sustrato;
- una capa aislante que cubre el cable, teniendo la capa aislante una abertura que expone una porción del cable;
- 5 un microelectrodo nanoestructurado adaptado por medio de un sistema informador electrocatalítico para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular, en el que el microelectrodo nanoestructurado es espigado o fractal;
- al menos una molécula de sonda unida a dicho microelectrodo; y
- en el que dicho microelectrodo está en comunicación eléctrica con la porción expuesta del cable.

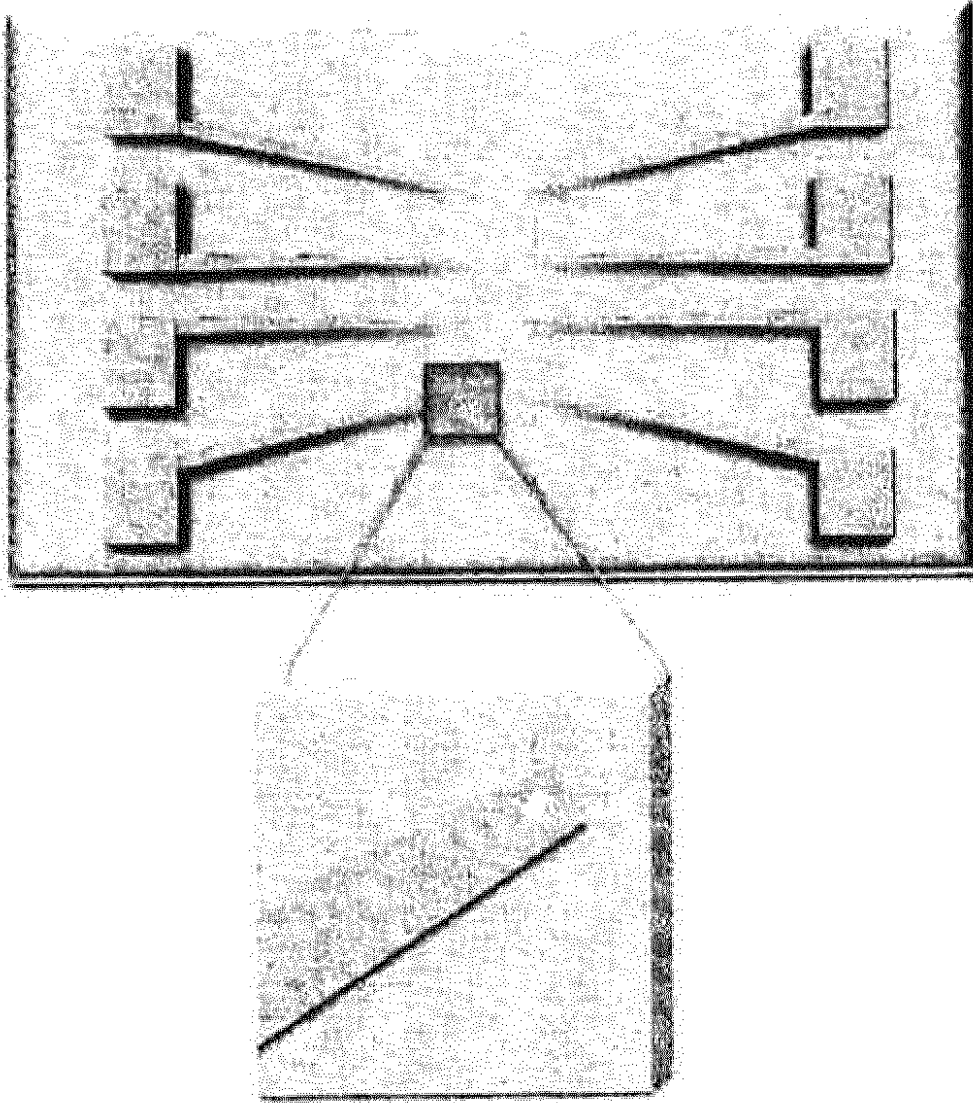


FIG. 1A

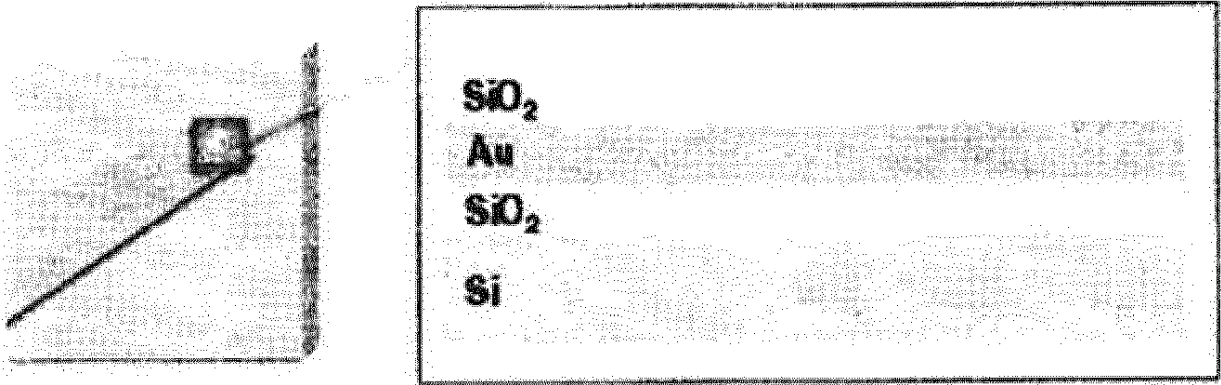


FIG. 1B

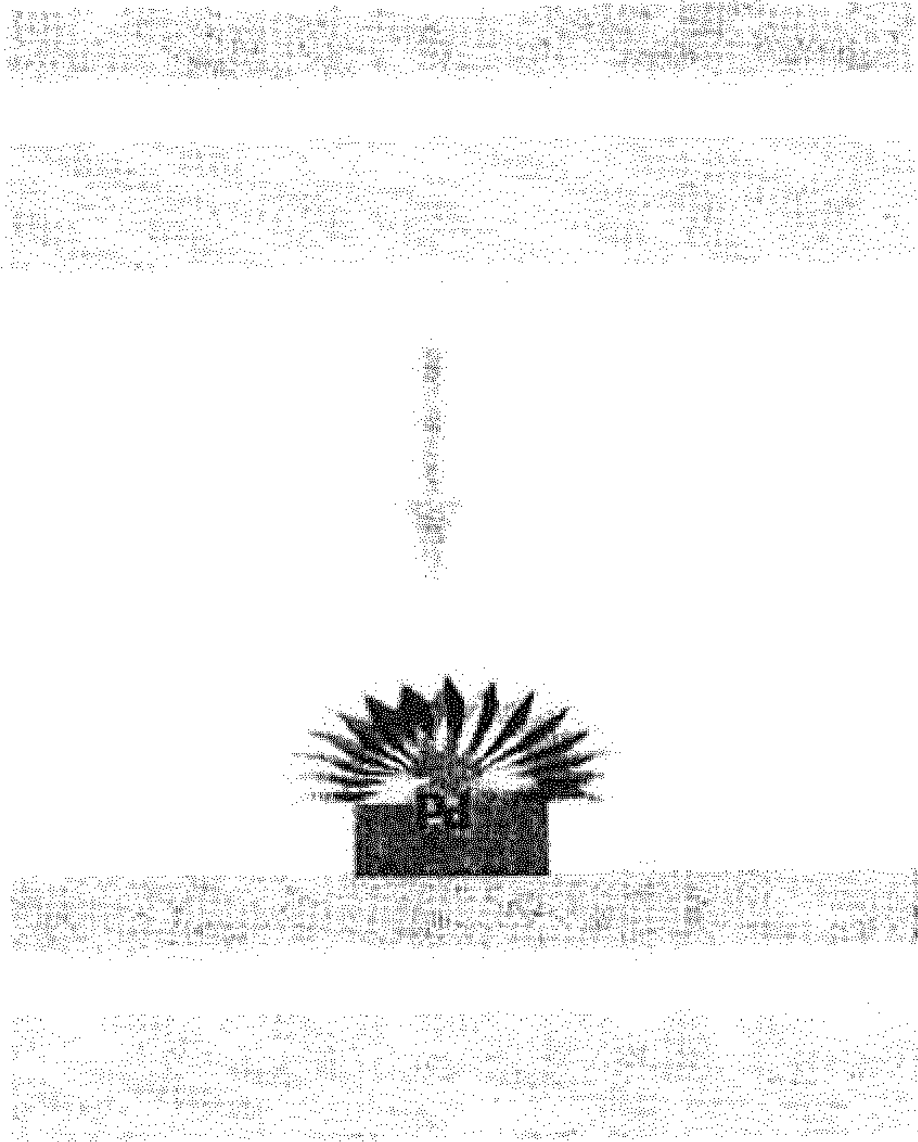


FIG. 1C

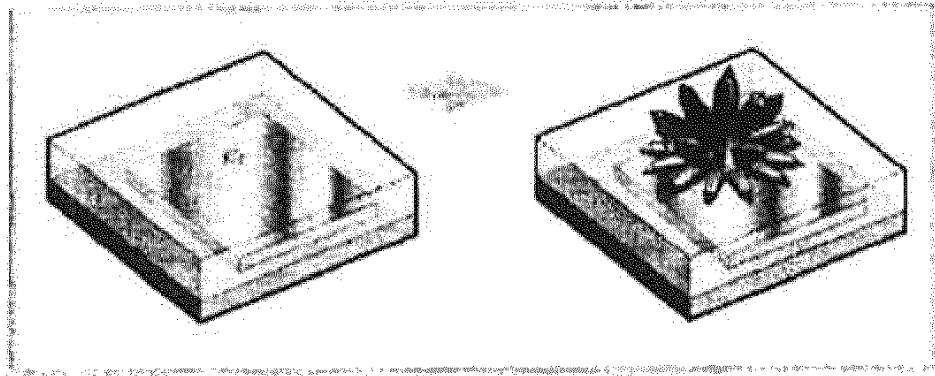
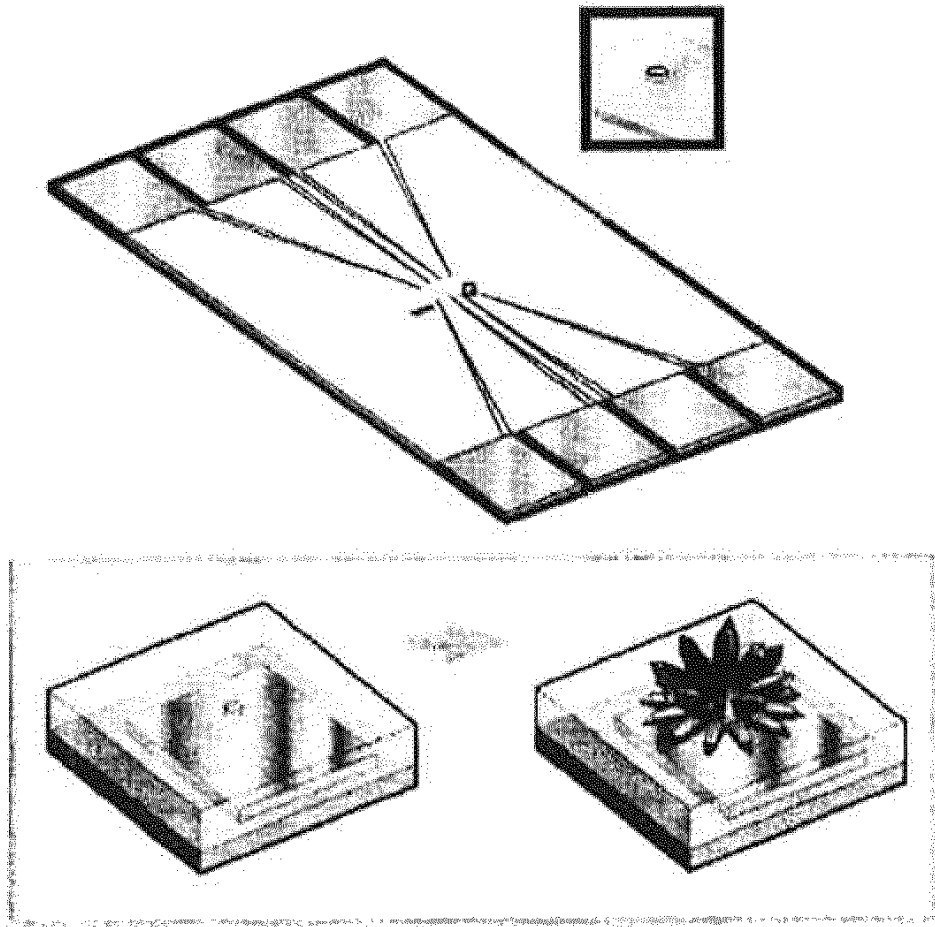


FIG. 2

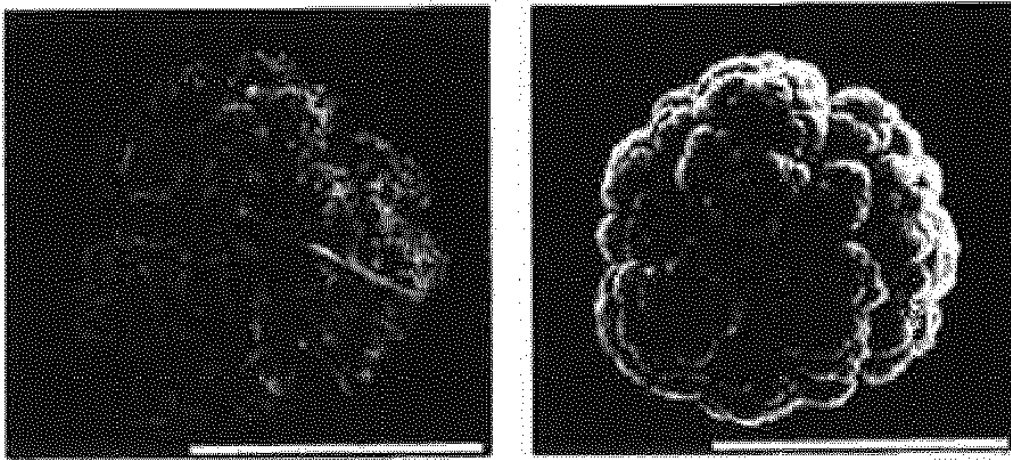


FIG. 2B

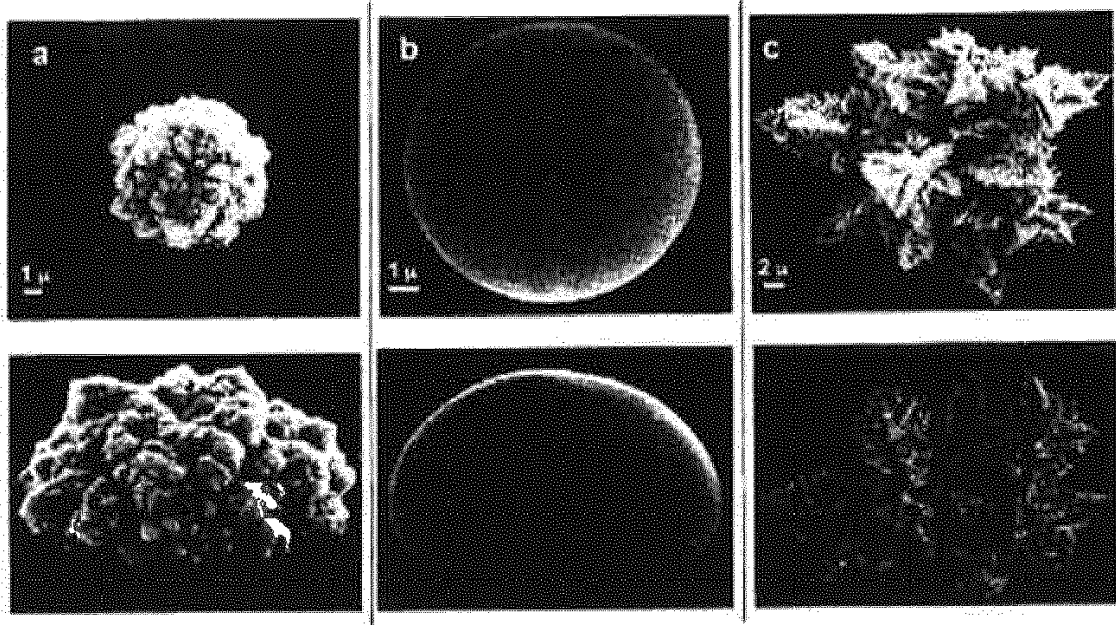


FIG. 3

nanoestructuración creciente

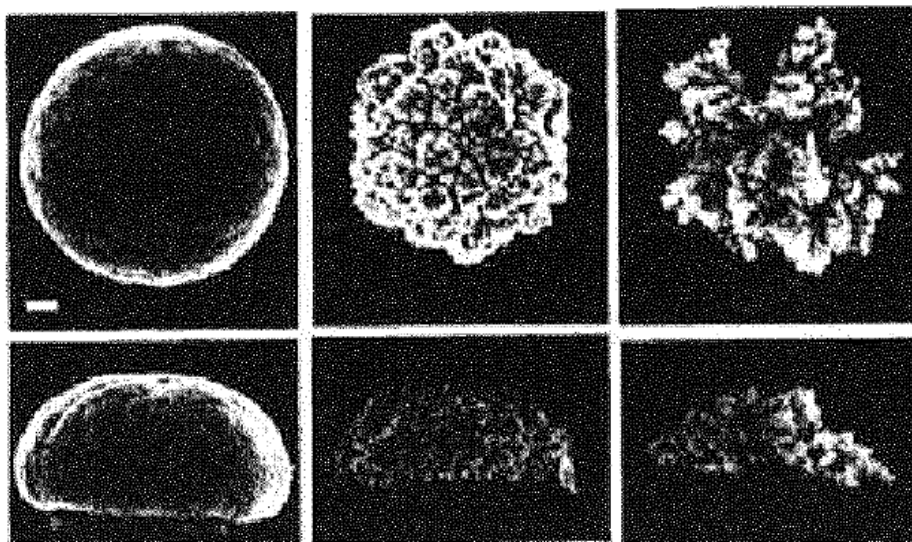


FIG. 4

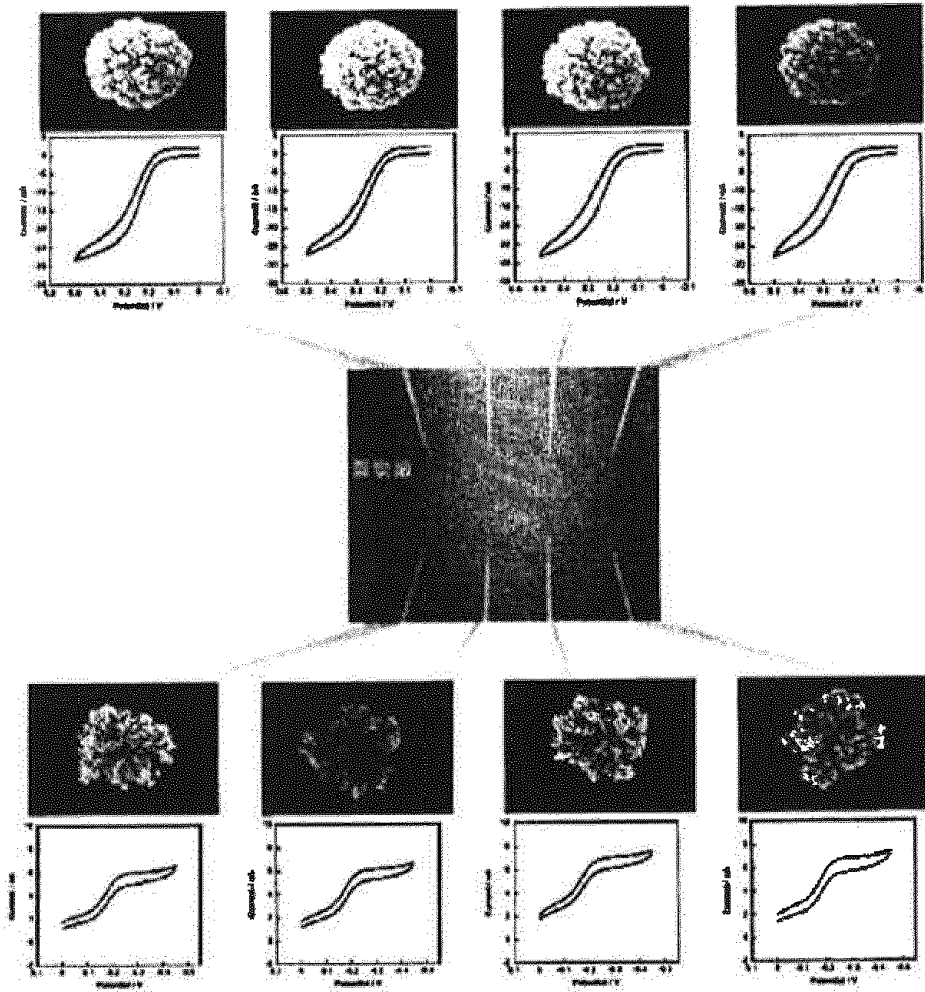


FIG. 5

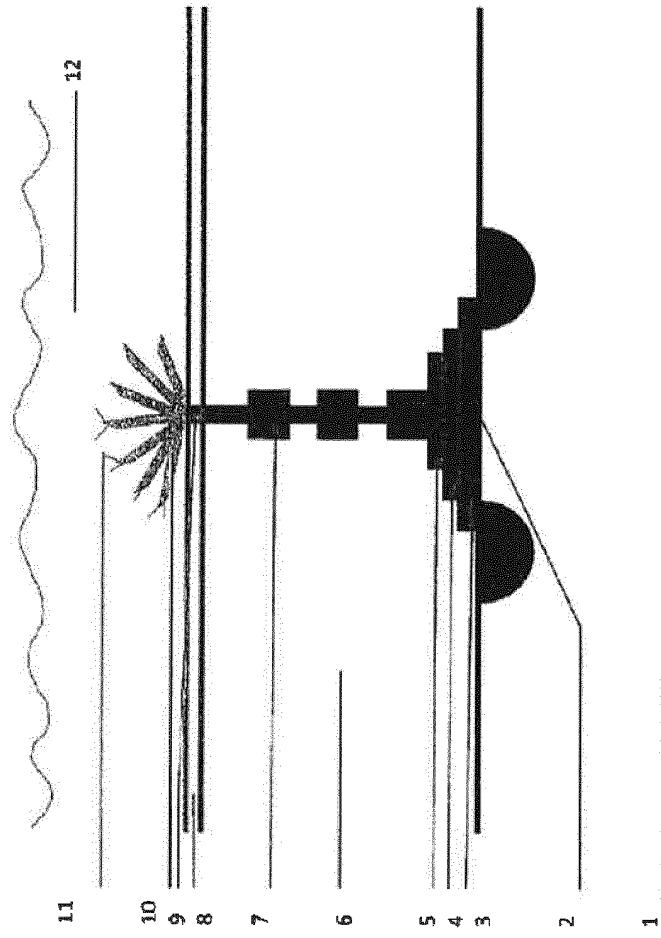


FIG. 6

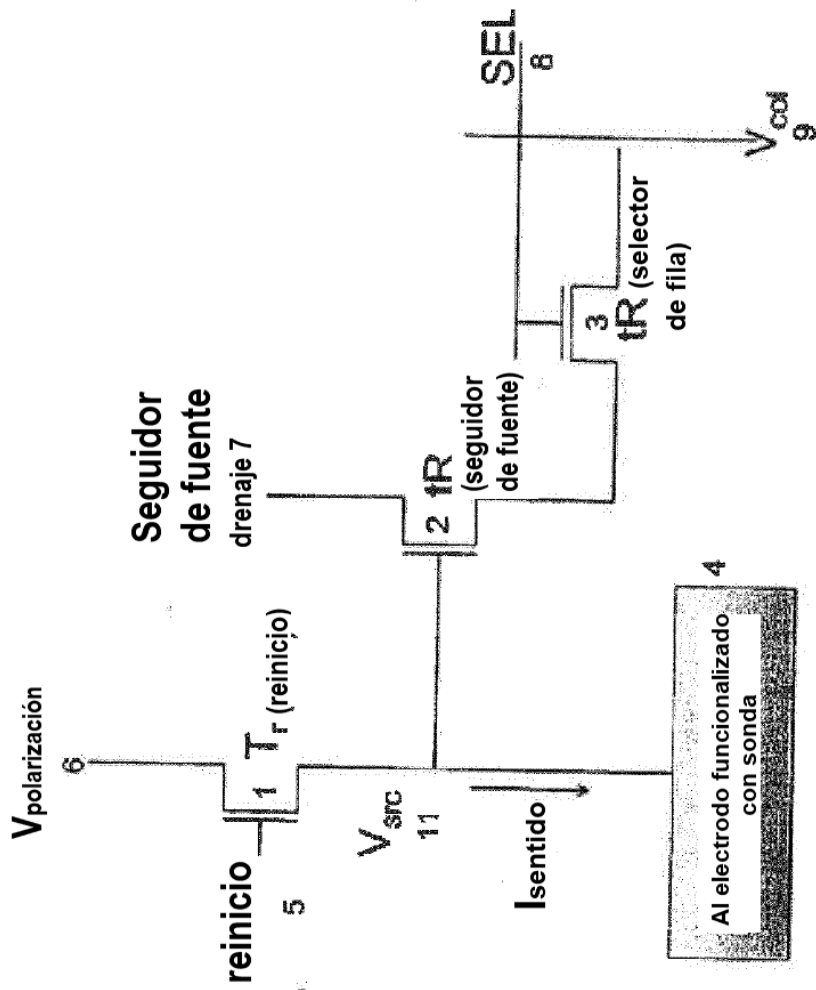


FIG. 7

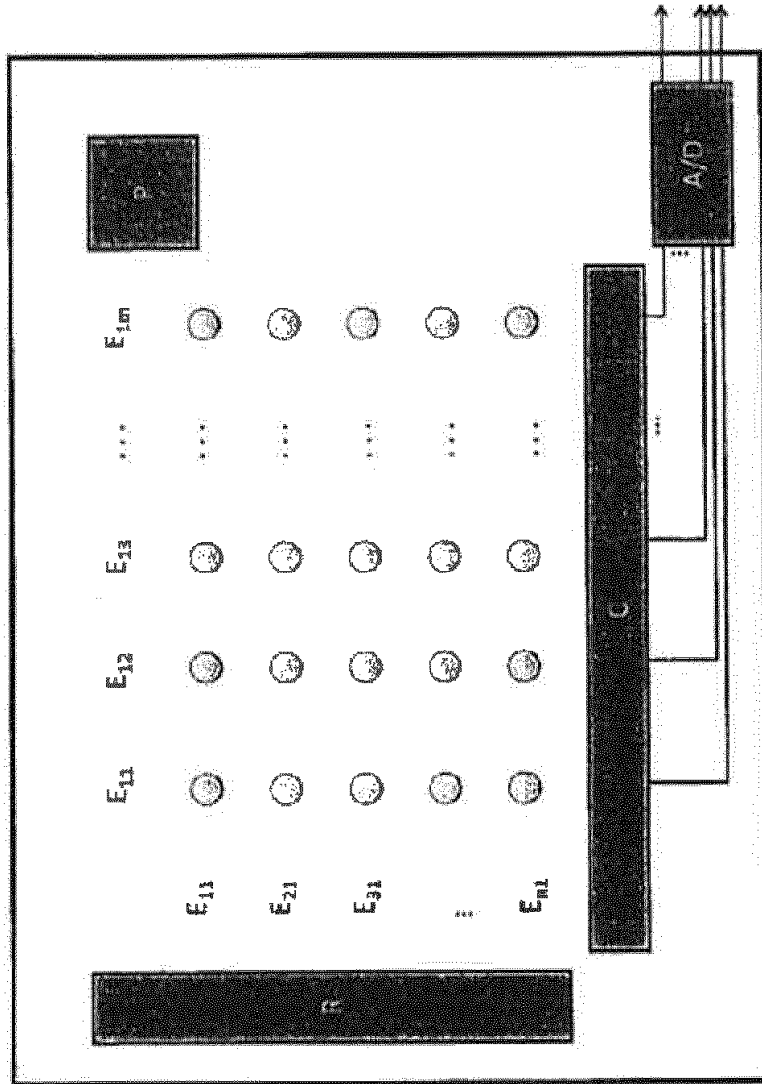


FIG. 8

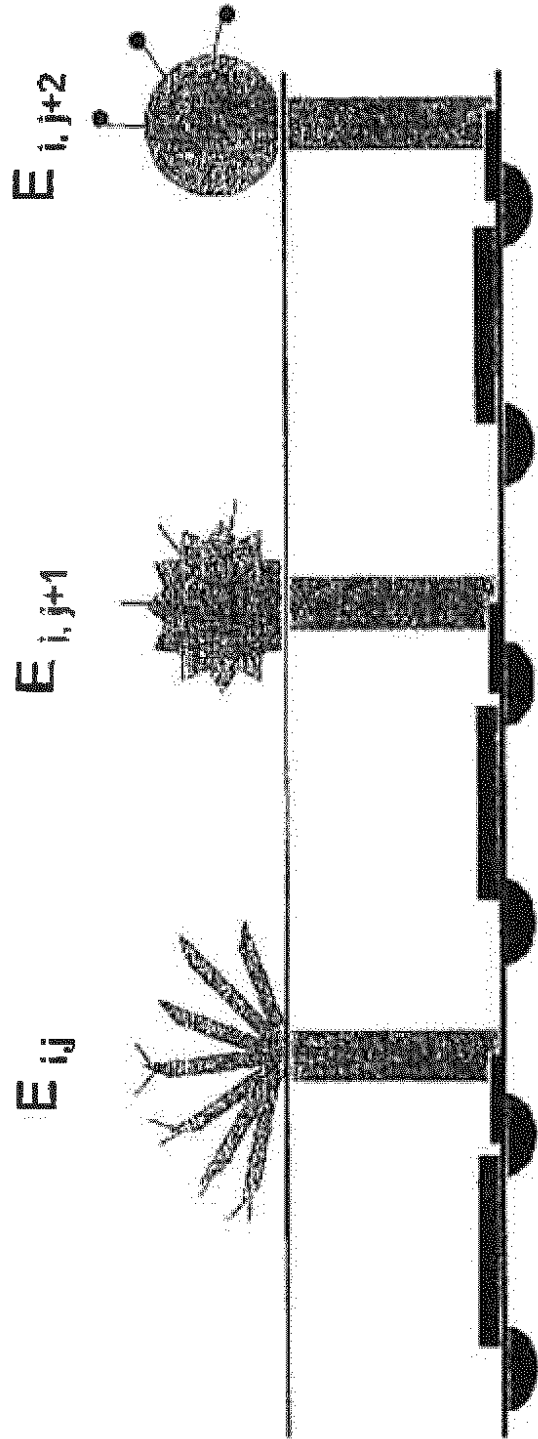


FIG.9

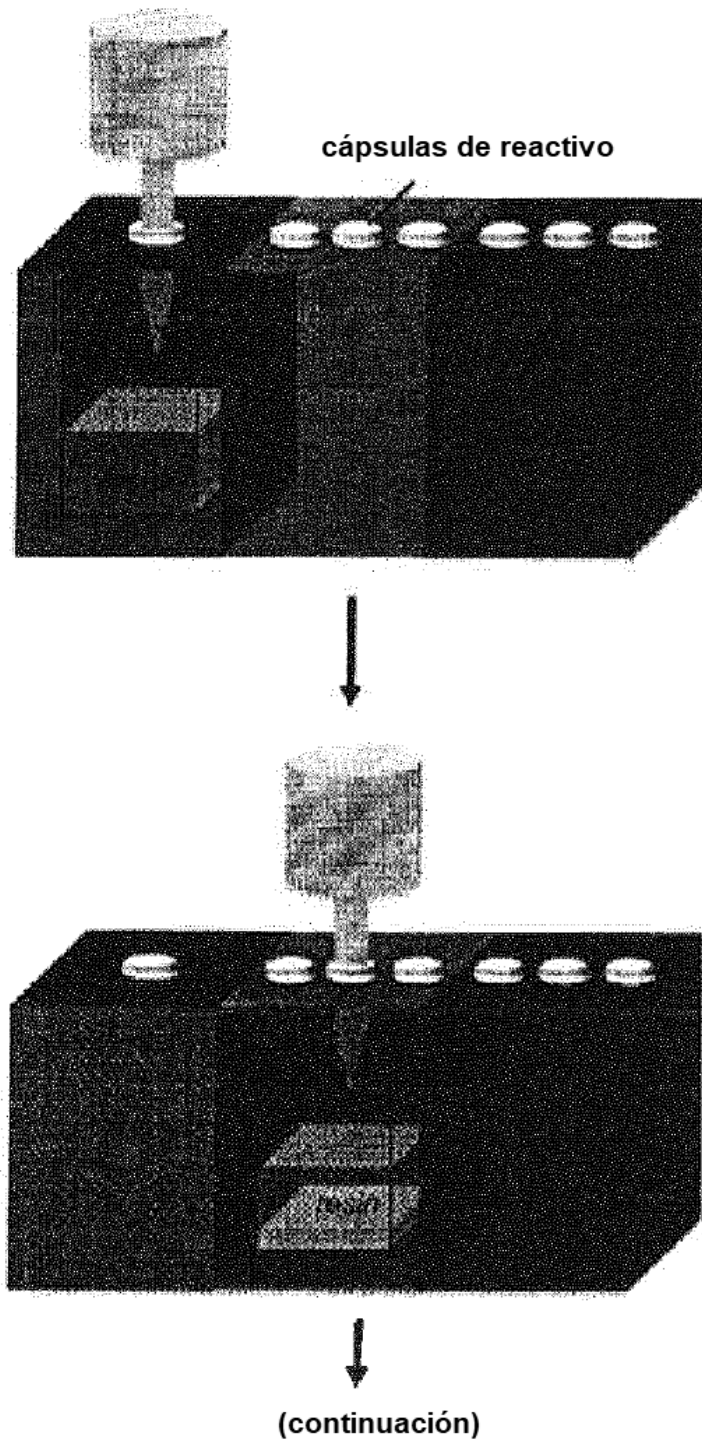


FIG.10A

(continuación)

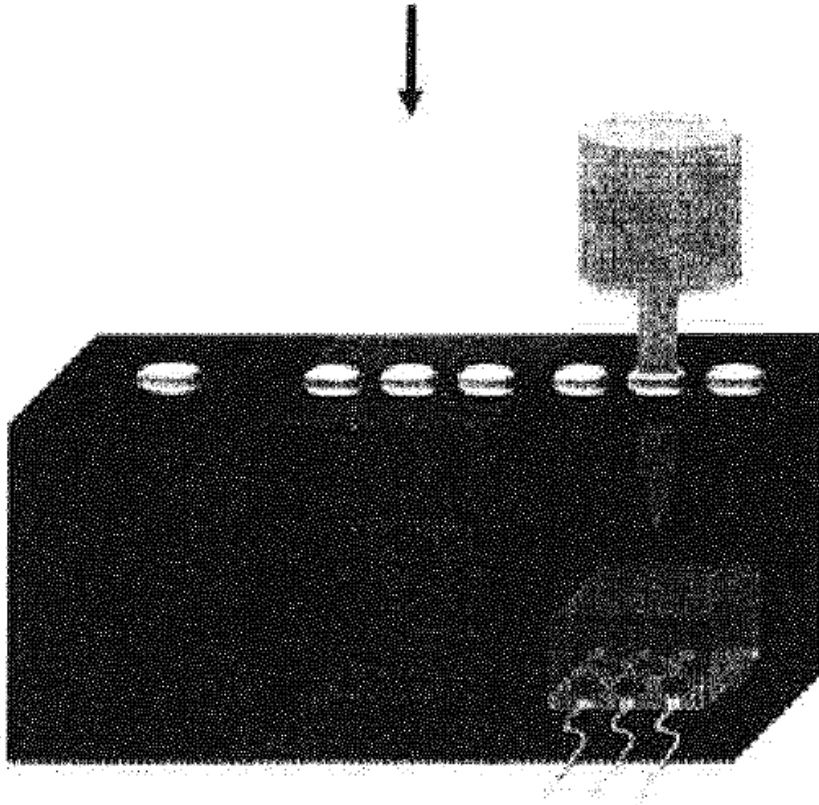


FIG.10B

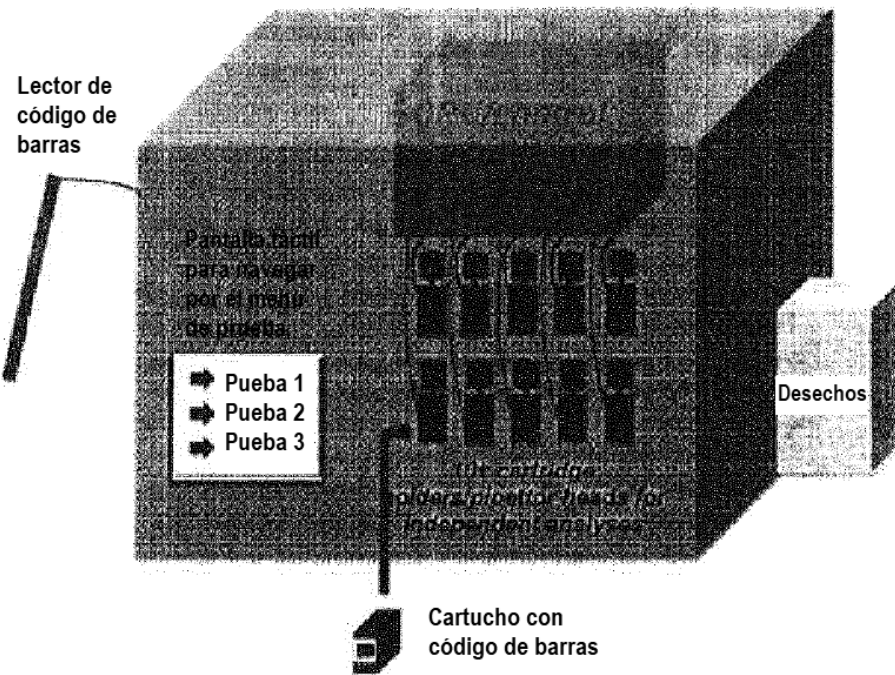


FIG.11