



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 278 757**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01946805 .7**

(86) Fecha de presentación : **11.01.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1246699**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2002**

(54) Título: **Cartucho que comprende un biochip.**

(30) Prioridad: **11.01.2000 US 175539 P**
03.11.2000 US 245840 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **Clinical Micro Sensors, Inc.**
757 S. Raymond Avenue
Pasadena, California 91105, US

(72) Inventor/es: **Duong, Hau, H.;**
Blackburn, Gary;
Kayyem, Jon. F.;
O'Connor, Stephen D.;
Olsen, Gary T.;
Pietri, Robert y
Terbrueggen, Robert H.

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

Cartucho que comprende un biochip.

5 **Campo de la invención**

La invención va dirigida a dispositivos que permiten análisis de biochips múltiples simultáneos. En particular, los dispositivos están configurados para sostener múltiples cartuchos que incluyen biochips que comprenden matrices, por ejemplo matrices de ácidos nucleicos, y permiten un análisis de muestras de alto rendimiento.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe una serie de análisis y sensores para la detección de la presencia y/o concentración de sustancias específicas en líquidos y gases. Muchos de éstos se basan en reacciones ligando/antiligando específicas como mecanismo de detección. Es decir, se conoce que pares de sustancias (es decir los pares de enlace o ligando/antiligandos) se enlazan entre sí, mientras que se enlazan poco o no lo hacen a otras sustancias. Éste ha sido el foco de una serie de técnicas que utilizan estos pares de enlace para la detección de los compuestos. Éstas se realizan generalmente marcando un componente del compuesto de cierta manera, para así hacer que toda la molécula pueda detectarse utilizando, por ejemplo, radioisótopos, moléculas fluorescentes y otras ópticamente activas, enzimas, etc.

Otros análisis se basan en señales electrónicas para la detección. De particular interés son los biosensores. Se conocen por lo menos dos tipos de biosensores; biosensores basados en enzimas o metabólicos y sensores de enlace o bioafinidad. Véase por ejemplo las patentes americanas n° 4.713.347; 5.192.507; 4.920.047; 3.873.267; y las referencias que se indican en las mismas. Aunque algunos de estos sensores conocidos utilizan técnicas de corriente alterna (CA), estas técnicas se limitan generalmente a la detección de diferencias en la impedancia aparente (o dieléctrica).

Actualmente se conocen una variedad de biosensores de ácidos nucleicos. Éstos incluyen biochips de ácidos nucleicos basados en la detección fluorescente; véase por ejemplo referencias desarrolladas por Affymetrix (que incluyen las patentes, aunque no se limitan a ellas, 5.800.992, 5.445.934, 5.744.305, y patentes y referencias asociadas), Nanogen (que incluyen las patentes, aunque no se limitan a ellas, 5.532.129, 5.605.662, 5.565.322 y 5.632.957 y patentes y referencias asociadas), Southern (EP0373023B1) y Synteni/Incyte (WO 95/35505 y patentes y referencias asociadas).

De manera similar, también se conoce la detección electrónica de ácidos nucleicos utilizando electrodos; véase por ejemplo las patentes americanas n° 5.591.578; 5.824.473; 5.705.348; 5.780.234 y 5.770.369; n°s de solicitud US 08/873.598 08/911.589; y WO98/20162; PCT/US98/12430; PCT/US98/12082; PCT/US99/10104; PCT/US99/01705, y PCT/US99/01703 y referencias asociadas.

Sin embargo, hasta la fecha no se han utilizado ningunos de estos procedimientos en sistemas altamente paralelos para permitir la multiplexación de biochips. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es presentar dispositivos y procedimientos para el análisis múltiple de biochips, en particular biochips de ácidos nucleicos.

Descripción detallada de los dibujos

La figura 1 muestra el cartucho con la junta de caucho en el puerto de entrada.

La figura 2 representa una serie de distintas geometrías de la cámara de reacción.

Las figuras 3-15 representan realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada

La presente invención va dirigida a dispositivos de acuerdo con las reivindicaciones. Puede analizarse simultáneamente un número de muestras (particularmente muestras de pacientes), o pueden realizarse múltiples análisis en una sola muestra. El dispositivo puede comprender un número de estaciones de cartuchos que estén configuradas para recibir los biochips, con diversos tipos de biochips permitiendo diversos tipos de componentes. Las estaciones pueden incluir una amplia variedad de diversos componentes, incluyendo controladores térmicos, sistemas de aviso, sensores para la detección de fugas, pantallas alfanuméricas, y detectores. Realizaciones preferidas incluyen el uso de biochips que comprenden electrodos que se basan en la detección electroquímica, y así los dispositivos y/o las estaciones pueden comprender placas y procesadores del dispositivo.

Los cartuchos de biochip incluyen sustratos que comprenden matrices de biomoléculas, y pueden configurarse de una variedad de maneras. Por ejemplo, los chips pueden incluir cámaras de reacción con puertos de entrada y salida para la introducción y extracción de reactivos. Además, los cartuchos pueden incluir válvulas o tapas que incorporen componentes microfluídicos, de manera que pueda introducirse la muestra, añadirse reactivos, producirse reacciones, y añadirse después la muestra a la cámara de reacción que comprende la matriz para la detección.

Los procedimientos van dirigidos a la detección de analitos objetivo. Por “analito objetivo” o “analito” o equivalentes gramaticales se entiende aquí cualquier molécula o compuesto a detectar y que puede enlazarse a una especie de enlace, que se define a continuación. Analitos apropiados incluyen, aunque no se limitan a estos, moléculas químicas pequeñas tales como sustancias químicas ambientales o clínicas o agentes contaminantes o biomoléculas, que incluyen, aunque no se limitan a estos, pesticidas, insecticidas, toxinas, fármacos terapéuticos y de consumo, hormonas, antibióticos, anticuerpos, materias orgánicas, etc. Biomoléculas apropiadas incluyen, pero no se limitan éstas, proteínas (incluyendo enzimas, inmunoglobulinas y glicoproteínas), ácidos nucleicos, lípidos, lectinas, carbohidratos, hormonas, células enteras (células procariotas (tal como bacterias patógenas) y células eucariotas que incluyen células tumorales de mamíferos), virus, esporas, etc. Analitos particularmente preferidos son proteínas incluyendo enzimas; fármacos, células; anticuerpos; antígenos; antígenos de membrana celular y receptores (receptores neurales, hormonales, nutrientes, y de células superficiales) o sus ligandos.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden detectarse un gran número de analitos utilizando los presentes procedimientos; básicamente cualquier analito objetivo para el cual pueda prepararse un ligando de enlace, el cual se describe a continuación, puede detectarse utilizando los procedimientos de la invención.

Si se requiere, el analito objetivo se prepara utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, la muestra puede tratarse para lisar las células, utilizando buffers de lisis conocidos, electroporación, etc., con purificación y/o amplificación según se necesite, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Si el analito objetivo es un ácido nucleico, la secuencia objetivo se puede amplificar según sea necesario; técnicas apropiadas de amplificación se describen en PCT US99/01705, que se incorpora aquí expresamente por referencia. Además, también pueden utilizarse técnicas para aumentar la cantidad o el índice de hibridación; véase por ejemplo WO 99/67425 y WO 01/35100.

Las muestras que comprenden los analitos objetivo se pueden añadir a los cartuchos que comprenden los biochips tal como se expone con mayor detalle a continuación. “Cartucho” significa aquí una cubierta o carcasa para el biochip. Tal como se expone aquí, y tal como apreciarán los expertos en la materia, el cartucho puede adoptar una serie de configuraciones y pueden estar fabricados en una variedad de materiales. Materiales apropiados incluyen, pero sin limitarse a éstos estos, fibra de vidrio, teflón, cerámica, cristal, silicio, mica, plástico (incluyendo acrílico, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, policarbonato, poliuretanos, Teflón®, y sus derivados, etc.), etc. Los materiales particularmente preferidos del cartucho son el plástico (incluyendo policarbonato y polipropileno) y cristal.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, el cartucho puede comprender un número de componentes, incluyendo cámaras de reacción, puertos de entrada y salida, elementos calefactores incluyendo componentes termoelectrónicos, antenas de RF, componentes electromagnéticos, chips de memoria, componentes de estanqueidad tales como juntas, componentes electrónicos incluyendo elementos de interconexión, multiplexores, procesadores, etc.

El cartucho comprende una cámara de reacción. Generalmente, la cámara de reacción incluye un espacio o un volumen que permite el contacto de la muestra con la matriz de biochips. El volumen de la cámara de reacción puede variar dependiendo del tamaño de la matriz y del ensayo que se realice. En general, la cámara de reacción varía de 1 nL a aproximadamente 1 mL, prefiriéndose de aproximadamente 1 mL a aproximadamente 250 μ L y prefiriéndose especialmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 μ L. En algunas realizaciones, para evitar la introducción de burbujas de aire en la cámara de reacción (lo cual puede ser perjudicial para la detección), la cámara de reacción es menor que el tamaño de la muestra a introducir, para permitir un ligero derrame y garantizar de este modo que la cámara de reacción contenga poco o nada de aire.

La cámara de reacción del cartucho comprende un puerto de entrada para la introducción de la muestra que se va a analizar. El puerto de entrada puede comprender opcionalmente un cierre de estanqueidad para evitar o reducir la evaporación de la muestra o reactivos de la cámara de reacción. En una realización preferida (tal como se ilustra en la figura 1), el cierre de estanqueidad comprende una junta, a través de la cual puede insertarse una pipeta o una jeringuilla. La junta puede ser de goma o silicona u otros materiales apropiados.

La cámara de reacción puede configurarse de una variedad de maneras. En una realización preferida, la cámara de reacción está configurada para minimizar la introducción o la retención de burbujas de aire o de otras impurezas de la muestra. De este modo por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 1, suponiendo que el cartucho queda sostenido en un ángulo vertical, el puerto de entrada permite que el flujo de la muestra fluida pase al “fondo” de la cámara de reacción, para permitir la salida de aire o fluido a través de la “parte superior” de la cámara de reacción, por ejemplo a través de un puerto de salida. De este modo, la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción y entra en contacto con la matriz. Así, en una realización preferida, la cámara de reacción comprende además un puerto de salida para permitir que el aire o el exceso de muestra salga de la cámara de reacción. En algunas realizaciones, el puerto de salida conduce a un almacén de residuos, tal como se describe adicionalmente en adelante, a una superficie exterior del chip o del cartucho, o bien, en una realización preferida, de nuevo al puerto de entrada. Así por ejemplo, una realización preferida utiliza un sistema en el que el puerto de salida conduce al puerto de entrada, preferiblemente por encima del punto de carga. Por ejemplo, si se utiliza una pipeta para introducir el cartucho, la punta de la pipeta se extiende por debajo del puerto de salida, de manera que el aire del puerto de salida no se introduce en la cámara de reacción. Además, los materiales de la carcasa del cartucho y el biochip pueden seleccionarse para que sean similares en hidrofobicidad o hidrofiliidad, con el fin de evitar la creación de las burbujas de aire.

Además, en una realización preferida, la cámara de reacción/puertos de entrada y/o salida incluyen opcionalmente el uso de válvulas. Por ejemplo, puede utilizarse una membrana o un filtro semipermeable, que preferiblemente permita la salida de gas pero retenga el líquido de la muestra en la cámara. Por ejemplo, teflones porosos tales como Gortex® permiten que penetre aire pero no fluidos.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, existe una variedad de geometrías de la cámara de reacción que pueden utilizarse de esta manera. Generalmente se prefiere tener la intersección del puerto de entrada y la cámara de reacción en el “fondo” del cartucho, con una abertura pequeña, con la cámara de reacción ensanchada. Además, la “parte superior” de la cámara de reacción puede estrecharse también. En la figura 2 se representan varias realizaciones. Así, las realizaciones preferidas para el tamaño y la forma de la cámara de reacción permiten una carga suave de la cámara de reacción. Las realizaciones preferidas utilizan unas geometrías de la cámara de reacción que evitan el uso de cantos vivos u otros componentes que sirvan como puntos para la formación de burbujas.

Además, en algunas realizaciones, la cámara de reacción puede configurarse para permitir el mezclado de la muestra. Por ejemplo, cuando una muestra y un reactivo se introducen simultáneamente o por separado en la cámara, el puerto de entrada y/o la cámara de reacción pueden comprender vertederos, canales u otros componentes para maximizar el mezclado de la muestra y del reactivo. Además, tal como se expone más adelante, la reacción puede utilizar perlas magnéticas para el mezclado y/o separación.

En una realización preferida, el cartucho comprende un mecanismo de cierre de estanqueidad para evitar la salida de la muestra o reactivos sobre otras partes del sustrato, particularmente (en el caso de detección electrónica) sobre interconexiones electrónicas. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, éste puede adoptar una variedad de formas distintas. En una realización, entre el sustrato del biochip existe una junta que comprende la matriz y el cartucho, que incluye láminas, tubos o tiras. Alternativamente, puede utilizarse una tira o tubo de caucho o silicona; por ejemplo, la carcasa puede comprender una hendidura o un canal en el cual encaje la junta, y entonces la carcasa, la junta y el chip se sujeten entre sí. Además, pueden utilizarse adhesivos para unir la junta al cartucho, por ejemplo puede utilizarse un adhesivo de doble cara; pueden emplearse por ejemplo adhesivos de silicona, acrílicos y combinaciones para unir la junta al biochip, los cuales se unen después al cartucho tal como se describe aquí.

En algunas realizaciones, la cámara de reacción y el sustrato del biochip se configuran de manera que no se requiere un mecanismo separado de cierre de estanqueidad. Por ejemplo, el sustrato del biochip puede servir como una “mitad” de la cámara de reacción, con la matriz en el interior, y la carcasa de la cámara de reacción puede servir como la otra “mitad”. En función de los materiales utilizados, puede haber un adhesivo opcional para unir los dos. Alternativamente, cuando hay matrices en ambos lados del sustrato, la cubierta puede encerrar el sustrato.

Así, en estas realizaciones, el volumen de la cámara de reacción puede establecerse formando una cavidad en el cartucho, de modo que la adición del sustrato del biochip forme un cámara de reacción alrededor de la matriz, o bien empleando un cartucho plano y utilizando una junta de una profundidad definida, o bien por combinaciones de los dos.

En una realización preferida, el cartucho comprende un tapón o una tapa. El tapón puede ser funcional, tal como se describe en adelante si comprende componentes microfluídicos. Además, el casquillo puede diseñarse para aplicaciones de seguridad, para evitar la fuga de materiales biológicos o contaminación cruzada. Tal como apreciarán los expertos en la materia, el tapón puede adquirir una amplia variedad de configuraciones. Por ejemplo, en una realización, el tapón simplemente cierra el puerto de entrada para evitar la evaporación de la muestra durante el análisis. En una realización preferida, el tapón puede comprender una serie de elementos adicionales para el uso en la manipulación de la muestra y el almacenamiento del reactivo, para permitir una variedad de reacciones distintas de la muestra. Por ejemplo, puede incorporarse una variedad de componentes microfluídicos en el casquillo para efectuar un número de manipulaciones en una muestra para dar lugar en última instancia a la detección o la cuantificación del analito objetivo. Véase en general la PCT US00/10903, y referencias expuestas en la misma. Estas manipulaciones pueden incluir la manipulación de células (concentración celular, lisis celular, extracción celular, separación celular, etc.), separación del analito objetivo deseado de otros componentes de la muestra, reacciones químicas o enzimáticas en el analito objetivo, detección del analito objetivo, etc. Los dispositivos de la invención pueden incluir una o más cavidades para la manipulación de la muestra, residuos o reactivos; microcanales (denominados a veces canales de flujo) y esas cavidades y entre las mismas, incluyendo microcanales que contienen matrices de separación electroforética; válvulas para controlar el movimiento del fluido; bombas integradas en un chip, tales como bombas electroosmóticas, electrodinámicas, o electrocinéticas. Además, tal como se expone aquí, partes de las superficies interiores del dispositivo pueden cubrirse con una variedad de capas según sea necesario, para reducir el enlace no específico, con el fin de permitir la unión de ligandos de enlace, para biocompatibilidad, para resistencia del flujo, etc. Estos tapones microfluídicos pueden realizarse en una variedad de maneras, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Véase por ejemplo las referencias descritas en PCTUS00/10903, y las referencias que se indican.

Si se utiliza el tapón del cartucho como parte del análisis, éste puede configurarse para que incluya una o más de una variedad de componentes, denominados aquí como “módulos”, que estarán presentes en cualquier dispositivo dado en función de su uso, y están conectados según sea necesario a través de microcanales. Estos módulos incluyen, pero sin limitarse a ellos: puertos de entrada de la muestra; módulos de introducción o de recogida de la muestra; módulos de manipulación de células (por ejemplo, para lisis celular, extracción de células, concentración celular, separación o captura de células, crecimiento celular, etc.); módulos de separación, por ejemplo, para forelectroforesis,

dielectroforesis, filtración de gel, cromatografía de intercambio de iones/afinidad (captura y liberación) etc.; módulos de reacción para alteración química o biológica de la muestra, incluyendo la amplificación del analito objetivo (por ejemplo, cuando el analito objetivo es ácido nucleico, son útiles las técnicas de amplificación, incluyendo, pero no limitándose a éstas: reacción en cadena de polimerasa (PCR), análisis de enlace de oligonucleótidos (OLA); amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y otras técnicas descritas en WO 99/37819 y PCT US00/19889), escisión o alteración química, física o enzimática del analito objetivo, o modificación química del objetivo; bombas de fluido (que incluyen, pero sin limitarse a éstas, bombas electroosmóticas, electrohidrodinámicas, o electrocinéticas; válvulas de fluido; módulos térmicos para calentar y enfriar; módulos de almacenamiento para reactivo de análisis; cámaras de mezclado; y módulos de detección.

Además, si bien estos componentes microfluídicos se describen aquí como asociados al tapón del cartucho, tal como apreciarán los expertos en la materia, estos módulos y los canales (así como otros componentes que aquí se describen) pueden ubicarse en cualquier lugar del cartucho o el dispositivo. Además, algunos componentes pueden estar en el dispositivo; por ejemplo, pueden disponerse bombas “*off-chip*” dentro de una o más estaciones del dispositivo.

El cartucho comprende por lo menos un biochip, utilizando algunas realizaciones uno o más biochips por cartucho. “Biochip” o equivalentes significa aquí un sustrato que comprende una matriz de biomoléculas distintas, particularmente ácidos nucleicos y proteínas. Existe una amplia variedad de biochips de ácido nucleico apropiados, incluyendo los fabricados con técnicas fotolitográficas (tales como el GeneChip® Affymetrix), técnicas de marcado (por ejemplo Synteni e Incyte), técnicas de impresión (Agilent y Rosetta), matrices de “almohadillas de gel” tridimensionales, y aquellas que incluyen componentes electrónicos (por ejemplo, Nanogen). Más adelante se describe una realización y en la patentes americanas n° 5.591.578; 5.824.473; 5.705.348; 5.780.234 y 5.770.369; WO98/20162; WO98/12430; WO98/57158; WO 00/16089; WO99/57317; WO99/67425; WO00/24941; PCTUS00/10903; WO00/38836; WO99/37819; WO99/57319 y PCTUS00/20476; y referencias relacionadas.

Debe indicarse que una ventaja distinta del uso de los procedimientos de detección electrónicos que aquí se describen es que puede producirse un control en tiempo real de reacciones e hibridación. Es decir, mientras que los sistemas basados en fluorescencia requieren la extracción del exceso (por ejemplo, no enlazado) de sondas de señalización (o secuencias objetivo cuando la propia secuencia objetivo ha sido marcada fluorescentemente durante una reacción de amplificación, por ejemplo), los procedimientos electrónicos que aquí se describen no lo requieren. Es decir, a menos que las sondas que comprenden ETMs se unan a la superficie, se aprecia poca o nula señal incluso si no se han eliminado las sondas no enlazadas. Esto permite el control de reacciones en tiempo real, así como múltiples mediciones en la misma matriz. Por consiguiente, aunque la descripción que sigue a continuación va dirigida principalmente al uso de biochips que comprenden una matriz de electrodos, otras tecnologías de matriz quedan incluidas en la presente invención.

En una realización preferida, los biochips comprenden sustratos con una pluralidad de posiciones de la matriz. “Sustrato” o “soporte sólido” u otros equivalentes gramaticales significan aquí cualquier material que pueda ser modificado para contener sitios individuales discretos apropiados de la unión o asociación de ligandos de captura. Sustratos apropiados incluyen superficies metálicas tales como oro, electrodos tal como se define más adelante, cristal y cristal modificado o funcionalizado, fibra de vidrio, teflón, cerámica, mica, plástico (incluyendo acrílico, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliimida, policarbonato, poliuretanos, Teflón®, y sus derivados, etc.), GETEK (una mezcla de óxido de polipropileno y fibra de vidrio), etc., polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, cristales inorgánicos y una variedad de otros polímeros, prefiriéndose particularmente los materiales de placas de circuito impreso (PCB).

El presente sistema tiene particular utilidad en formatos de matriz, es decir, donde existe una matriz de electrodos de detección direccionables (denominados aquí en general “almohadillas”, “direcciones” o “micro-posiciones”). Por “matriz” se entiende aquí una pluralidad de ligandos de captura en formato de matriz; el tamaño de la matriz dependerá de la composición y el uso final de la matriz. Pueden prepararse matrices que contengan de aproximadamente 2 ligandos de captura a muchos millares diferentes. En general, la matriz comprenderá de dos a tanto como 100.000 o más, dependiendo del tamaño de los electrodos, así como el uso final de la matriz. Las gamas preferidas son de aproximadamente 2 a aproximadamente 10.000, prefiriéndose de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden no ser en formato de matriz; es decir, para algunas realizaciones, pueden prepararse también composiciones que comprendan un único ligando de captura. Además, en algunas matrices, pueden utilizarse sustratos múltiples, de composiciones distintas o bien idénticas. Así por ejemplo, las matrices grandes pueden comprender una pluralidad de sustratos más pequeños.

El biochip comprende un sustrato con por lo menos una superficie que comprende una matriz, y en una realización preferida, una matriz de electrodos. “Electrodo” significa aquí una composición que, cuando se conecta a un dispositivo electrónico, puede detectar una corriente o carga y convertirla en una señal. Un electrodo se puede definir alternativamente como una composición a la cual puede aplicarse un potencial y/o pasar electrones hacia o desde especies en solución. De este modo, un electrodo es un ETM tal como aquí se describe. En la técnica se conocen electrodos preferidos e incluyen, pero sin limitarse a éstos, ciertos metales y sus óxidos, incluyendo oro; platino; paladio; silicio; aluminio; electrodos de metal óxido incluyendo óxido de platino, óxido de titanio, óxido de estaño, óxido de indio y estaño, óxido de paladio, óxido de silicio, óxido de aluminio, óxido de molibdeno (Mo2O6), óxido de tungsteno

(WO3) y óxidos de rutenio; y carbono (incluyendo electrodos de carbono cristalino, grafito y pasta de carbono). Los electrodos preferidos incluyen electrodos de oro, silicio, carbono y metal óxido, prefiriéndose particularmente el oro.

Los electrodos descritos aquí se representan como una superficie plana, que es solamente una de las posibles configuraciones del electrodo y se da solamente por motivos esquemáticos. La configuración del electrodo variará con el procedimiento de detección utilizado y la configuración del cartucho. Por ejemplo, pueden preferirse electrodos planos para procedimientos de detección óptica, o cuando se preparan matrices de ácidos nucleicos, requiriendo así posiciones direccionables tanto para la síntesis como para la detección. Alternativamente, para el análisis de densidad simple o baja, el electrodo puede tener forma de tubo; esto permite un máximo de área superficial que contiene los ácidos nucleicos a quedar expuestos a un volumen pequeño de la muestra.

En una realización preferida, los electrodos de detección están formados en un sustrato. Además, la exposición que sigue aquí va dirigida en general a la formación de electrodos de oro pero también pueden utilizarse otros electrodos, tal como apreciarán los expertos en la técnica. El sustrato puede comprender una amplia variedad de materiales, tal como se ha indicado anteriormente.

En general, los materiales preferidos incluyen materiales de placa de circuito impreso. Los materiales de placa de circuito impreso son aquellos que comprenden un sustrato aislante que se encuentra cubierto con una capa conductora y se procesa utilizando técnicas de litografía, en particular técnicas de fotolitografía, para formar patrones de electrodos e interconexiones (denominado a veces en la técnica como interconexiones o conductores). El sustrato aislante es generalmente, pero no siempre, un polímero. Tal como es conocido en la técnica, puede utilizarse una capa o una pluralidad de capas, para realizar placas "bidimensionales" (por ejemplo, todos los electrodos e interconexiones en un plano) o "tridimensionales" (en las que los electrodos se encuentran en una superficie y las interconexiones pueden atravesar la placa hacia el otro lado o en las que los electrodos se encuentran en una pluralidad de superficies). Los sistemas tridimensionales se basan con frecuencia en el uso de perforado o ataque químico, seguido de electrodeposición con un metal tal como el cobre, de modo que se realizan las interconexiones de "placa directa". Los materiales de la placa de circuito van provistos a menudo de una lámina ya unida al sustrato, tal como una lámina de cobre, con cobre adicional añadido según sea necesario (por ejemplo para las interconexiones), por ejemplo mediante electrodeposición. Puede ser necesario entonces poner áspera la superficie de cobre, por ejemplo a través de ataque químico, para permitir la unión de la capa de adhesión.

Por consiguiente, en una realización preferida, la presente invención dispone biochips (denominados a veces aquí como "chips") que comprenden sustratos que incluyen una pluralidad de electrodos, preferiblemente electrodos de oro. El número de electrodos es, tal como se ha descrito, para matrices. Cada electrodo comprende preferiblemente una monocapa autoensamblada tal como aquí se describe. En una realización preferida, una de las especies que forman monocapas comprende un ligando de captura tal como aquí se describe. Además, cada electrodo tiene una interconexión, que se une al electrodo en un extremo y queda unido en última instancia a un dispositivo que pueda controlar el electrodo. Es decir, cada electrodo es independientemente direccionable.

Los electrodos de detección en el material de la placa de circuito (u otros sustratos) se preparan generalmente en una amplia variedad de maneras. En general se utiliza oro de alta pureza, y puede depositarse sobre una superficie mediante procesos de deposición en vacío (pulverización y evaporación) o deposición de solución (procesos de electrodeposición o sin corriente). Cuando se ha realizado la electrodeposición, el sustrato debe comprender inicialmente un material conductor; las placas de circuito de fibra de vidrio van provistas a menudo de una lámina de cobre. Con frecuencia, dependiendo del sustrato, se utiliza una capa de adhesión entre el sustrato y el oro para garantizar una buena estabilidad mecánica. Así, realizaciones preferidas utilizan una capa de deposición de un metal de adhesión tal como cromo, titanio, titanio/tungsteno, tantalio, níquel o paladio, que pueden depositarse tal como se ha indicado para el oro. Cuando se utiliza metal de electrodeposición (el metal de adhesión o bien el metal del electrodo), pueden añadirse opcionalmente aditivos de refinado del grano, denominados con frecuencia en el mercado como abrillantadores, para alterar las características de deposición superficial. Los abrillantadores preferidos son mezclas de especies orgánicas e inorgánicas, prefiriéndose cobalto y níquel.

En general, la capa de adhesión es de aproximadamente 100 Å a aproximadamente 25 micras de espesor (1000 micropulgadas). Si el metal de adhesión es electroquímicamente activo, el metal del electrodo debe recubrirse en un grosor que evite la "penetración"; si el metal de adhesión no es electroquímicamente activo, el metal del electrodo puede ser más fino. En general, el metal del electrodo (preferiblemente oro) se deposita en un espesor que oscila de aproximadamente 500 Å a aproximadamente 5 micras (200 micropulgadas), prefiriéndose aproximadamente de 30 micropulgadas a aproximadamente 50 micropulgadas. En general se deposita oro para preparar electrodos que tienen un tamaño que oscila entre aproximadamente 5 micras a aproximadamente 5 milímetros de diámetro, prefiriéndose de aproximadamente 100 a 250 micras. Los electrodos de detección así formados se limpian después preferiblemente y se añade SAMs, tal como se describe a continuación.

Los procedimientos para preparar un sustrato que incorpora una pluralidad de electrodos de oro comprenden primero el recubrimiento de un metal de adhesión, tal como níquel o paladio (opcionalmente con un abrillantador), sobre el sustrato. Se prefiere la electrodeposición. El metal del electrodo, preferiblemente oro, se recubre entonces (de nuevo, se prefiere la electrodeposición) sobre el metal de adhesión. Entonces los patrones del dispositivo, que comprenden los electrodos y sus interconexiones asociadas se preparan utilizando técnicas litográficas, en particular

técnicas de fotolitografía tal como es conocido en la técnica, y ataque químico húmedo. Con frecuencia se dispone un material aislante químicamente resistente y no conductor tal como una máscara de soldadura o plástico utilizando estas técnicas fotolitográficas, dejando expuestos solamente los electrodos y un punto de conexión a los conductores; los propios conductores generalmente van recubiertos.

5

En una realización de la estructura inventiva, la máscara de soldadura se fabrica convenientemente a partir de un material soluble disolvente en lugar de un material soluble en agua. Las máscaras de soldadura solubles en agua se han convertido en general en un estándar en la industria debido a las ventajas medioambientales de materiales solubles en agua. Desafortunadamente, para un chip detector que tenga que quedar expuesto a soluciones acuosas, los materiales

10

solubles en agua tales como por ejemplo acetonitrilo pueden disolverse cuando se exponen a una solución acuosa.

Los procedimientos prosiguen con la adición de SAMs, que se describe más adelante. En una realización preferida, se utilizan técnicas de deposición por goteo para añadir el producto químico requerida, es decir la especie que forma monocapas, una de las cuales es preferiblemente un ligando de captura que comprende especies. Las técnicas de deposición de gotas son bien conocidas para preparar matrices “de puntos”. Esto se hace para añadir una composición diferente a cada electrodo, es decir para preparar una matriz que comprende diversos ligandos de captura. Alternativamente, la especie SAM puede ser idéntica para cada electrodo, y esto puede conseguirse utilizando una técnica de deposición de gotas o la inmersión de todo el sustrato o una superficie del sustrato en la solución.

15

Como que los biochips comprenden electrodos, existe una variedad de componentes adicionales, además de la química que aquí se describe, que pueden estar presentes en el chip, incluyendo, pero no limitándose a ellos, interconexiones, multiplexores, dispositivos de reté, filtros, antenas de RF, elementos calefactores, componentes electromagnéticos, etc.

20

Cada electrodo comprende un conductor independiente (interconector) para transmitir señales de entrada y de respuesta electrónica para cada electrodo de la matriz. A diferencia de los sistemas anteriores que requieren la capacidad para alterar de manera independiente solamente señales de entrada a cada electrodo pero no señales de respuesta electrónicas, es importante en la presente invención que tanto las señales de entrada como de respuesta electrónica puedan controlarse de manera independiente para cada electrodo.

25

Para un número relativamente pequeño de almohadillas de electrodos y/o dependiendo del tamaño deseado de la matriz, puede ser apropiado disponer conexiones directas utilizando los circuitos paralelos.

30

En una realización preferida, cada electrodo está conectado individualmente a una entrada correspondiente de un multiplexor a través de un interconector correspondiente. Un problema que se daba en sistemas y procedimientos convencionales es la dificultad para disponer conexiones eléctricas (entradas y/o salidas) en una gran cantidad de electrodos, en particular si los electrodos forman una matriz densa o compacta. Se han identificado varias soluciones a este problema, e incluyen el uso de una circuitería que permite el procesamiento de señales simultáneamente como conjuntos de circuitos y conexiones paralelos, el direccionamiento de matrices de muestras de líneas, en serie de manera multiplexada en un dominio tiempo, o en paralelo o en serie utilizando técnicas de separación basadas en un dominio frecuencia y/o un dominio tiempo, entre otras técnicas disponibles, tal como se expone aquí.

35

40

Por ejemplo, un procedimiento preferido para conectar una primera multiplicidad de circuitos o líneas en el chip a una pluralidad más pequeña de líneas en un conector que va desde el chip es utilizar un dispositivo de conmutación tal como un multiplexor (MUX) o relés para conectar selectivamente circuitos en el chip o placa con circuitos fuera de la placa.

45

El número de multiplexores dependerá del número de electrodos en la matriz. En una realización, se utiliza un solo MUX. En una realización preferida, se utiliza una pluralidad de MUXs. Esto puede realizarse de una variedad de maneras, tal como apreciarán los expertos en la técnica; en una realización, se asignan “sectores” de electrodos a un MUX particular; así por ejemplo, las filas o columnas de la matriz pueden tener cada una su propio MUX. Alternativamente, se utilizan submultiplexores; por ejemplo, una columna o una fila se conecta a un respectivo multiplexor secundario, yendo las salidas del multiplexor secundario a otro submultiplexor.

50

En una realización preferida, el multiplexor incluye un contador binario que recibe la señal de control a través de la almohadilla del conector. La señal de control es preferiblemente una señal pulsada tal como una señal de reloj y genera un recuento secuencial para excitar los decodificadores.

55

En una realización preferida, otra manera de conectar una multiplicidad de electrodos en el sustrato a un número más pequeño de almohadillas de conectores que conducen “*off chip*” es utilizar señales seleccionadas fila-columna para permitir la selección de electrodos individuales.

60

Desafortunadamente, para estructuras y procedimientos que tienen acceso a distintos electrodos o grupos de electrodos de manera secuencial con el tiempo, puede ser necesaria una cierta corrección o ajuste de los resultados detectados cuando la diferencia en tiempo es suficientemente grande para alterar los resultados, con el fin de mantener una calibración entre datos detectados anteriormente y de lectura de salida y datos detectados más posteriormente y de lectura de salida. La necesidad de dicho ajuste dependerá del análisis, la cinética de la reacción y la separación en el tiempo que pueden también estar en función del número de electrodos a detectar o de lectura de salida. Por ejemplo, en

65

algunas realizaciones puede ser totalmente razonable medir cada uno de los 25 electrodos en una matriz de 5 x 5 electrodos algunos segundos por separado (por ejemplo, 10 segundos por separado); sin embargo, en otras realizaciones, la separación de 4 minutos entre la primera y la última medición puede ser inaceptable o difícil de compensar.

5 También es deseable considerar la cinética de la reacción cuando la reacción tiene lugar en una superficie plana o casi plana, tal como la superficie del electrodo. Las velocidades de difusión pueden desempeñar un papel más importante que cuando la reacción se produce en solución. Es importante comprender cuándo o en qué período de tiempo tiene lugar la reacción para tomar las medidas en el momento apropiado. Esto puede ser particularmente importante si se va detectar un producto intermedio de reacción, o si son deseables una serie de medidas, por ejemplo
10 para realizar la cinética de la reacción.

La cinética de la reacción es también una consideración importante para las señales de excitación. Los biosensores están limitados por la cinética química. Para la clase de moléculas de interés aquí (ADN, fragmentos de ADN, proteínas, anticuerpos, y similares), cada molécula tiene una velocidad máxima en el medio. Por ejemplo, las moléculas
15 pueden típicamente excitarse activamente o moverse en la solución a frecuencias entre aproximadamente 1 Hz y 10 kHz, más típicamente entre aproximadamente 5 Hz y 5 kHz. A frecuencias más altas, las moléculas solamente vibran, mientras que a frecuencias más bajas el movimiento no es particularmente útil.

Además, existe un volumen de análisis, que es el volumen de análisis accesible, asociado a cada frecuencia de la
20 señal de excitación. A medida que la frecuencia aumenta, el volumen de análisis se reduce en tamaño y volumen. Esto tiene una implicación para la distribución de los electrodos y de la frecuencia de la señal de excitación.

Una consideración adicional para detectar o medir una reacción es el posible efecto que el medio de reacción (tal como componentes de la solución, componentes de la muestra, componentes de la reacción, etc.) pueda tener en
25 los electrodos. Algunas veces, los electrodos se degradarán, se volverán pasivados, o por lo demás variarán con el tiempo afectando así a la exactitud y la uniformidad de las mediciones. Bajo tales condiciones es deseable realizar rápidamente la detección, medición, o análisis, o por lo menos de acuerdo con una temporización predeterminada de modo que los datos captados sean interpretados correctamente.

30 En una realización preferida, se utiliza uno o más preamplificadores. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, el preamplificador puede encontrarse en la superficie del sustrato, por ejemplo “en placa” o “en chip”, o puede disponerse en la circuitería externa al chip de la matriz. Es preferible, sin embargo, que el preamplificador vaya incluido en el sustrato para aumentar la relación señal ruido de la señal proporcionada a la circuitería externa.

35 En una realización preferida, cada electrodo individual tiene un preamplificador asociado.

En una realización preferida, la matriz se divide en “sectores”, en los que un subconjunto de electrodos en la matriz tiene un MUX y un preamplificador asociados. De manera similar, otros componentes de la invención pueden estar
40 asociados a los sectores.

En una realización preferida, se hace corresponder la impedancia.

En una realización preferida, se utilizan filtros, incluyendo, aunque no se limitan a éstos, filtros de dominio tiempo y filtros de dominio frecuencia, y combinaciones.
45

Además de componentes electrónicos, los electrodos de la invención en realizaciones preferidas comprenden monocapas autoensambladas (SAMs). Las composiciones de estas SAMs variarán con el procedimiento de detección utilizado. Existen en general dos mecanismos básicos de detección. En una realización preferida, la detección de ETM se basa en transferencia de electrones a través de π orbitales apilados de ácidos nucleicos de doble filamento. Este
50 mecanismo básico se describe en las patentes americanas 5.591.578, 5.770.369, 5.705.348, y PCT US97/20014 y su denominado “mecanismo-1”. Brevemente, trabajos anteriores han demostrado que la transferencia de electrones puede proceder de manera rápida a través de n orbitales apilados de ácidos nucleicos de doble filamento, y significativamente de una manera más lenta a través de ácido nucleico de único filamento. Por consiguiente, esto puede servir como base de análisis. De este modo, añadiendo ETMs (covalentemente a uno de los filamentos o bien no covalentemente al
55 compuesto de hibridación mediante el uso de indicadores del hibridación, que se describe más adelante) a un ácido nucleico que está unido a un electrodo de detección a través de un oligómero conductor, puede detectarse la transferencia de electrones entre ETM y el electrodo, a través del ácido nucleico y el oligómero conductor.

Alternativamente, el ETM puede detectarse, no necesariamente a través de la transferencia de electrones a través
60 del ácido nucleico, sino que más bien puede detectarse directamente en un electrodo que comprende SAM; es decir, no es necesario que los electrones de ETMs vayan a través de los n orbitales apilados para generar una señal. Tal como se ha indicado anteriormente, en esta realización, el electrodo de detección comprende preferiblemente una monocapa autoensamblada (SAM) que sirve para proteger el electrodo de especies redox-activas en la muestra. En esta realización, la presencia de ETMs en la superficie de un SAM, que se ha formulado para que comprenda ligeros “defectos”
65 (a veces denominados aquí “microconductos”, “nanoconductos” o “electroconductos”) puede detectarse directamente. Esta idea básica se denomina aquí “mecanismo-2”. Esencialmente, los electroconductos permiten un acceso particular de ETMs a la superficie. Sin limitarse a la teoría, debe observarse que la configuración del electroconducto depende en parte del ETM elegido. Por ejemplo, el uso de ETMs relativamente hidrofóbicos permite el uso de especies que forman

electroconductos hidrofóbicos, lo cual excluye efectivamente ETMs hidrofílicos o cargados. De manera similar, el uso de especies más hidrofílicas o cargadas en el SAM puede servir para excluir ETMs hidrofóbicos.

Debe indicarse que estos defectos deben distinguirse de los “huecos” que permiten un contacto directo de los componentes de la muestra con el electrodo de detección. Tal como se expone con mayor detalle más adelante, los electroconductos pueden generarse de distintas maneras generales, que incluyen, pero sin limitarse a éstas, el uso de superficies de electrodo rugosas, tales como electrodos de oro formulados en placas de circuito de PC; o la inclusión de por lo menos dos especies diferentes en la monocapa, es decir utilizando una “monocapa mezclada”, por lo menos una de la cual es una especie que forma electroconductos (EFS). Así, tras el enlace de un analito objetivo, un ligando de enlace soluble que comprende ETM se lleva a la superficie, y puede proceder la detección del ETM, supuestamente a través de los “electroconductos” al electrodo. Esencialmente, el papel del SAM que comprende los defectos es permitir el contacto de ETM con la superficie electrónica del electrodo, a la vez que ofrece las ventajas de proteger al electrodo de los componentes de la solución y reducir la cantidad de enlace no específico a los electrodos. Visto de una manera distinta, el papel del ligando de enlace es proporcionar especificidad para una regeneración de ETMs a la superficie, donde pueden detectarse directamente.

Así, en cualquier realización, tal como se describe con mayor detalle más adelante, se forma un compuesto de análisis que contiene un ETM, que se detecta entonces utilizando el electrodo de detección.

De este modo, en una realización preferida, el electrodo incluye una monocapa, que comprende especies que forman electroconductos (EFS). Tal como aquí se describe, la eficacia del enlace del analito objetivo (por ejemplo, hibridación de oligonucleótidos) puede aumentar cuando el analito se encuentra a una distancia del electrodo. De manera similar, el enlace no específico de biomoléculas, incluyendo analitos objetivo, a un electrodo se reduce en general cuando está presente una monocapa. De este modo, una monocapa facilita mantener el analito lejos de la superficie del electrodo. Además, una monocapa sirve para mantener especies cargadas lejos de la superficie del electrodo. De este modo, esta capa ayuda a evitar el contacto eléctrico entre los electrodos y ETMs, o entre el electrodo y la especie cargada en el disolvente. Dicho contacto puede dar lugar a un “cortocircuito” o un cortocircuito indirecto a través de la especie cargada que puede encontrarse presente en la muestra. Por consiguiente, la monocapa preferiblemente se empaqueta fuertemente en una capa uniforme en la superficie del electrodo, de manera que exista un mínimo de “huecos”. La monocapa sirve así como barrera física para bloquear la accesibilidad de disolvente al electrodo.

“Monocapa” o “monocapa autoensamblada” o “SAM” significa aquí un conjunto relativamente ordenado de moléculas quimisorbidas espontáneamente en una superficie, en la que las moléculas quedan orientadas aproximadamente paralelas entre sí y substancialmente perpendiculares a la superficie. Una mayoría de las moléculas incluye un grupo funcional que se adhiere a la superficie, y una parte que interactúa con moléculas adyacentes en la monocapa para formar la matriz relativamente ordenada. Una monocapa “mezclada” comprende una monocapa heterogénea, es decir, en la que por lo menos dos moléculas distintas componen la monocapa.

Por consiguiente, en los sistemas mecanismo-1, la monocapa incluye una primera especie que comprende un oligómero conductor que incluye el ligando de enlace de captura, tal como se expone con mayor detalle más adelante, y una segunda especie que comprende la especie que forma monocapas, incluyendo cualquiera o ambos aislantes o oligómeros conductores.

En una realización preferida, la monocapa comprende especies que forman electroconductos. “Especies que forman electroconductos” o “EFS” significa aquí una molécula que es capaz de generar suficientes electroconductos en una monocapa, generalmente de aislantes tales como grupos alquil, para permitir la detección de ETMs en la superficie. En general, las EFS tienen una o más de las siguientes cualidades: pueden ser moléculas relativamente rígidas, por ejemplo respecto a una cadena alquil; pueden unirse a la superficie del electrodo con una geometría diferente de la otra especie que forma monocapas (por ejemplo, se cree que cadenas alquil unidas a superficies de oro con grupos tiol se unen en ángulos de aproximadamente 45°, y se cree que cadenas fenilo-acetileno unidas a oro a través de tioles bajan a ángulos de 90°); pueden tener una estructura que interfiera estéricamente o interrumpa la formación de una monocapa fuertemente empaquetada, por ejemplo a través de la inclusión de grupos de ramificación tales como grupos alquil, o la inclusión de especies altamente flexibles, tales como unidades de polietileno glicol; o pueden ser capaces de activarse para formar electroconductos; por ejemplo, especies fotoactivables que puedan eliminarse selectivamente de la superficie tras la fotoactivación, abandonando los electroconductos.

Las EFS preferidas incluyen oligómeros conductores, tal como se define a continuación, y especies fenil-acetileno-polietileno glicol, así como especies de disulfuro de formación de SAM asimétricas. Sin embargo, en algunas realizaciones, las EFS no son oligómeros conductores.

En una realización preferida, la monocapa comprende oligómeros conductores. “Oligómero conductor” significa aquí un oligómero substancialmente conductor, preferiblemente lineal, algunas realizaciones de los cuales se denominan en la literatura como “cables moleculares”. “Substancialmente conductor” significa aquí que el oligómero es capaz de transferir electrones a 100 Hz. Generalmente, el oligómero conductor tiene substancialmente π orbitales de solapamiento, es decir π orbitales conjugados, como entre las unidades monoméricas del oligómero conductor, aunque el oligómero conductor también puede contener uno o más enlaces sigma (σ). Adicionalmente, un oligómero conductor puede definirse funcionalmente por su capacidad de inyectar a electrones a un ETM asociado o recibirlos del mismo. Además, el oligómero conductor es más conductor que los aislantes tal como aquí se define. Adicionalmente,

los oligómeros conductores de la invención se distinguen de los polímeros electroactivos, ya que ellos mismos pueden donar o aceptar electrones.

En una realización preferida, los oligómeros conductores tienen una conductividad, S , de entre aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente $10^{-4} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ prefiriéndose de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente $10^{-3} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ calculándose estos valores de S para moléculas que oscilan de entre aproximadamente 20 Å a aproximadamente 200 Å. Tal como se describe más adelante, los aislantes tienen una conductividad S de aproximadamente $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o inferior, prefiriéndose menos de aproximadamente $10^{-8} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Véase en general Gardner y otros, *Sensors and Actuators A* 51 (1995) 57-66.

Estructuras de oligómeros conductores, aislantes, procedimientos de unión y definiciones de grupos de describen en WO 98/57159 y WO 00/62931.

Las características deseadas de un oligómero conductor incluyen alta conductividad, suficiente solubilidad en disolventes orgánicos y/o agua para la síntesis y el uso de las composiciones de la invención, y preferiblemente una resistencia química a las reacciones que se producen i) durante la síntesis de ácido nucleico (tal que los nucleósidos que contienen los oligómeros conductores pueden añadirse a un sintetizador de ácido nucleico durante la síntesis de las composiciones de la invención), ii) durante la unión del oligómero conductor a un electrodo, o iii) durante un análisis de hibridación. Además, se prefieren oligómeros conductores que favorezcan la formación de monocapas autoensambladas.

Se apreciará que la monocapa puede comprender diferentes especies de oligómeros conductores, aunque preferiblemente las distintas especies se eligen de tal manera que pueda formarse una SAM razonablemente uniforme. Así, por ejemplo, cuando se unen covalentemente ácidos nucleicos al electrodo utilizando oligómeros conductores, es posible tener un tipo de oligómero conductor utilizado para unir el ácido nucleico, y otro tipo que funcione para detectar el ETM. De manera similar, puede ser deseable tener mezclas de diferentes longitudes de oligómeros conductores en la monocapa, para ayudar a reducir señales no específicas. Así, por el ejemplo, las realizaciones preferidas utilizan oligómeros conductores que terminan por debajo de la superficie del resto de la monocapa, es decir, por debajo de la capa aislante, si se utiliza, o por debajo de alguna fracción de los otros oligómeros conductores. De manera similar, pueden emplearse distintos oligómeros conductores con el fin de facilitar la formación de la monocapa, o para hacer monocapas con características alteradas.

En una realización preferida, la monocapa puede comprender además grupos aislantes. "Aislante" significa aquí un oligómero substancialmente no conductor, preferiblemente lineal. "Substancialmente no conductor" significa aquí que el aislante no transferirá electrones a 100 Hz. La velocidad de transferencia de electrones a través del aislante es preferiblemente menor que la velocidad a través de los oligómeros conductores descritos aquí.

En una realización preferida, los aislantes tienen una conductividad, S , de aproximadamente $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o menor, prefiriéndose menos de aproximadamente $10^{-6} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Véase en general Gardner y otros, *supra*.

En general, los aislantes son oligómeros alquil o heteroalquil o grupos con enlace sigma, aunque cualquier molécula aislante particular puede contener grupos aromáticos o uno o más enlaces conjugados. "Heteroalquil" significa aquí un grupo alquil que tiene por lo menos un heteroátomo, es decir nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, silicio o boro incluido en la cadena. Alternativamente, el aislante puede ser bastante similar a un oligómero conductor con la adición de uno o más heteroátomos o enlaces que sirvan para inhibir o retardar, preferiblemente substancialmente, la transferencia de electrones.

Son conocidos en la técnica aislantes apropiados, e incluyen, pero sin limitarse a ellos, $-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CRH})_n-$ y $-(\text{CR}_2)_n-$ etilenglicol o derivados utilizando otros heteroátomos en lugar del oxígeno, es decir nitrógeno o azufre (no se prefieren derivados de azufre si el electrodo es oro).

Los SAMs de la invención pueden realizarse de distintas maneras, incluyendo la deposición fuera de soluciones orgánicas y la deposición fuera de soluciones acuosas. Los procedimientos que aquí se describen utilizan un electrodo de oro como ejemplo, aunque tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden utilizarse también otros metales y procedimientos. En una realización preferida, se utiliza óxido de indio y estaño (ITO) como electrodo. En una realización preferida, primero se limpia una superficie de oro. Pueden utilizarse una variedad de procedimientos de limpieza, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, limpieza química o ataque químico (incluyendo solución Piranha (peróxido de hidrógeno/ácido sulfúrico) o agua regia (ácido clorhídrico/ácido nítrico), procedimientos electroquímicos, tratamiento con llama, tratamiento por plasma o sus combinaciones.

Después de la limpieza, el sustrato de oro se expone a las especies SAM. Cuando el electrodo es ITO, las especies SAM son especies que contienen fosfonato. Esto puede realizarse también de distintas maneras que incluyendo, pero sin limitarse a éstas, deposición de la solución, deposición de fase gas, impresión por microcontacto, deposición por pulverización, deposición utilizando componentes puros, etc. Una realización preferida utiliza una solución de deposición que comprende una mezcla de varias especies SAM en solución, generalmente especies que contienen tiol. Las monocapas mezcladas que contienen ácidos nucleicos se preparan generalmente utilizando un procedimiento de dos etapas. El ácido nucleico tiolado se deposita durante la primera etapa de deposición (generalmente en presencia de por lo menos otra especie de formación de monocapas) y la formación de monocapas mezcladas termina durante la

segunda etapa en la cual se añade una segunda solución de tiol menos ácido nucleico. Opcionalmente, se realiza una segunda etapa utilizando un ligero calentamiento para favorecer la reorganización de monocapas.

En una realización preferida, la solución de deposición es una solución orgánica de deposición. En esta realización, se coloca una superficie limpia de oro en un frasco limpio. Se prepara una solución de deposición del ligando de enlace en un disolvente orgánico en el que la concentración total de tiol es entre micromolar y saturación; las gamas preferidas incluyen de aproximadamente 1 μM a 10 mM, prefiriéndose especialmente de aproximadamente 400 μM a aproximadamente 1,0 mM. En una realización preferida, la solución de deposición contiene ADN modificado con tiol (es decir, un ácido nucleico unido a un elemento de enlace de fijación) y moléculas diluyentes de tiol (oligómeros conductores o bien aislantes, prefiriéndose este último). La relación entre ácido nucleico y diluyente (si se encuentra presente) es de generalmente entre 1000:1 y 1:1000, prefiriéndose de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10 y prefiriéndose especialmente 1:1. Los solventes preferidos son tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo, dimetilformamida (DMF), etanol, o sus mezclas; en general puede utilizarse cualquier disolvente de polaridad suficiente para disolver el ligando de captura, siempre que el disolvente no contenga grupos funcionales que reaccionen con la superficie. Se añade suficiente solución de deposición de ácido nucleico al vial para cubrir totalmente la superficie del electrodo. Se deja que el sustrato de oro incube a temperatura ambiente o ligeramente por encima de la temperatura ambiente durante un período del tiempo que oscila entre segundos y horas, prefiriéndose 5-30 minutos. Después de la incubación inicial, se elimina la solución de deposición y se añade solamente una solución de molécula diluyente (de aproximadamente 1 μM a 10 mM, prefiriéndose de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 1,0 mM) en un disolvente orgánico. Se deja incubar el sustrato de oro a temperatura ambiente o por encima de la temperatura ambiente durante un período de tiempo (de segundos a días, prefiriéndose de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 24 horas). La muestra de oro se elimina de la solución, se enjuaga en disolvente limpio y se utiliza.

En una realización preferida, se utiliza una solución de deposición acuosa. Al igual que antes, se coloca una superficie limpia de oro en un vial limpio. Se prepara una solución de deposición de ácido nucleico en agua en la cual la concentración total de tiol es de aproximadamente 1 μM y 10 mM, prefiriéndose de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 200 μM . Con frecuencia la solución acuosa tiene sal presente (hasta la saturación, prefiriéndose aproximadamente 1 M), no obstante puede utilizarse agua pura. La solución de deposición contiene ácido nucleico modificado con tiol y a menudo una molécula de diluyente tiol. La relación entre ácido nucleico y diluyente es habitualmente entre 1000:1 a 1:1000, prefiriéndose de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10 y prefiriéndose especialmente 1:1. La solución de deposición de ácido nucleico se añade al vial en un volumen tal para cubrir totalmente la superficie del electrodo. El sustrato de oro se deja incubar a temperatura ambiente o ligeramente por encima de temperatura ambiente durante 1-30 minutos siendo suficientes generalmente 5 minutos. Después de la incubación inicial, la solución de deposición se elimina y se añade solamente una solución de molécula diluyente (10 μM -1,0 milímetros) en agua o bien solvente orgánico. El sustrato de oro se deja incubar a temperatura ambiente o por encima de temperatura ambiente hasta que se forma una monocapa completa (10 minutos-24 horas). La muestra de oro se elimina de la solución, se aclara en un disolvente limpio y se utiliza.

En una realización preferida, la solución de deposición comprende un compuesto zwitteriónico, preferiblemente betaína. Realizaciones preferidas utilizan betaína y búferes Tris-HCl.

En una realización preferida, tal como se describe aquí, se utiliza una placa de circuito como sustrato para los electrodos de oro. La formación de SAMs en la superficie de oro se realiza generalmente limpiando primero las placas, por ejemplo en una solución de ácido sulfúrico al 10% durante 30 segundos, soluciones detergentes, agua regia, plasma, etc., tal como se describe aquí. Después del tratamiento con ácido sulfúrico, las placas se lavan, por ejemplo por inmersión en dos baños de agua Milli-Q durante 1 minuto cada uno. Después se secan las placas, por ejemplo bajo una corriente de nitrógeno. El marcado de la solución de deposición sobre las placas se realiza utilizando cualquier número de sistemas de marcado conocidos, generalmente colocando las placas en una mesa X-Y, preferiblemente en una cámara de humedad. El tamaño de la gota de marcado variará con el tamaño de los electrodos en las placas y el equipo utilizados para el suministro de la solución; por ejemplo, para electrodos de 250 μM de tamaño se utiliza una gota de 30 nanolitros. El volumen debe ser suficiente para cubrir totalmente la superficie del electrodo. La gota se incuba a temperatura ambiente durante un período del tiempo (segundos durante la noche, prefiriéndose 5 minutos) y entonces la gota se elimina aclarando en un baño de agua Milli-Q. Las placas se tratan opcionalmente con una segunda solución de deposición, que generalmente comprende un aislante en un disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo, por inmersión en un baño a 45°C. Tras 30 minutos, las placas se extraen y se sumergen en un baño de acetonitrilo durante 30 segundos seguido de un baño de agua Milli-Q durante 30 segundos. Las placas se secan bajo una corriente de nitrógeno. Preferiblemente se emplea solamente aclarado con agua.

En una realización preferida, el electrodo de detección que comprende SAM (o sitios en la matriz, para realizaciones sin electrodo) comprende además ligandos de enlaces de captura, preferiblemente unidos covalentemente. "Ligando de enlace" o "especie de enlace" significa aquí un compuesto que se utiliza para detectar la presencia del analito objetivo, que se enlazarán al analito objetivo. Generalmente, para la mayor parte de las realizaciones que aquí se describen, existen por lo menos dos ligandos de enlace utilizados por molécula de analito objetivo; ligando de enlace de "captura" o de "anclaje" (también denominado aquí "sonda de captura", particularmente en referencia a un ligando de enlace de ácido nucleico) que se une al electrodo de detección tal como se descrito aquí, y ligando de enlace soluble (denominado ion frecuencia aquí como "sonda de señalización" o "sonda de marcado"), que se enlaza independientemente al analito objetivo, y comprende directa o indirectamente por lo menos un ETM. Sin embargo, debe observarse que para los sistemas de detección de ácidos nucleicos basados en Fluorescencia, la secuencia objetivo generalmente

se amplifica, y durante la amplificación se añade una etiqueta fluorescente; de este modo estos sistemas comprenden en general solamente dos elementos, la sonda de captura y objetivo marcado. De nuevo, la descripción que sigue a continuación va dirigida al uso de electrodos y detección electroquímica, pero tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden utilizarse también sistemas basados en fluorescencia. Generalmente, el ligando de enlace de captura
5 permite la unión de un analito objetivo al electrodo de detección, para fines de detección. Tal como se expone con mayor detalle a continuación, la unión del analito objetivo al ligando de enlace de captura puede ser directa (es decir el analito objetivo se une al ligando de enlace de captura) o indirecta (puede utilizarse uno o más ligandos prolongadores de captura).

10 En una realización preferida, el enlace es específico, y el ligando de enlace forma parte de un par de enlace. “Enlace específico” significa aquí que el ligando se une al analito, con la suficiente especificidad para distinguir entre el analito y otros componentes o contaminantes de la muestra de prueba. Sin embargo, tal como apreciarán los expertos en la técnica, será posible detectar analitos utilizando un enlace que no sea altamente específico; por
15 ejemplo, los sistemas pueden utilizar diversos ligandos de enlace, por ejemplo una matriz de ligandos distintos, y la detección de cualquier analito particular se realiza a través de su “firma” de enlace a un panel de ligandos de enlace, similar a la manera en la que funcionan las “narices electrónicas”. El enlace debe ser suficiente para permitir que el analito permanezca enlazado bajo las condiciones de análisis, incluyendo etapas de lavado para eliminar un enlace no específico. En algunas realizaciones, por ejemplo en la detección de ciertas biomoléculas, las constantes de enlace del analito al ligando de enlace serán por lo menos aproximadamente de 10^{-4} a 10^{-6} M^{-1} , prefiriéndose por lo menos
20 aproximadamente de 10^{-5} a 10^{-9} y prefiriéndose particularmente por lo menos aproximadamente de 10^{-7} a 10^{-9} M^{-1} .

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la composición del ligando de enlace dependerá de la composición del analito objetivo. Se conocen ligandos de enlace a una amplia variedad de analitos o pueden encontrarse fácilmente utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando el analito es un ácido nucleico de cadena única, el ligando de
25 enlace es generalmente un ácido nucleico substancialmente complementario. Alternativamente, tal como se describe en general en las patentes americanas 5.270.163, 5.475.096, 5.567.588, 5.595.877, 5.637.459, 5.683.867, 5.705.337, y patentes relacionadas, pueden desarrollarse “aptámeros” de ácido nucleico para unirse virtualmente a cualquier analito objetivo. De manera similar el analito puede ser una proteína de enlace a ácido nucleico y el ligando de enlace de captura es un ácido nucleico de cadena única o bien de doble cadena; alternativamente, el ligando de enlace puede
30 ser una proteína de enlace de ácido nucleico cuando el analito es un ácido nucleico de cadena única o de doble cadena. Si el analito es una proteína, los ligandos de enlace incluyen proteínas (incluyendo particularmente anticuerpos o sus fragmentos (FABs, etc.)), moléculas pequeñas, o aptámeros, descritos anteriormente. Las proteínas de ligando de enlace preferidas incluyen péptidos. Por ejemplo, si el analito es una enzima, ligandos de enlace apropiados incluyen substratos, inhibidores, y otras proteínas que enlazan la enzima, es decir componentes de un compuesto multi-
35 enzima (o proteína). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden utilizarse cualquier par de moléculas que se asocien, preferiblemente específicamente, como analito o bien ligando de enlace. Pares apropiados analito/ligando de enlace incluyen, pero no se limita a estos, anticuerpos/antígenos, receptores/ligando, proteínas/ácidos nucleicos; ácidos nucleicos/ácidos nucleicos, enzimas/substratos y/o inhibidores, carbohidratos (incluyendo glicoproteínas y glicolípido)/lectinas, carbohidratos y otras parejas de enlaces, proteínas/proteínas; y proteína/moléculas pequeñas. Estas
40 pueden ser secuencias de tipo salvaje o derivado. En una realización preferida, los ligandos de enlace son porciones (particularmente porciones extracelulares) de receptores de superficies celulares que se sabe que multimerizan, tal como el receptor de la hormona de crecimiento, transportadores de glucosa (particularmente receptor GLUT4), receptor de transferrina, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor de lipoproteína de baja densidad, receptor de lipoproteína de alta densidad, receptor de leptina, receptores de interleucina que incluyen receptores IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15 y IL-17, receptor VEGF, receptor PDGF, receptor
45 EPO, receptor TPO, receptor del factor neurotrófico ciliar, receptor de prolactina, y receptores de células T. De manera similar, hay una amplia literatura relativa al desarrollo de pares de enlaces basados en procedimientos de química combinatoria.

50 En esta realización, cuando el ligando de enlace es un ácido nucleico, las composiciones y técnicas preferidas se describen en las patentes americanas n° 5.591.578; 5.824.473; 5.705.348; 5.780.234 y 5.770.369; WO 98/20162; WO98/12430; WO98/57158; WO 00/16089) WO99/57317; WO99/67425; WO00/24941; PCTUS00/10903; WO00/38836; WO99/37819; WO99/57319 y PCTUS00/20476; y referencias relacionadas.

55 El procedimiento de unión de los ligandos de enlace de captura al elemento de enlace de conexión (un oligómero aislante o conductor) se realizará en general como es conocido en la técnica, y dependerá de la composición del elemento de enlace de conexión y del ligando de enlace de captura. Los ligandos de enlace de captura se unen generalmente al elemento de enlace de conexión mediante el uso de grupos funcionales en cada uno que pueda utilizarse entonces para la unión. Los grupos funcionales preferidos para la unión son grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo
60 y grupos tiol. Estos grupos funcionales pueden unirse entonces, directa o indirectamente, mediante el uso de un elemento de enlace, representado a veces aquí como “Z”. Los elementos de enlace son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, elementos de enlace homo o hetero-bifuncionales son también bien conocidos (véase 1994 Pierce Chemical Company catalog, sección técnica sobre elementos de enlace cruzado, páginas 155-200). Los elementos de enlaces Z preferidos incluyen, pero sin limitarse a éstos, grupos alquil (incluyendo grupos alquil substituidos y grupos
65 alquil que contienen grupos de heteroátomos), prefiriéndose grupos alquil cortos, ésteres, amida, amina, grupos de epoxi y glicol y derivados de etileno, prefiriéndose especialmente propil, acetileno, y alqueno C_2 . Z también puede ser un grupo sulfona, formando uniones de sulfamida.

De esta manera, pueden añadirse ligandos de enlace de captura que comprenden proteínas, lectinas, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas, carbohidratos, etc.

Una realización preferida utiliza ligandos de enlaces de captura proteínica. Como es conocido en la técnica, puede utilizarse cualquier número de técnicas para unir un ligando de enlace de captura proteica a un elemento de enlace de conexión. Se conoce una amplia variedad de técnicas para añadir grupos a las proteínas.

Una realización preferida utiliza ácidos nucleicos como ligando de enlace de captura. Aunque la mayor parte de la siguiente descripción se centra en ácidos nucleicos, tal como apreciarán los expertos en la técnica, muchas de las técnicas que se exponen a continuación se aplican de manera similar también a sistemas de ácidos no-nucleicos, y a sistemas que se basan en la unión a superficies aparte de electrodos metálicos.

El ácido nucleico de la sonda de captura se une covalentemente al electrodo a través de un “elemento de enlace de conexión”, que puede ser un oligómero conductor (necesario para los sistemas mecanismo-t) o un aislante. “Unir covalentemente” significa aquí que dos grupos se unen mediante por lo menos un enlace, incluyendo enlaces sigma, enlaces pi y enlaces de coordinación.

De este modo, un extremo del elemento de enlace de conexión se une al ácido nucleico (u otro ligando de enlace), y el otro extremo se une al electrodo (aunque tal como apreciarán los expertos en la técnica, no es necesario que sea el término exacto para ambos).

En una realización preferida, puede haber una o más especies de sonda de captura distintas en la superficie. En algunas realizaciones, puede haber un tipo de sonda de captura, o un tipo de prolongador sonda de captura, tal como se describe con mayor detalle más adelante. Alternativamente pueden utilizarse distintas sondas de captura, o sondas de captura con una multiplicidad de distintas sondas prolongadoras de captura. De manera similar, puede ser deseable (en particular en el caso de analitos de ácidos nucleicos y ligandos de enlace en los sistemas de mecanismo-2) utilizar sondas de captura auxiliares que comprendan secuencias de sonda relativamente cortas, que pueden utilizarse para componentes “viscosos” del sistema, por ejemplo, elementos de enlace de regeneración, para aumentar la concentración de ETMs en la superficie.

En una realización preferida, se diseñan y se utilizan un número de sondas de captura para cada secuencia objetivo. Es decir, una única almohadilla del electrodo de la matriz puede tener 1 sonda al analito objetivo, o una pluralidad de sondas a la misma secuencia objetivo, preferiblemente (pero no es necesario) sin superponerse. Esto es particularmente preferible para largas secuencias objetivo. En esta realización, se utilizan por lo menos dos sondas de captura distintas, prefiriéndose por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y prefiriéndose particularmente 8.

En una realización preferida, las composiciones comprenden además una solución o ligando de enlace soluble, aunque tal como se describe con mayor detalle más adelante, para los sistemas mecanismo-1, puede añadirse ETMs en forma de indicadores de hibridación unidos no covalentemente. Los ligandos de enlace de la solución son similares a los ligandos de enlace de captura, en que se enlazan, preferiblemente específicamente, a analitos objetivo. El ligando de enlace de la solución (denominado aquí en general sondas de marcado cuando los analitos objetivo son ácidos nucleicos) puede ser igual o diferente del ligando de enlace de captura. Generalmente, los ligandos de enlace de la solución no se unen directamente a la superficie. El ligando de enlace de la solución comprende directamente un elemento de enlace de regeneración que comprende por lo menos un ETM WO 01/07665, o bien el elemento de enlace de regeneración se enlaza, directa o indirectamente, al ligando de enlace de la solución.

De este modo se disponen “ligandos de enlace de la solución” o “ligandos de enlace solubles” o “portadores de señal” o “sondas de marcado” o “ligandos de enlaces de marcado” con elementos de enlace de regeneración que comprenden ETMs unidos covalentemente. Es decir, una parte de la sonda de marcado o el ligando de enlace de la solución se une directa o indirectamente al analito objetivo, y una parte comprende un elemento de enlace de regeneración que comprende ETMs unidos covalentemente. En algunos sistemas, por ejemplo en los sistemas de ácidos nucleicos del mecanismo-1, éstos pueden ser iguales. De manera similar, para los sistemas del mecanismo-1, el elemento de enlace de regeneración comprende ácidos nucleicos que se hibridarán a sondas de detección. Los términos “grupo donante de electrones”, “grupo aceptador de electrones”, y “ETMS” (ETMs) o equivalentes gramaticales se refieren aquí a moléculas capaces de transferencia de electrones bajo ciertas condiciones. Debe comprenderse que las capacidades del donante y el aceptador de electrones son relativos; es decir, una molécula que puede perder un electrón bajo ciertas condiciones experimentales podrá aceptar un electrón bajo condiciones experimentales distintas. Debe comprenderse que el número de posibles grupos donantes de electrones y grupos aceptadores de electrones es muy grande, y el experto en materia de compuestos de transferencia de electrones podrá utilizar un número de compuestos en la presente invención. Los ETMs preferidos incluyen, pero no se limita a éstos, compuestos de metales de transición, ETMs orgánicos, y electrodos.

En las estructuras que aquí se representan, M es un átomo metal, prefiriéndose metales de transición. Metales de transición apropiados para el uso en la invención incluyen, aunque no se limitan a éstos, cadmio (Cd), cobre (Cu), cobalto (Co), paladio (Pd), zinc (Zn), hierro (Fe), rutenio (Ru), rodio (Rh), osmio (Os), renio (Re), platino (Pt), escandio (Sc), titanio (Ti), vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), níquel (Ni), molibdeno (Mo), tecnecio (Tc), tungsteno (W), e iridio (Ir). Es decir, se prefiere la primera serie de metales de transición, metales platino (Ru, Rh, Pd, Os, Ir y Pt), junto con Fe, Re, W, Mo, y Tc. Son particularmente preferidos el rutenio, renio, osmio, platino, cobalto y hierro.

L son co-ligandos, que proporcionan los átomos de coordinación para el enlace del ion metálico. Tal como apreciarán los expertos en la materia, el número y la naturaleza de los co-ligandos dependerá del número de coordinación del ion metálico. Pueden utilizarse mono-, di- o polidentados en cualquier posición. Así, por ejemplo, si el metal tiene un número de coordinación de seis, la L del término del oligómero conductor, la L contribuida del ácido nucleico, y r, suman seis. Así, cuando el metal tiene un número de coordinación de seis, r puede variar entre cero (cuando todos los átomos de coordinación los proporcionan los otros dos ligandos) y cuatro, cuando todos los co-ligandos son monodentados. Así, en general, r será de 0 a 8, dependiendo del número de coordinación del ion metálico y de la elección de los otros ligandos.

En una realización, el ión metálico tiene un número de coordinación de seis y tanto el ligando unido al oligómero conductor como el ligando unido al ácido nucleico son por lo menos bidentados; es decir, r es preferiblemente cero, uno (es decir, el co-ligando restante es bidentado) o dos (se utilizan dos co-ligandos monodentados).

Tal como se aprecia en la técnica, los co-ligandos pueden ser iguales o distintos. Ligandos apropiados se encuentran en dos categorías: ligandos que utilizan átomos de nitrógeno, oxígeno, azufre, carbono o fósforo (dependiendo del ión metálico) como átomos de coordinación (denominados en general en la literatura como donantes sigma (σ)) y ligandos organometálicos tales como ligandos de metaloceno (denominados en general en la literatura como donantes π (π), y representados aquí como L_m). Los ligandos donantes de nitrógeno apropiados son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a éstos, NH_2 ; NHR; NRR' ; piridina; pirazina; isonicotinamida; imidazol; bipyridina y derivados sustituidos de bipyridina; terpiridina y derivados sustituidos; fenantrolinas, en particular 1,10-fenantroli-2-na (abreviado fen) y derivados sustituidos de fenantrolinas tales como 4,7-dimetilfenantolina y dipiridol [3,2-a2',3'-c]fenazina (abreviado dppz); dipiridofenazina; 1,4,5,8,9,12-hexaazatrifenileno (abreviado hat); 9,10-diimina fenantrenoquinona (abreviado phi); 1,4,5,8 tetraazafenantreno (abreviado tap); 1,4,8,11 tetra-azaciclotetradecano (abreviado ciclam), EDTA, EGTA e isoniácida. También pueden utilizarse derivados sustituidos, incluyendo derivados fundidos. En algunas realizaciones, pueden utilizarse porfirinas y derivados sustituidos de la familia de la porfirina. Véase por ejemplo, Comprehensive Coordination Chemistry, Ed. Wilkinson y otros, Pergamon Press, 1987, capítulos 13. 2 (págs. 73-98), 21.1 (págs. 813-898) y 21.3 (págs. 915-957).

Son conocidos en la técnica ligandos donantes sigma apropiados que utilizan carbono, oxígeno, azufre y fósforo. Por ejemplo, donantes de carbono sigma apropiados se encuentran en Cotton y Wilkenson, Advanced Organic Chemistry, 5ª Edición, John Wiley & Sons, 1988, véase página 38, por ejemplo. De manera similar, ligandos de oxígeno apropiados incluyen éteres corona, agua y otros conocidos en la técnica. También son apropiadas fosfinas y fosfinas sustituidas; véase página 38 de Cotton y Wilkenson.

Los ligandos donantes de oxígeno, azufre, fósforo y nitrógeno se unen de tal manera que permiten que los heteroátomos sirvan de átomos de coordinación.

En una realización preferida, se utilizan ligandos organometálicos. Además de compuestos puramente orgánicos para el uso como grupos redox, y varios compuestos de coordinación de metal de transición con ligandos orgánicos 8- enlazados con átomos donantes como sustituyentes heterocíclicos o exocíclicos, hay disponible una amplia variedad de compuestos organometálicos de metal de transición con ligandos orgánicos n-enlazados (véase Advanced Inorganic Chemistry, 5ª Ed., Cotton y Wilkinson, John Wiley & Sons, 1988, capítulo 26; Organometallics, A Concise Introduction, Elschenbroich y otros, 2ª Ed., 1992, VCH; y Comprehensive Organometallics Chemistry, una revisión de la literatura 1982-1994, Abel y otros. Ed., vol. 7, capítulos 7, 8, 10 y 11, Pergamon Press). Tales ligandos organometálicos incluyen compuestos aromáticos cíclicos tales como el ión ciclopentadienilo [$C_5H_5(-1)$] y varios derivados de anillo y anillo fundido sustituido, tales como ion *indenylide* (-1), que produce una clase de compuestos metálicos bis(ciclopentadienilo), (es decir los metalocenos); véase por ejemplo Robins y otros., J. Chem. Soc. 104:1882-1893 (1982); y Gassman y otros., J. Chem. Soc. 108:4228-4229 (1986). De éstos, el ferroceno [$(C_5H_5)_2 Fe$] y sus derivados son ejemplos prototípicos que se han utilizado en una amplia variedad de productos químicos (Connelly y otros., Chem. Rev. 96:877-910 (1996), y electroquímicos (Geiger y otros., Advances in Organometallics Chemistry 23:1-93; y Geiger y otros. Advances in Organometallics Chemistry, 24:87) reacciones de transferencia de electrones o "redox". Los derivados metalocenos de una variedad de metales de transición de la primera, segunda y tercera fila son candidatos potenciales como grupos redox que se unen covalentemente al anillo de ribosa o bien a la base nucleosídica del ácido nucleico. Otros ligandos organometálicos potencialmente apropiados incluyen arenos cíclicos tales como benceno, para producir compuestos metálicos bis (areno) y sus derivados de anillo y anillo fundido sustituido, de los cuales el bis(benceno) cromo es un ejemplo prototípico. Otros ligandos π -enlazados acíclicos tales como el ión alil (-1) o butadieno proporcionan compuestos potencialmente organometálicos apropiados, y todos estos ligandos, en combinación con otros ligandos π -enlazados y δ -enlazados constituyen la clase general de compuestos organometálicos en la que existe un enlace metal carbono. Estudios electroquímicos de varios dímeros y oligómeros de dichos compuestos con ligandos orgánicos de unión, y ligandos de no unión adicionales, así como con y sin enlaces metal-metal son potenciales grupos redox candidatos en análisis de ácidos nucleicos.

Cuando uno o más co-ligandos es un ligando organometálico, el ligando se une en general a través de uno de los átomos de carbono del ligando organometálico, aunque la unión puede producirse a través de otros átomos para ligandos heterocíclicos. Ligandos organometálicos preferidos incluyen ligandos metaloceno, incluyendo derivados sustituidos y metalocenoofanos (véase página 1174 de Cotton y Wilkenson, *supra*). Por ejemplo, pueden utilizarse derivados de ligandos metaloceno tales como metilciclopentadienilo, prefiriéndose múltiples grupos de metilo, por ejemplo pentame-

tiliciclopentadienil, para aumentar la estabilidad del metaloceno. En una realización preferida, solamente se derivativa uno de los dos ligandos metaloceno de un metaloceno.

5 Tal como aquí se describe, puede utilizarse cualquier combinación de ligandos. Combinaciones preferidas incluyen: a) todos los ligandos son ligandos donantes de nitrógeno; b) todos los ligandos son ligandos organometálicos; y c) el ligando en el terminal del elemento de enlace de conexión es un ligando metaloceno y el ligando proporcionado por el ácido nucleico es un ligando donante de nitrógeno, con los otros ligandos, si es necesario, son ligandos donantes de nitrógeno o bien ligandos metaloceno, o una mezcla.

10 En una realización preferida, los ETMs son compuestos de metal de transición. Los metales de transición son aquellos cuyos átomos tienen una estructura d parcial o completa de electrones. Metales de transición adecuados para su uso en la invención se han indicado anteriormente.

15 Los metales de transición son complexados con una variedad de ligandos, L, definido anteriormente, para formar compuestos de metal de transición apropiados, tal como es bien conocido en la técnica.

ETMs preferidos comprenden particularmente ferroceno.

20 Además de compuestos de metales de transición, pueden unirse covalentemente otros donantes y aceptadores orgánicos de electrones al ácido nucleico para su uso en la invención. Estas moléculas orgánicas incluyen, pero sin limitarse a ellas, riboflavina, colorantes de xanteno, colorantes de acina, naranja de acridina, dicloruro de N,N-dimetil-2,7 diazapirenio (DAP²⁺), metilviologen, bromuro de etidio, quinonas tales como dicloruro de N,N'-dimetilantra [2,1,9-def:6,5,10,d'e'f']diisoquinolinio (ADIQ²⁺); porfirinas (tetracloruro de [meso-tetraquis (N-metil-x-piridinio) porfirina], hidrocloreuro de azul B de varlamina, verde de Bindschedler; 2,6 dicloroindofenol, 2,6 dibromofenolindofenol; azul brillante (cloruro de 3-amino- 9-dimetil-emino-10-metilfenoxiazina), azul de metileno; azul Nilo A (sulfato de aminoaftodietilaminofenoxiazina), indigo-5,5',7,7' - ácido tetrasulfónico, indigo- 5,5',7-ácido trisulfónico; fenosafranina, ácido índico 5-monosulfónico; safranina T; bis (dimetilglioximato) - cloruro de hierro (II); rojo indulina, rojo neutro, antraceno, coroneno, pireno, 9-fenilantraceno, rubreno, binaftil, DPA, fenotiazeno, fluoranteno, fenantreno, criseno, 1,8 difenil-1,3,5,7 octatetraceno, naftaleno, acenaftaleno, perileno, TMPD y análogos y derivados substituidos de estos compuestos.

En una realización, los donantes y los aceptadores de electrones son proteínas redox tal como es conocido en la técnica. Sin embargo, las proteínas redox en muchas realizaciones no se prefieren.

35 La elección de ETMs específicos estará influenciada por el tipo de detección de transferencia de electrones empleada, tal como se expone en general más adelante. ETMs preferidos son metalocenos, prefiriéndose particularmente el ferroceno.

40 Una secuencia de ácidos nucleicos objetivo se une (por hibridación) a un electrodo que comprende una monocapa, que incluye en general oligómeros conductores. Esta unión puede ser directamente a una sonda de captura en la superficie, o bien indirectamente, utilizando sondas prolongadoras de captura. En algunas realizaciones, las propias secuencia objetivo comprenden ETMs. Alternativamente, se añade después una sonda de marcado, formando un compuesto de análisis. La unión de la sonda de marcado puede ser directa (es decir, hibridación a una parte de la secuencia objetivo), o indirecta (es decir, hibridación a una sonda amplificadora que se hibridiza a la secuencia objetivo), con todos los ácidos nucleicos requeridos formando un compuesto de análisis. Como resultado de la hibridación de la primera parte de la sonda de marcado, la segunda parte de la sonda de marcado, el "elemento de enlace de regeneración", que contiene ETMs se dispone en proximidad espacial a la superficie del SAM en el electrodo, y entonces puede detectarse electrónicamente la presencia de ETM.

50 Electrodo que comprenden monocapas que incluyen especies que forman SAM y sondas de captura son útiles en sistemas de detección de ácidos nucleicos (u otro analito objetivo). Las composiciones pueden comprender además una sonda de marcado. La sonda de marcado es ácido nucleico, en general de cadena única, aunque tal como se describe con mayor detalle más adelante, puede contener porciones de doble cadena. En los sistemas del mecanismo-2, la sonda de marcado comprende una primera parte que es capaz de hibridarse a un componente del compuesto del análisis, que se define a continuación, y una segunda parte que no se hibridiza a un componente de un compuesto de análisis y comprende por lo menos un ETM unido covalentemente.

60 Sin limitarse a la teoría, parece que en los sistemas del "mecanismo-2", la transferencia de electrones se facilita cuando el ETM puede penetrar ("acercarse") en la monocapa en cierta medida. Es decir, parece que en general ETMs hidrofóbicos utilizados con SAMs hidrofóbicas da lugar a señales mejores (más grandes) que los ETMs cargados o que son más hidrofílicos. Así, por ejemplo, el ferroceno en solución puede penetrar las monocapas de los ejemplos y proporcionar una señal cuando los electroconductos están presentes, mientras que el ferrocianuro en solución proporciona poca o ninguna señal. De este modo, se prefieren ETMs hidrofóbicos en general en los sistemas del mecanismo-2; sin embargo, los compuestos de metal de transición, aunque están cargados, con uno o más ligandos hidrofóbicos, tales como compuestos Ru y Os, también dan lugar a buenas señales. De manera similar, la transferencia de electrones entre el ETM y el electrodo viene facilitada por el uso de elementos de enlace o separadores que permiten una cierta flexibilidad del ETM para penetrar en la monocapa; de este modo las composiciones N6 de la invención tienen un elemento de enlace de cuatro carbonos que enlazan el ETM al ácido nucleico.

En una realización preferida, se utiliza una pluralidad de ETMs. El uso de múltiples ETMs proporciona una amplificación de la señal y permite así unos límites de detección más sensibles. Tal como se describe más adelante, mientras que el uso de múltiples ETMs en ácidos nucleicos que se hibridizan a filamentos complementarios puede provocar disminuciones de Tms de los compuestos de hibridación dependiendo del número, sitio de enlace y de la separación entre múltiples ETMs, éste no es un factor cuando los ETMs se encuentran en el elemento de enlace de regeneración, puesto que éste no se hibridiza a una secuencia complementaria. Por consiguiente, se prefieren pluralidades de ETMs, prefiriéndose por lo menos aproximadamente 2 ETMs por elemento de enlace de regeneración, y prefiriéndose particularmente por lo menos aproximadamente 10, y prefiriéndose especialmente por lo menos aproximadamente de 20 a 50. A veces puede utilizarse cantidades muy grandes de ETMs (100 a 1000).

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la parte de la sonda de marcado (o objetivo, en algunas realizaciones) que comprende ETMs (denominada aquí “elemento de enlace de regeneración” o “portador de señal”) pueden ser ácido nucleico, o puede ser un elemento de enlace de ácido no nucleico que enlace la primera parte hibridizable de la sonda de marcado al ETMs. Es decir, como que esta parte de la sonda de marcado no se requiere para la hibridación, no es necesario que sea ácido nucleico, aunque esto se puede hacerse para facilitar la síntesis. En algunas realizaciones, tal como se describe con mayor detalle más adelante, el elemento de enlace de regeneración puede comprender partes de doble cadena. Así, tal como apreciarán los expertos en la técnica, hay una variedad de configuraciones que puedan utilizarse. En una realización preferida, el elemento de enlace de regeneración es ácido nucleico (incluyendo análogos), y el enlace de ETMs puede ser a través de (1) una base; (2) una parte principal, incluyendo la ribosa, fosfato, o estructuras comparables en análogos de ácido nucleico; (3) sustitución de nucleósidos, que se describe más adelante; o (4) polímeros de metaloceno, tal como se describe más adelante. En una realización preferida, el elemento de enlace de regeneración es ácido no-nucleico, y puede ser un polímero de metaloceno o un polímero de tipo alquil (incluyendo heteroalquil, tal como se describe con mayor detalle más adelante) conteniendo grupos de sustitución de ETM. Estas opciones se representan en general en las figuras.

En una realización preferida, el elemento de enlace de regeneración es un ácido nucleico, y comprende ETMs unidos de manera covalente. Los ETMs pueden unirse a nucleósidos dentro del ácido nucleico en una variedad de posiciones. Realizaciones preferidas incluyen, pero sin limitarse a éstas, (1) enlace a la base del nucleósido, (2) enlace de ETM como base de sustitución, (3) enlace a la parte principal del ácido nucleico, incluyendo a una ribosa de la parte principal de la ribosa-fosfato o bien a un grupo del fosfato, o a estructuras análogas en análogos de ácidos nucleicos, y (4) enlace a través de polímeros metaloceno, prefiriéndose este último.

Además, tal como se describe más adelante, cuando el elemento de enlace de regeneración es ácido nucleico, puede ser deseable utilizar sondas de marcado secundarias, que tienen una primera parte que se hibridizará a una parte de las sondas de marcado principales y una segunda parte que comprende un elemento de enlace de regeneración tal como aquí se define. Esto es similar al uso de una sonda amplificadora, excepto en que tanto la sonda principal como la secundaria comprenden ETMs.

En una realización preferida, la posición 2' de una ribosa de un nucleótido de fosforamidita se funcionaliza primero para contener un grupo hidroxil protegido, en este caso a través de un enlace oxo, si bien puede utilizarse cualquier número de elementos de enlace, tal como se describe aquí en general para los elemento de enlace Z. El nucleótido modificado protegido se incorpora entonces a través de química de fosforamidita estándar en un ácido nucleico de cultivo. El grupo de protección se elimina, y se utiliza el grupo hidroxil libre, utilizando de nuevo química de fosforamidita estándar para añadir un metaloceno fosforamidita tal como ferroceno. Es posible una reacción similar para análogos de ácido nucleico. Por ejemplo, utilizando ácido nucleico de péptidos y monómero metaloceno mostrado en la Estructura 41, podrían generarse estructuras de ácido nucleico de péptidos que contengan polímeros de metaloceno.

Los elementos de enlace de regeneración de ácidos nucleicos que comprenden “ramificaciones” de polímeros de metaloceno se representan en general en las figuras 12 y 13. Las realizaciones preferidas también utilizan polímeros de metaloceno a partir de uno a aproximadamente 50 metalocenos de longitud, prefiriéndose de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 y prefiriéndose especialmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.

Además, cuando el elemento de enlace de regeneración es ácido nucleico, puede hacerse cualquier combinación de enlaces de ETM.

En una realización preferida, el elemento de enlace de regeneración no es ácido nucleico, y en su lugar puede ser cualquier tipo de elemento de enlace o polímero. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, puede utilizarse en general cualquier elemento de enlace o polímero que pueda modificarse para contener ETMs. En general los polímeros o elementos de enlace deben ser razonablemente solubles y contener grupos funcionales apropiados para la adición de ETMs.

Tal como se utiliza aquí, un “polímero de regeneración” comprende por lo menos dos o tres subunidades, que se unen covalentemente. Por lo menos una cierta parte de las subunidades monoméricas contienen grupos funcionales para la unión covalente de ETMs. En algunas realizaciones se utilizan grupos de unión para enlazar covalentemente las subunidades a los ETMs. Grupos funcionales preferidos para la unión son grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol, prefiriéndose particularmente grupos aminados. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, es posible una amplia variedad de polímeros de regeneración.

Elementos de enlace apropiados incluyen, pero sin limitarse a éstos, elemento de enlace alquil (incluyendo heteroalquil (incluyendo estructuras de tipo (poli) etilen glicol), elementos de enlace alquil, arialquil substituidos etc. Al igual que anteriormente para los polímeros, los elementos de enlace comprenderán uno o más grupos funcionales para la unión de ETMs, que se realizará tal como apreciarán los expertos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de elementos de enlace horno-o hetero-bifuncionales, tal como es bien conocido (véase catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre elementos de enlace, páginas 155-200).

Polímeros de regeneración apropiados incluyen, pero sin limitarse a éstos, estirenos no funcionalizados, tales como amino estireno, dextranos funcionalizados, y poliamino ácidos. Los polímeros preferidos son poliamino ácidos (poli-D-amino ácidos y pol-L-amino ácidos), tales como polilisina, y siendo particularmente preferidos polímeros que contienen lisina y otros aminoácidos. Otros poliamino ácidos apropiados son el ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, copolímeros de lisina y ácido glutámico o aspártico, copolímeros de lisina con alanina, tirosina, fenilalanina, serina, triptófano, y/o prolina.

En una realización preferida, el elemento de enlace de regeneración comprende un polímero metaloceno, tal como se ha descrito anteriormente.

La unión de los elementos de enlace de regeneración a la primera parte de la sonda de marcado dependerá de la composición del elemento de enlace de regeneración, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Cuando el elemento de enlace de regeneración es ácido nucleico, se forma en general durante la síntesis de la primera parte de la sonda de marcado, con la incorporación de nucleósidos que contienen ETMs si es necesario. Alternativamente, la primera parte de la sonda de marcado y el elemento de enlace de regeneración puede realizarse por separado, y después unirse. Por ejemplo, puede haber una sección de solapamiento de complementariedad, formando una sección de ácido nucleico de doble cadena que pueda entonces reticularse químicamente, por ejemplo utilizando psoralen como es conocido en la técnica.

Cuando se utilizan elementos de enlace de regeneración ácidos no nucleicos, la unión del elemento de enlace/polímero del elemento de enlace de regeneración se realizará en general utilizando técnicas químicas estándar, tales como apreciarán los expertos en la técnica. Por ejemplo, si se utilizan elementos de enlace basados en alquil, la unión puede ser similar al enlace de aislantes a ácidos nucleicos.

Además, es posible tener elementos de enlace de regeneración que sean mezclas de ácidos nucleicos y ácidos no nucleicos, en forma linear (es decir segmentos de ácido nucleico enlazados junto con elementos de enlace alquil) o bien en formas ramificadas (ácidos nucleicos con "ramificaciones" alquil que pueden contener ETMs y pueden ramificarse adicionalmente).

En una realización preferida, es la propia secuencia objetivo que lleva ETMs, en lugar del elemento de enlace de regeneración de una sonda de marcado.

De este modo, pueden utilizarse electrodos que incluyen monocapas que comprenden oligómeros conductores, que en general incluyen sondas de captura, y secuencias objetivo o bien sondas de marcado que comprenden elementos de enlace de regeneración que contienen ETMs. Las sondas se diseñan para que sean complementarias a una secuencia objetivo (la secuencia objetivo de la muestra o bien las otras secuencias de sonda, tal como se describe más adelante), de manera que se produce la hibridación de la secuencia objetivo y las sondas. Tal como se describe más adelante, no es necesario que la complementariedad sea perfecta; puede haber cualquier número de desequilibrios de pares de bases que interferirá en la hibridación entre la secuencia objetivo y los ácidos nucleicos de cadena única de la presente invención. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede producirse hibridación incluso bajo las condiciones de hibridación menos rigurosas, la secuencia no es una secuencia objetivo complementaria. Así, "substancialmente complementario" significa aquí que las sondas son suficientemente complementarias a las secuencias objetivo para hibridizar bajo condiciones normales de reacción.

Puede utilizarse una variedad de condiciones de hibridación en la presente invención, incluyendo condiciones de alta, moderada y baja rigurosidad; véase por ejemplo Maniatis y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, 1989, y *Short Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, y otros. Las condiciones de hibridación pueden también variar cuando una se utiliza parte principal dorsal no fónica, es decir, PNA, como es conocido en la técnica. Además, pueden añadirse agentes de reticulación después del enlace objetivo para la reticulación, es decir, enlace covalente, de las dos cadenas del compuesto de hibridación.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los sistemas utilizados en la invención pueden adquirir una gran cantidad de configuraciones diferentes. En general existen tres tipos de sistemas que pueden utilizarse: (1) sistemas en los cuales la propia secuencia objetivo se marca con ETMs; (2) sistemas en los cuales la sonda de marcado se hibridiza directamente a las secuencias objetivo; y (3) sistemas en los cuales la sonda de marcado se hibridiza indirectamente a las secuencias objetivo, por ejemplo con el uso de sondas amplificadoras.

En general, para todos los sistemas que aquí se describen, tanto para ácidos nucleicos como para otros analitos objetivo, la invención dispone compuestos de análisis que mínimamente comprenden un analito objetivo y un ligando de enlace de captura. Para las secuencias objetivo de ácidos nucleicos, "compuesto de análisis" significa aquí la recogida de compuestos de hibridación que comprenden ácidos nucleicos, incluyendo sondas y objetivos, que contiene

por lo menos una etiqueta (preferiblemente un ETM en los procedimientos electrónicos de la presente invención) y permite así la detección. La composición del compuesto de análisis depende del uso del distinto componente de la sonda que aquí se describe. Los compuestos de análisis pueden también incluir sondas de marcado, sondas de prolongación de captura, sondas de prolongación de marcado, y sondas amplificadoras, tal como se describe aquí en función de la configuración utilizada.

Los análisis se ejecutan en general bajo unas condiciones de rigurosidad que permiten la formación del compuesto de hibridación de la sonda de marcado solamente en presencia del objetivo. La rigurosidad puede controlarse alterando un parámetro de etapa que es una variable termodinámica, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, temperatura, concentración de formamida, concentración de sal, pH concentración sal caotrópica, concentración disolvente orgánico, etc.

Estos parámetros también pueden utilizarse para controlar el enlace no específico, tal como se describe en general en la patente americana nº 5.681.697. De este modo, puede ser deseable realizar ciertas etapas en unas condiciones de mayor rigurosidad; por ejemplo, cuando se realiza una etapa de hibridación inicial entre la secuencia objetivo y la sonda prolongadora de marcado y la prolongadora de captura. La ejecución de esta etapa en condiciones que favorecen el enlace específico puede permitir la reducción del enlace no específico.

Las reacciones expuestas aquí pueden conseguirse de varias maneras, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Los componentes de reacción pueden añadirse simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier orden, con las realizaciones preferidas que se exponen más adelante abajo. Además, la reacción puede incluir una variedad de otros reactivos que pueden incluirse en el análisis. Éstos incluyen reactivos tales como sales, búferes, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc. que pueden utilizarse para facilitar una hibridación y detección óptimas, y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. También pueden utilizarse reactivos que por lo demás mejoren manera la eficacia del análisis, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc., dependiendo de los procedimientos de preparación de la muestra y de la pureza del objetivo.

Por consiguiente, en los cartuchos de la invención se incorporan biochips, con ligandos de enlace de captura unidos covalentemente (por ejemplo, sondas de captura) y después se montan en las estaciones de los dispositivos de multiplexación de la invención para los análisis que se ejecutan.

En una realización preferida, los biochips se acoplan al resto del cartucho de una amplia variedad de maneras. En una realización, el biochip se realiza directamente en una parte del cartucho y se incorpora así en el sistema. Alternativamente, tal como se describe aquí, cuando el biochip se formula en un sustrato distinto que el resto del cartucho, hay una variedad de mecanismos de unión que pueden utilizarse, dependiendo de la composición y configuración de los dos sustratos. Por ejemplo, cuando el biochip se formula en el material de placa de circuito impreso, puede haber “pivotes” o “varillas” que se insertan en unos orificios, con una posterior fusión (por ejemplo, utilizando disolventes o calor). De manera similar, puede realizarse una fusión por calentamiento superficie-a-superficie o un disolvente. Alternativamente, pueden utilizarse adhesivos para pegar los dos entre sí. De manera similar, estas técnicas pueden utilizarse con componentes de sellado adicionales, tales como juntas. Alternativamente, el biochip puede “encajar a presión” en el cartucho, utilizando componentes tales como dispositivos que de ajuste a presión de plástico moldeado.

Pueden disponerse soportes para los cartuchos para cargarlos con muestras, antes de introducir los cartuchos en las estaciones del dispositivo. En general, tal como apreciarán los expertos en la técnica, los soportes pueden configurarse de una amplia variedad de maneras, dependiendo de la configuración de los cartuchos y de los casquillos, si están presentes. Por ejemplo, se prefieren soportes que alineen los cartuchos de tal manera que puedan utilizarse útiles de manipulación de reactivos estándar. Tal como muestran las figuras, se prefieren soportes que permiten el uso de pipetas multicanal o sistemas robóticos basados en formatos de 96 cavidades. Los soportes pueden también incluir tapas, colocadas para un uso fácil, o reactivos y/o componentes del búfer. Los soportes se fabrican en general de materiales resistentes a los productos químicos y reactivos utilizados en los análisis.

Los cartuchos de la invención están diseñados para insertarse en estaciones de un dispositivo de multiplexación. Tal como apreciarán los expertos en la técnica y tal como se describe más adelante, los dispositivos de la invención pueden tomar una amplia variedad de conformaciones, dependiendo de los componentes deseados, del uso final, el tamaño deseado del instrumento en última instancia, etc.

Cada dispositivo de multiplexación tiene un número de estaciones distintas en las cuales se inserta el cartucho. El par cartucho/estación puede configurarse de una variedad de maneras para incluir el uso de elementos de bloqueo “a presión”, con una asimetría tal que el cartucho solamente encaje en el dispositivo en una orientación particular, estaciones de tamaño distinto para cartuchos de diferente tamaño (por ejemplo, una rara cantidad de pruebas puede requerir una manipulación especial y las máquinas pueden diseñarse con estaciones especiales para estas pruebas). Esta realización puede utilizar también sensores electrónicos que detecten la presencia o ausencia de un cartucho, o si el cartucho está colocado correctamente.

En general el número de estaciones por dispositivo variará con el uso deseado. Las realizaciones preferidas utilizan por lo menos dos o tres estaciones, prefiriéndose por lo menos 5-100, y prefiriéndose particularmente aproximadamente 25-50, prefiriéndose especialmente 48. En general, los dispositivos se presentan como una matriz, con columnas y filas de estaciones.

Tal como se describe aquí, cada estación puede tener un número de componentes funcionales distintos, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, interconexiones a componentes electrónicos, a controladores térmicos, a sistemas de señalización, a sensores para la detección de fugas, pantallas alfanuméricas, y detectores.

- 5 Como que el biochip se basa en electrodos para la detección, las estaciones deben comprender interconexiones de emparejamiento para el biochip, para permitir una comunicación electrónica entre el chip y el dispositivo.

En una realización preferida, cada estación comprende un regulador térmico individual. “Regulador térmico” o “controlador térmico” en este contexto incluye elementos que pueden tanto calentar como enfriar los cartuchos y de este modo las muestras en los cartuchos también. En general, dado el tamaño y la función de los sistemas, es deseable utilizar controladores térmicos pequeños y rápidos. Hay una amplia variedad de controladores térmicos conocidos apropiados, incluyendo los sistemas Peltier.

En general el controlador térmico debe ser capaz de calentar/enfriar muestras de aproximadamente 0 a 1000°C y a una velocidad de 0,01°C/seg. A 10°C/seg.

Debe observarse que el controlador térmico puede utilizarse después de un análisis para destruir el material biológico en el cartucho. Es decir, es deseable con frecuencia minimizar la exposición de trabajadores de asistencia sanitaria y técnicos de laboratorio a muestras potencialmente peligrosas, y facilitar el desecho de estos materiales. El controlador térmico puede utilizarse para calentar el residuo de muestra a temperaturas extremas durante un determinado período del tiempo para matar o destruir la muestra. Además, puede también utilizarse calentamiento junto con la adición de otros reactivos generalmente fuertes (ácido fuerte, base fuerte, etc.). Además, en algunas realizaciones, se utilizan antenas de RF para generar plasma que se bombea a la cámara tras la evacuación de fluido para destruir todo el material biológico.

En una realización, en lugar de que cada estación comprenda un regulador térmico individual, grupos de estaciones (por ejemplo, filas o columnas) comparten un regulador térmico. En una realización alternativa, el dispositivo de multiplexación comprende un único regulador térmico.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen una “ranura de estado”, donde puede ponerse un cartucho y ser leído directamente en una estación, en lugar de funcionar como una secuencia. En general, la temperatura en esta estación puede preestablecerse.

En una realización preferida, las estaciones del dispositivo incluyen sistemas de señalización. Por ejemplo, en cada estación puede utilizarse un sistema de luces, en particular luces de color, para indicar el estado del cartucho o del análisis: cartucho presente o ausente, análisis en progreso, error, análisis terminado, etc. Además, la configuración de las luces pueden ser el código (en particular para personas ciegas); dos luces para cartucho insertado, luces que destellan para análisis acabado, etc. De nuevo, estos sistemas de señalización pueden estar en cada estación o en grupos de estaciones.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen una pantalla alfanumérica para permitir visualizar los datos u otra información. Por ejemplo, esta pantalla puede utilizarse en combinación con un lector de código de barras, que se describe más adelante, para mostrar al operador qué cartucho fue insertado (por ejemplo, panel VIH, panel VHC, panel de enfermedad infecciosa, panel SNP de cáncer de pecho, etc.), u otros datos relativos al cartucho (número de lote o serie, etc.). Además, la pantalla puede utilizarse para ofrecer al operador los resultados de la prueba, etc. En cuanto a los sistemas de señalización, en cada estación puede haber una pantalla, o puede haber pantallas para grupos de estaciones o para todo el dispositivo.

En una realización preferida, cada estación del dispositivo puede configurarse para permitir electroforesis o dielectroforesis en el biochip. Es decir, al igual que se describe en general en WO99/67425, puede haber electrodos o componentes electrónicos adicionales para permitir la concentración y/o el movimiento de analitos a la superficie de la matriz.

De manera similar, tal como se describe en WO99/67425 en el biochip puede haber contenidos electrodos de electroforesis o dielectroforesis.

En una realización preferida, el dispositivo (o alternativamente, cada estación) comprende un lector de código de barras para leer un código de barras correspondiente en el cartucho. Estos códigos de barras pueden utilizarse para una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, identificación de la muestra (por ejemplo, número o código de paciente), la prueba que se está realizando, el número de serie del chip, información de calibración, protocolos de análisis que incluyen la duración de ciclo, requisitos de procesamiento de la señal, etc.

El dispositivo de la figura 11 puede tener:

- 65 una hoja de “referencia” por código de barras, guardada en bandeja bajo la unidad, con protocolos de códigos de barras, identificaciones de cavidades y ranuras por códigos de barras, órdenes por códigos de barras (por ejemplo, “cancelar”, “hecho”, etc.).

ES 2 278 757 T3

Lector de código de barras estándar (preferiblemente con un decodificador incorporado), alojado en la bandeja (por lo tanto oculto cuando no se está utilizando).

Interfaz serie (RS-232/485) (preferido), o “decodificador de teclado” Soporte multi código (código 39, código 128, etc.).

Código de barras en portador de chip (1 código por “paquete de 8”), prueba de identificación, serie, etc.

Etiquetas desprendibles, con el mismo código que en el portador, con cada “paquete de 8”.

Escenario de utilización del código de barras:

El usuario llena el “paquete de 8” (todos los 8, o parcialmente) de una placa de 96 cavidades, o de recipientes de muestra individuales (tubos PCR, *Vacutainer*, etc.).

Retira la bandeja (con hoja de referencia de código de barras) y coge el lector.

Explora código de “inicio”.

Explora código de protocolo de la hoja (permanecerá en efecto hasta que explore “hecho”).

Explora código de chip del portador (permanecerá en efecto hasta que explore “hecho”).

Para cada cartucho, el usuario insertará el cartucho en una ranura abierta. La unidad detecta automáticamente un nuevo chip.

Explora la identificación de la muestra explorando el código de barras de la placa de 96 cavidades de la placa y el código de cavidad de la hoja

o bien explorando una única identificación de la muestra del recipiente o bien explorando “ninguna identificación” de la hoja de referencia.

Explora código “hecho”. El protocolo puede comenzar ahora en estos cartuchos.

Beneficios del concepto de código de barras:

Sin entrada por teclado (la configuración de toda la rutina puede introducirse por código de barras).

Todas las entradas de rutinas se realizan mientras se está delante de la unidad (no hay que ir hacia delante y hacia atrás entre el ordenador y el hidra).

Todas las entradas de código de barras se realizan desde una superficie pequeña y plana delante de la unidad.

No es necesario marcar cada chip o cada ranura (lo cual comprometería la estética).

Se utiliza un lector de código de barras pequeño y no molesto, oculto cuando no se utiliza.

Es flexible respecto al recipiente de la muestra (tubo, placa de 96 cavidades, etc.), la utilización del chip (por fila de 8, o por chip individual), y procedimiento de codificación de barras.

Además, el código de barras puede utilizarse para controlar el instrumento. Por ejemplo, el control del instrumento puede ser mediante el uso de un teclado, un ratón o un lector de código de barras. Puede haber códigos de barras en los cartuchos para indicar la identidad del chip, pero también en una tarjeta a explorar para iniciar el análisis, detener el análisis, descargar los datos, etc. En una realización preferida, la tarjeta de instrucciones de código de barras se encuentra en el cajón del dispositivo, descrito aquí.

En una realización preferida, cada estación comprende un lector de chips de memoria. De nuevo, en esta realización, cada cartucho comprende un chip de memoria, que puede tener información de la muestra (por ejemplo, número o código de paciente), la prueba que se está realizando, el número de lote del chip, información de calibración, protocolos de análisis, etc.), o qué muestra la interfaz de usuario (por ejemplo, no un número sino “VIH positivo”), etc.

En una realización preferida, cada estación comprende un grabador de chips de memoria para añadir información al cartucho, tal como qué prueba se realizó, la fecha, los resultados, etc.

En una realización preferida, cada estación tiene componentes de encriptación en combinación con el cartucho, para encriptar información del paciente. Es decir, hay una preocupación cada vez mayor con respecto a la confidencialidad de la información del paciente, en particular respecto a cuestiones de trabajo y los seguros. Así, por ejemplo,

en algunas realizaciones, los dispositivos de la invención no permitirán que el operario conozca los resultados de la prueba. En su lugar, la salida será una confirmación de que la prueba fue realizada correctamente y una respuesta viable recibida, pero nada relativo a la prueba real que se está realizando o los resultados. Los propios resultados de la prueba, además de la información del paciente, se pueden encriptar y enviar a un lugar remoto tal como se describe a continuación para el procesamiento, descryptado o almacenamiento.

En una realización preferida, el dispositivo puede incluir cajones o cámaras de almacenamiento para permitir el almacenamiento de reactivos, cartuchos, tapas, soportes, pipetas, etc.

En una realización preferida, por ejemplo, cuando se utilizan colorantes de fluorescencia en los análisis, se emplean lectores fluorescentes. En una realización, el dispositivo comprende un lector en cada estación. Alternativamente, en una realización preferida, el dispositivo comprende un solo lector que se desplaza, moviendo el lector o bien moviendo las estaciones hacia un único lector dentro del dispositivo. De este modo, en algunas realizaciones, hay motores, poleas, cables, etc. para permitir el movimiento de estaciones, cartuchos o lectores.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención comprenden componentes de manipulación de líquidos, que incluyen componentes para cargar y descargar líquidos en cada estación o grupos de estaciones. Los sistemas de manipulación de líquidos pueden incluir sistemas robóticos que comprenden cualquier número de componentes. Además, cualquiera o todas las etapas que aquí se describen pueden automatizarse; así, por ejemplo, los sistemas pueden estar total o parcialmente automatizados.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, hay una amplia variedad de componentes que pueden utilizarse, que incluyen, pero sin limitarse a éstos, uno o más brazos de robot; manipuladores de placas para el posicionamiento de microplacas; soportes con cartuchos y/o tapas; manipuladores automatizados de tapas o cierres para quitar y substituir las tapas para las cavidades en placas de contaminación no cruzada; conjuntos de puntas para distribución de muestras con puntas desechables; conjuntos de puntas lavables para la distribución de muestras; bloques de carga de 96 cavidades; soportes para reactivos enfriados; posiciones de pipetas de placas microtituladoras (opcionalmente enfriadas); torres de apilado para placas y puntas; y sistemas informáticos.

Los sistemas completamente robóticos o microfluídicos incluyen la manipulación automática de líquidos, partículas, células, organismos automatizados incluyendo pipeteado de alto rendimiento para realizar todas las etapas de las aplicaciones de exploración. Esto incluye manipulaciones de líquido, partícula, célula, y organismos tales como aspiración, distribución, mezcla, dilución, lavado, transferencias volumétricas precisas; recuperación, y desecho de puntas de pipeta; y pipeteado repetitivo de volúmenes idénticos para suministros múltiples a partir de una única aspiración de muestra. Estas manipulaciones son transferencias de contaminación cruzada libre de líquidos, partículas, células, y organismos. Este instrumento realiza un replicado automatizado de muestras de microplacas a filtros, membranas, y/o placas secundarias, transferencias de alta densidad, diluciones en serie de placas completas, y funcionamiento de alta capacidad.

En una realización preferida, se utilizan partículas químicamente derivatizadas, placas, cartuchos, tubos, partículas magnéticas, u otra matriz en fase sólida con especificidad a los componentes de análisis. Las superficies de enlace de microplacas, tubos o cualquier matriz en fase sólida incluyen superficies no polares, superficies altamente polares, recubrimiento dextrán modificado para favorecer el enlace covalente, recubrimiento de anticuerpos, un medio de afinidad a proteínas o péptidos de fusión de enlace, proteínas fijas a la superficie tales como proteína recombinante A o G, resinas o recubrimientos de nucleótido, y otra matriz de afinidad son útiles en esta invención.

En una realización preferida, plataformas para placas de múltiples cavidades, múltiples tubos, soportes, cartuchos, minitubos, placas de cavidades profundas, tubos de microfuga, crioviales, placas de cavidades cuadradas, filtros, chips, fibras ópticas, perlas, y otras matrices plataforma en fase sólida con varios volúmenes se alojan en una plataforma modular ampliable para una capacidad adicional. Esta plataforma modular incluye un agitador orbital de velocidad variable, y plataformas de trabajo de múltiples posiciones para muestras fuente, dilución de muestra y reactivo, placas de análisis, depósitos de muestra y reactivo, puntas de pipeta, y una estación de lavado activa.

En una realización preferida, se utilizan sistemas termocicladores y termoreguladores para estabilizar la temperatura de los intercambiadores de calor tales como bloques o plataformas controlados para proporcionar un control preciso de la temperatura de las muestras de incubación de 4°C a 100°C; esto es además o en lugar de los controladores térmicos de la estación.

En una realización preferida, unos cabezales de pipeta intercambiables (solos o multicanal) con sondas magnéticas únicas o múltiples, sondas de afinidad, o pipetas manipulan robóticamente líquidos, partículas, células, y organismos. Separadores o plataformas magnéticos de múltiples cavidades o múltiples tubos manipulan líquidos, partículas, células, y organismos en formatos de muestra únicos o múltiples.

En algunas realizaciones, por ejemplo cuando no se realiza la detección electrónica, la instrumentación incluirá un detector, que puede ser una amplia variedad de diversos detectores, dependiendo de las etiquetas y el análisis. En una realización preferida, detectores útiles incluyen un(os) microscopio(s) con los canales múltiples de fluorescencia; lectores de placa para proporcionar una detección fluorescente, ultravioleta y visible espectrofotométrica con un punto final de longitud de onda única y dual y capacidad cinética, transferencia de energía de resonancia de fluorescen-

cia (FRET), luminiscencia, temple, excitación por dos fotones, y redistribución de la intensidad; cámaras CCD para capturar y transformar datos e imágenes en formatos cuantificables; y una estación de trabajo informática.

Estos instrumentos pueden instalarse en un flujo laminar estéril o extractor de gases, o son sistemas encerrados, autónomos, para el cultivo de células y la transformación en placas de múltiples cavidades o tubos y para operaciones peligrosas. Las células vivas se cultivarán bajo condiciones de cultivo controladas, con controles para la temperatura, humedad, y gas para series de tiempo de análisis de células vivas. La transformación automatizada de células y recogedores de colonias automatizados facilitará un rápido examen de células deseadas.

Pueden utilizarse formatos de citometría de flujo o electroforesis capilar para la captura individual de perlas magnéticas y otros, partículas, células, y organismos.

El hardware y el software flexible permiten la adaptabilidad del instrumento para múltiples usos. Los módulos de programa de software permiten la creación, modificación, y ejecución de métodos. Los módulos del sistema de diagnóstico permiten la alineación de los instrumentos, corrección de conexiones, y operaciones motoras. Las herramientas, material de laboratorio, y patrones de transferencia de líquidos, partículas, células y organismos adaptados permiten llevar a cabo diversas aplicaciones. La base de datos permite el almacenamiento de métodos y parámetros. Las interfaces robóticas e informáticas permiten la comunicación entre los instrumentos.

En una realización preferida, el aparato robótico incluye una unidad de proceso central que se comunica con una memoria y un grupo de dispositivos de entrada/salida (por ejemplo, teclado, ratón, monitor, impresora, etc.) a través de un bus. De nuevo, tal como se describe a continuación, esto puede ser adicionalmente o en lugar de la CPU para los dispositivos de multiplexación de la invención. Es conocido en la técnica la interacción general entre una unidad de proceso central, una memoria, dispositivos de entrada-salida, y un bus. Así, en la memoria de CPU se almacena una variedad de distintos procedimientos, dependiendo de los experimentos a realizar.

Estos sistemas de manipulación de fluidos robóticos pueden utilizar cualquier número de reactivo distintos, incluyendo búferes, reactivos, muestras, lavados, componentes de análisis tales como sondas de marcado, etc.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen sensores para la detección de fugas. Estos son en general de dos tipos; mediciones electrónicas de resistencia o bien inclusión en el análisis de etiquetas ópticas o detectables. Esto puede ser particularmente importante en algunas realizaciones en las que se analizan materiales biológicos peligrosos o productos químicos cáusticos.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención comprenden una placa de dispositivo que puede utilizarse para realizar una variedad de análisis, incluyendo procesamiento de señales, bloqueo digital, que comprende circuitos lógicos, etc., tal como se describe aquí.

En una realización preferida, los sistemas de la invención comprenden un procesador (CPU). Éste puede encontrarse físicamente contenido en el interior del propio aparato, puede conectarse a través de un cable, o puede conectarse utilizando tecnología inalámbrica. Puede haber uno o más por dispositivo.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen un dispositivo de localización, tal como sistema de localización global (GPS) tal como es conocido en la técnica. Esto puede encontrar particular uso en aplicaciones de agricultura y guerra biológica, así como el diagnóstico remoto de problemas.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen componentes para la comunicación de datos, resultados de análisis, información del paciente, etc. a un lugar fuera del dispositivo. Así, por ejemplo, puede incluirse uno o más módems (incluyendo tanto módems de teléfono como cable módems), tarjetas de Internet, puertos de infrarrojo, etc. en los dispositivos para permitir la transmisión de datos y otra información relevante (información de código de barras, condiciones y protocolos de análisis, identificación del operario, fecha y hora, etc.) a una posición remota tal como un almacén de información general, hospitales, consultorios médicos, centros de epidemiología, farmacias, centros gubernamentales, compañías de seguros, etc.

En una realización preferida, los dispositivos de la invención incluyen componentes para sistemas de comunicación inalámbrica, para permitir esta transmisión de datos en ausencia de conexiones de comunicaciones físicas o electrónicas. Además, pueden incluirse receptores inalámbricos.

En los cartuchos de la invención se introducen muestras (muestras puras o bien muestras tratadas (por ejemplo amplificadas, purificadas, etc.), se ponen tapas opcionales, y se introducen los cartuchos en una estación del dispositivo. Se añaden reactivos adicionales si es necesario, y se forman los compuestos de análisis.

REIVINDICACIONES

1. Cartucho que comprende un biochip, comprendiendo el cartucho:

a) una cámara de reacción que comprende:

i) un sustrato que comprende una matriz de electrodos, comprendiendo cada uno:

A) una monocapa autoensamblada; y

B) un ligando de enlace de captura;

ii) un puerto de entrada para la introducción de reactivo en el que el puerto de entrada permite la introducción de reactivos en la parte inferior de la cámara de reacción, comprendiendo la cámara de reacción, además, un puerto de salida en la parte superior de la cámara de reacción para minimizar la introducción o retención de burbujas de aire tras la introducción de reactivos; e

b) interconexiones para permitir la conexión eléctrica de dichos electrodos a un procesador.

2. Cartucho según la reivindicación 1, incluyendo dicho puerto de salida una membrana semi-permeable.

3. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dichos ligandos de enlace de captura comprenden ácidos nucleicos.

4. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha cámara de reacción comprende además una junta para retener fluido en contacto con dicha matriz.

5. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha cámara de reacción comprende además un puerto de salida.

6. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha matriz se encuentra en una superficie de dicho sustrato.

7. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dos superficies de dicho sustrato comprenden cada una una matriz.

8. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una tapa que incluye por lo menos una cavidad de almacenamiento que comprende reactivos de análisis.

9. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicho puerto de entrada incluye una válvula que comprende una membrana semi-permeable.

10. Cartucho según la reivindicación 2, en el que dicha membrana semi-permeable permite preferencialmente el escape de gas y retiene el fluido de muestra.

11. Cartucho según la reivindicación 2, en el que dicha membrana semi-permeable comprende teflón.

12. Cartucho según la reivindicación 2 o la reivindicación 9, en el que dicha membrana semi-permeable comprende Gortex®.

13. Cartucho según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dichos ligandos de enlace de captura comprenden proteínas.

14. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicho puerto conduce a una cavidad de almacenamiento de residuos o a una superficie exterior del chip o cartucho.

15. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicho puerto de salida conduce de nuevo a dicho puerto de entrada.

16. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicha cámara de reacción está configurada para permitir el mezclado de una muestra.

17. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicho puerto de entrada comprende, además, por lo menos un canal situado para maximizar el mezclado de dicha muestra.

18. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicha cámara de reacción comprende, además, por lo menos un aliviadero situado para maximizar el mezclado de dicha muestra.

ES 2 278 757 T3

19. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicha monocapa autoensamblada comprende un aislante.

20. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicha monocapa autoensamblada comprende un oligómero conductor.

21. Cartucho según la reivindicación 1, en el que por lo menos uno de dichos electrodos comprende oro.

22. Cartucho según la reivindicación 21, en el que dicha monocapa autoensamblada comprende una especie que forma monocapas que contienen tiol.

23. Cartucho según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato comprende una placa de circuito impreso.

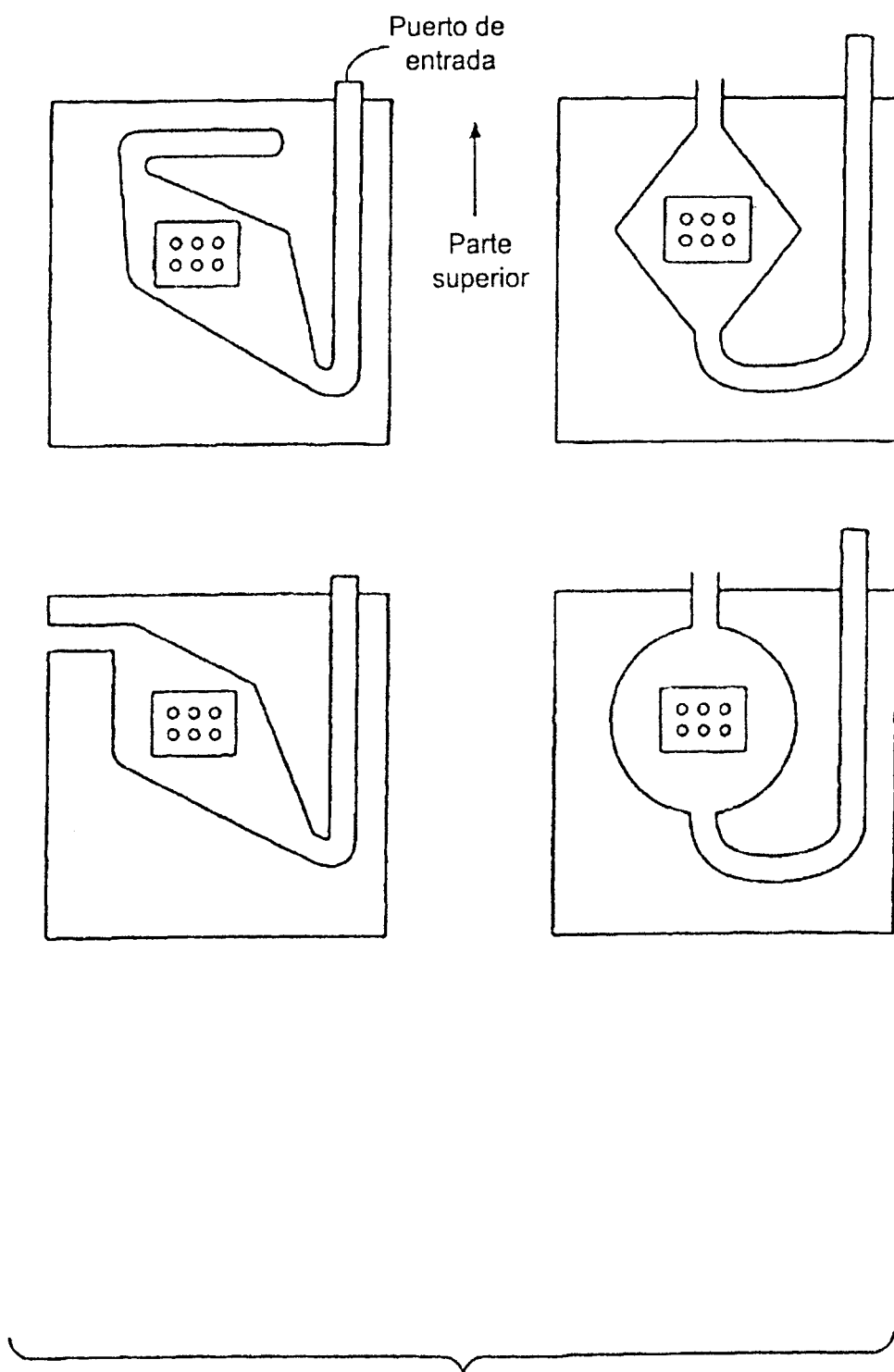
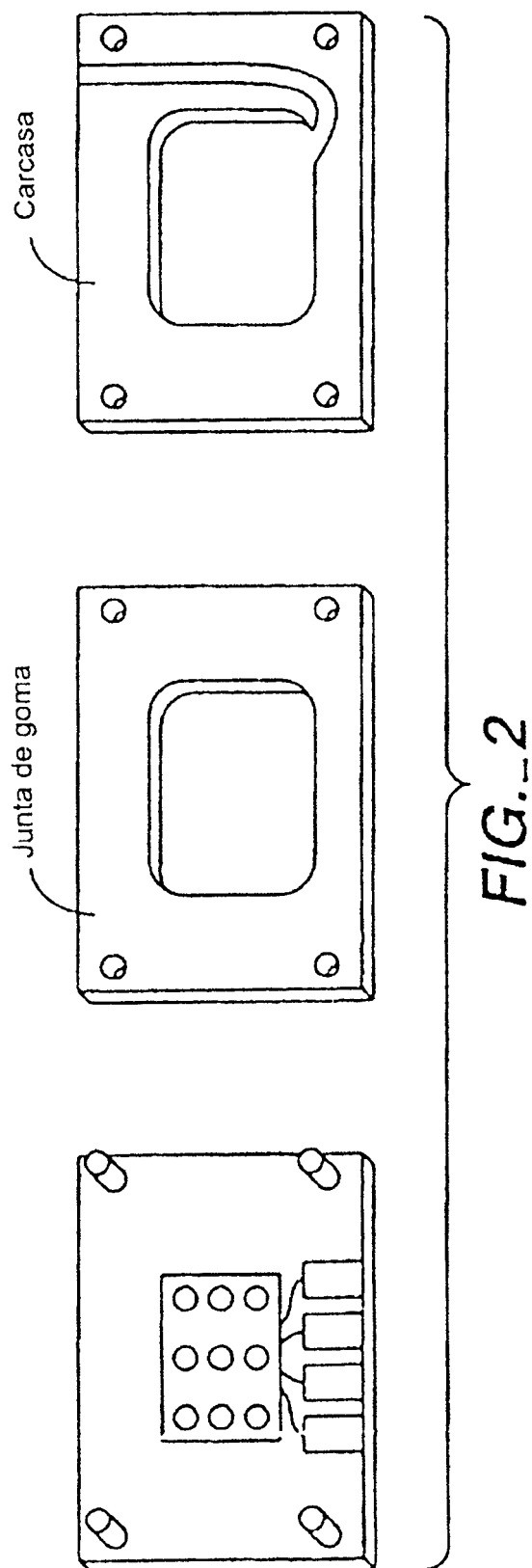


FIG._1



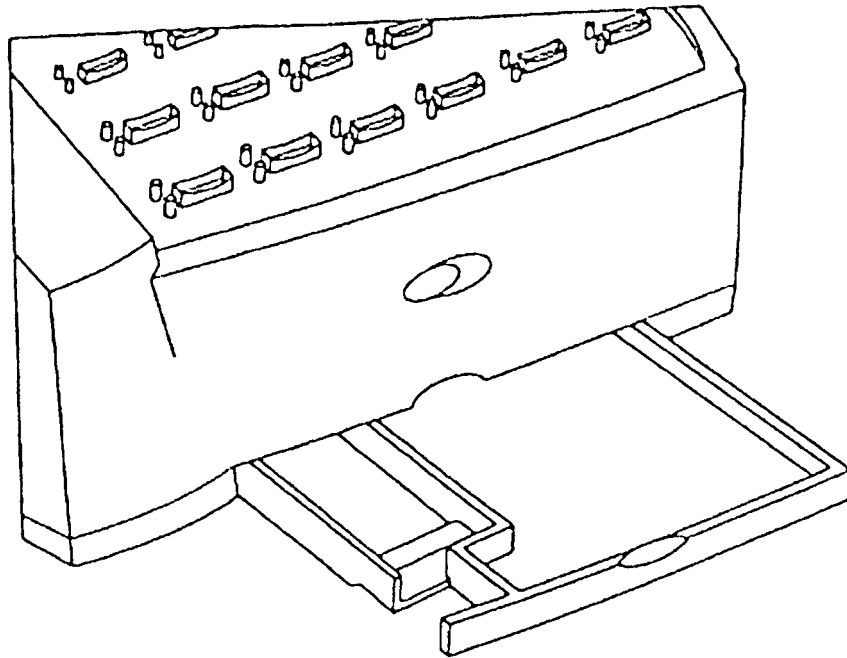


FIG. 3A

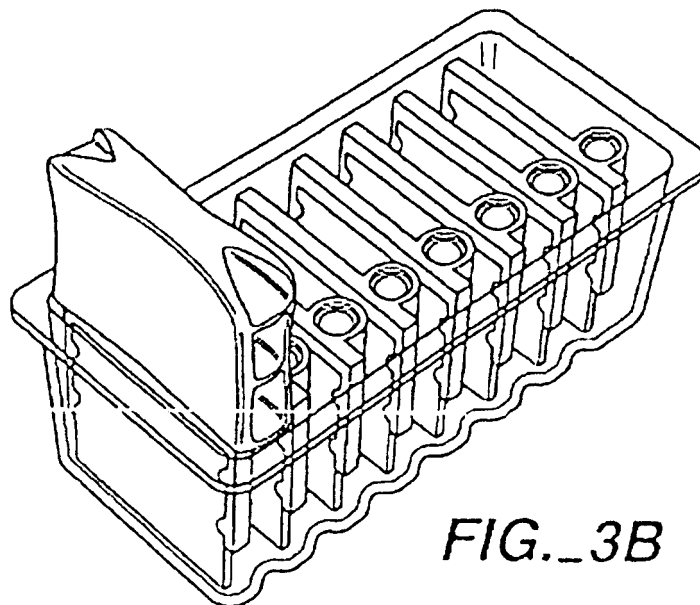


FIG. 3B

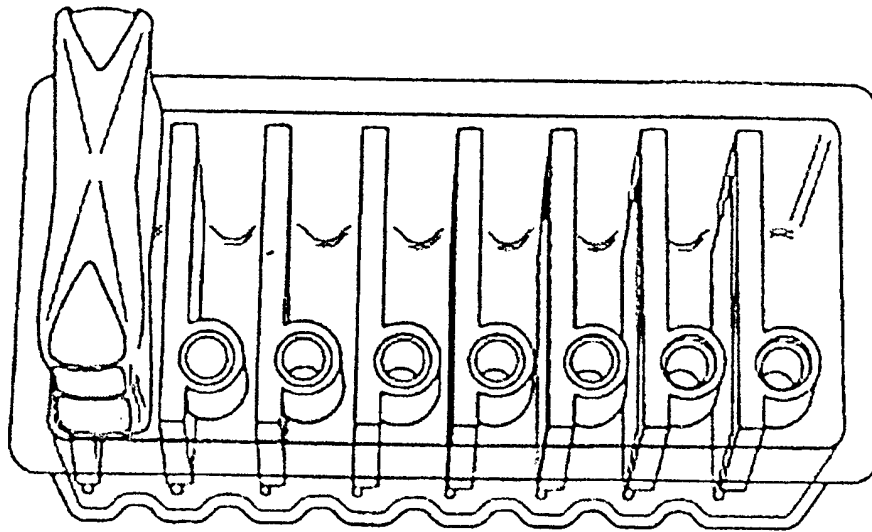


FIG._3C

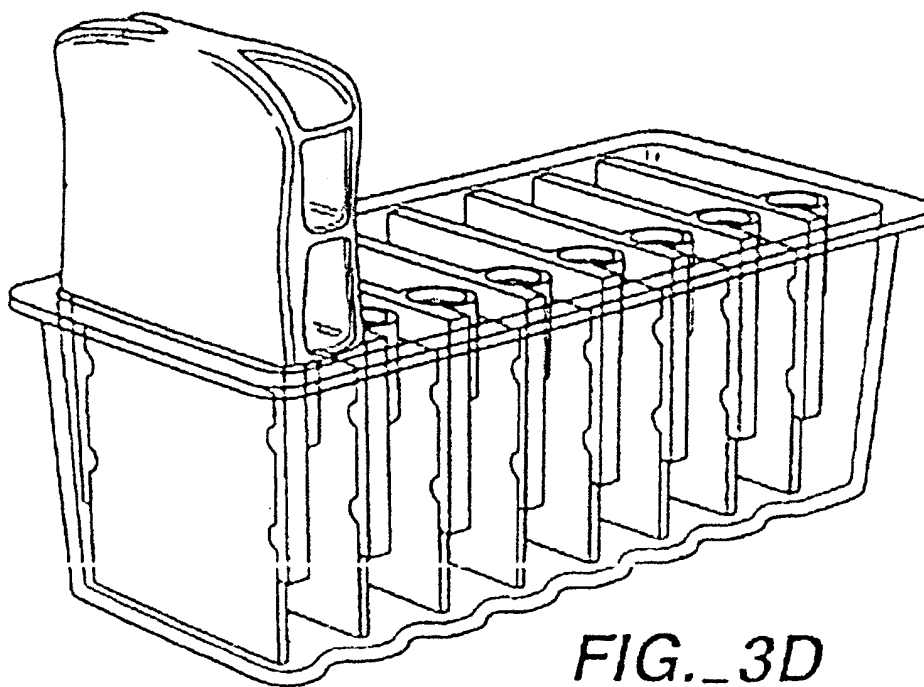


FIG._3D

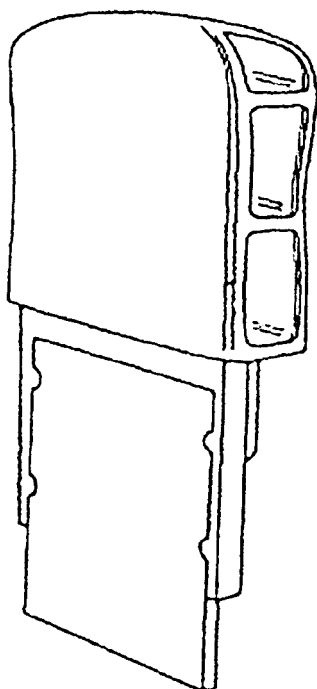


FIG. 3E

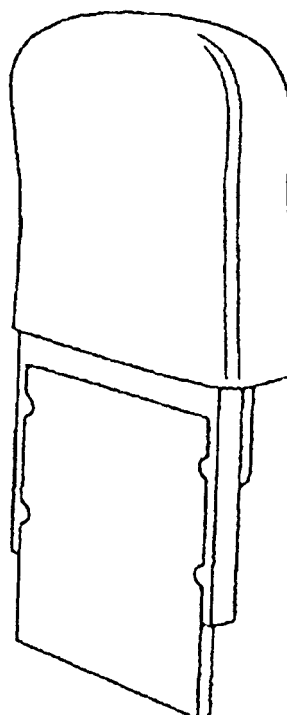


FIG. 3F

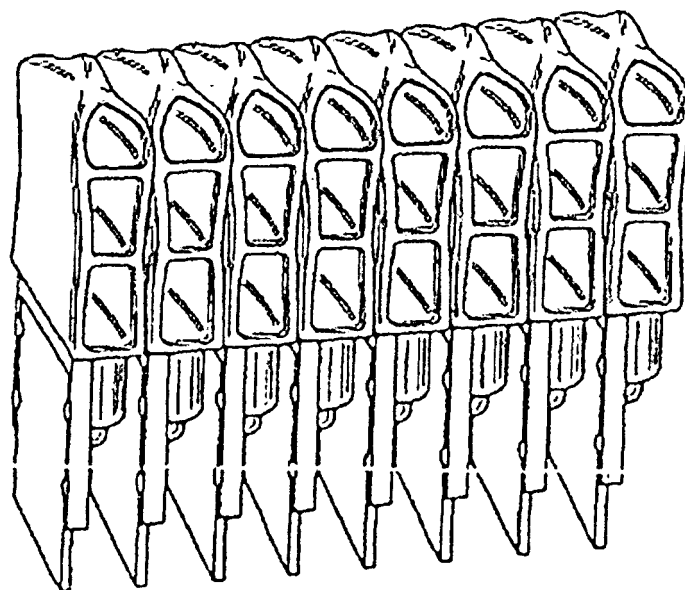


FIG. 3G

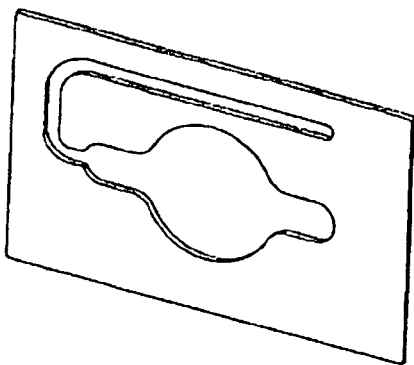


FIG._4A

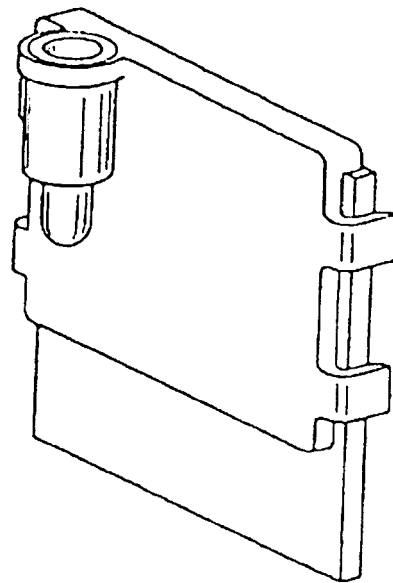


FIG._4B

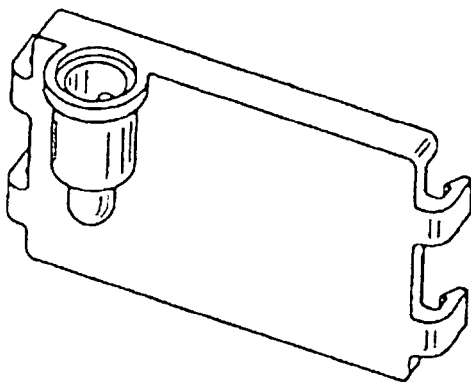


FIG._4C

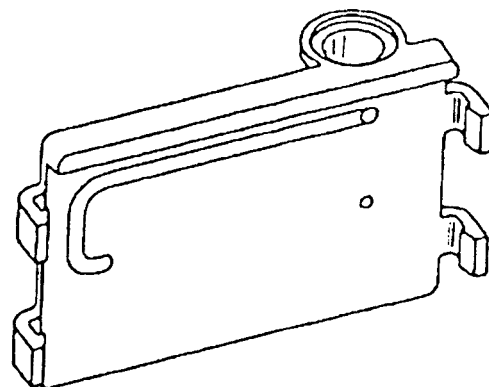
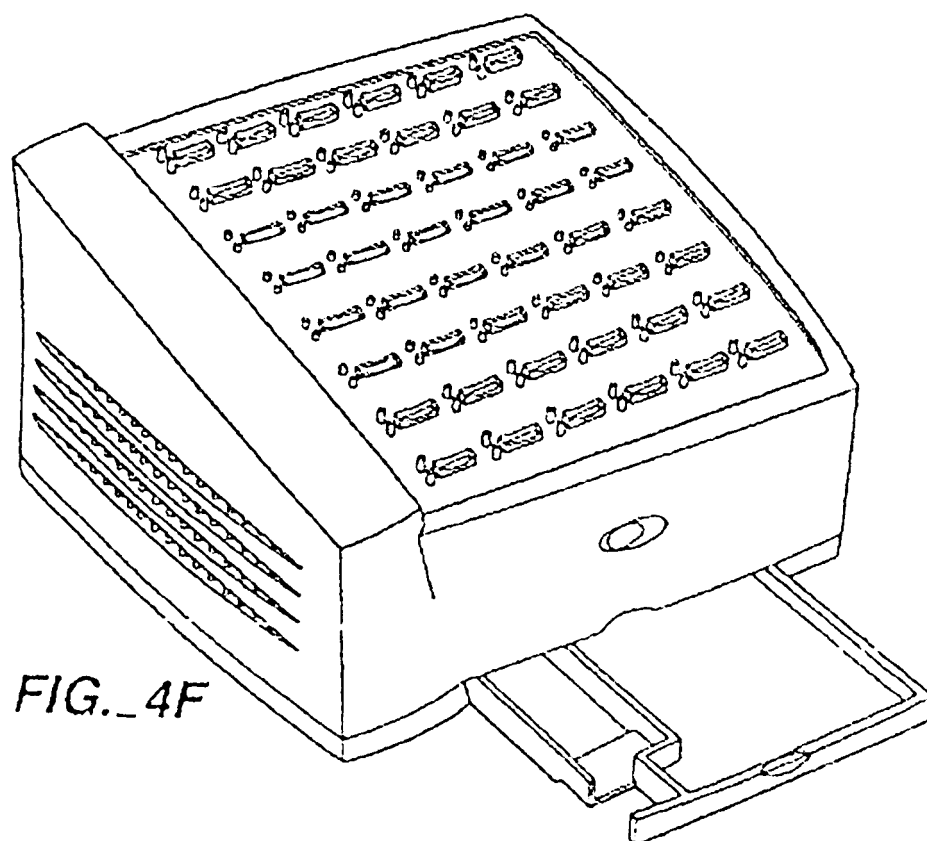
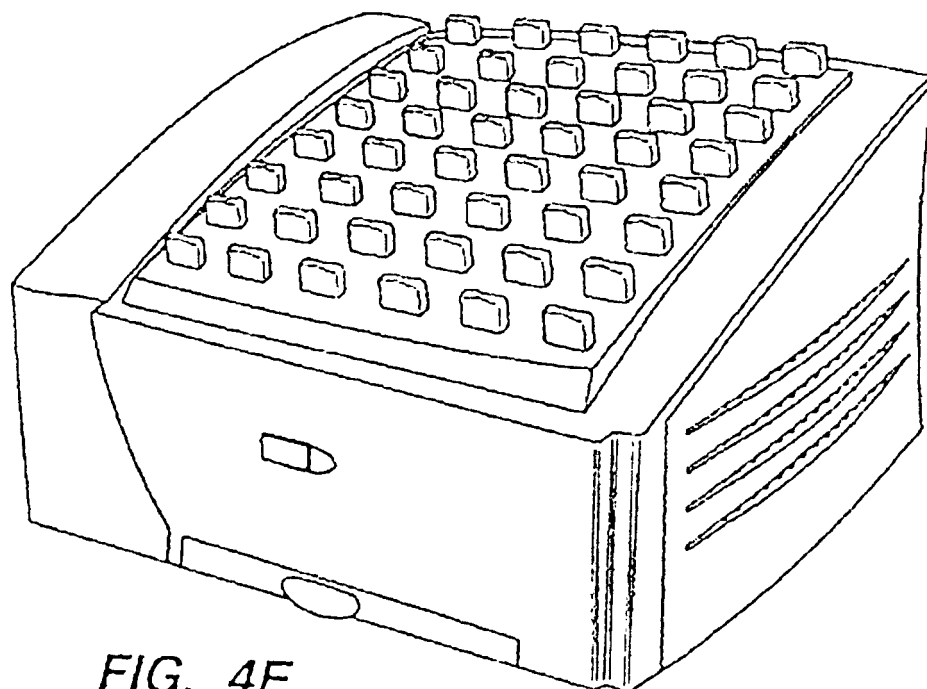
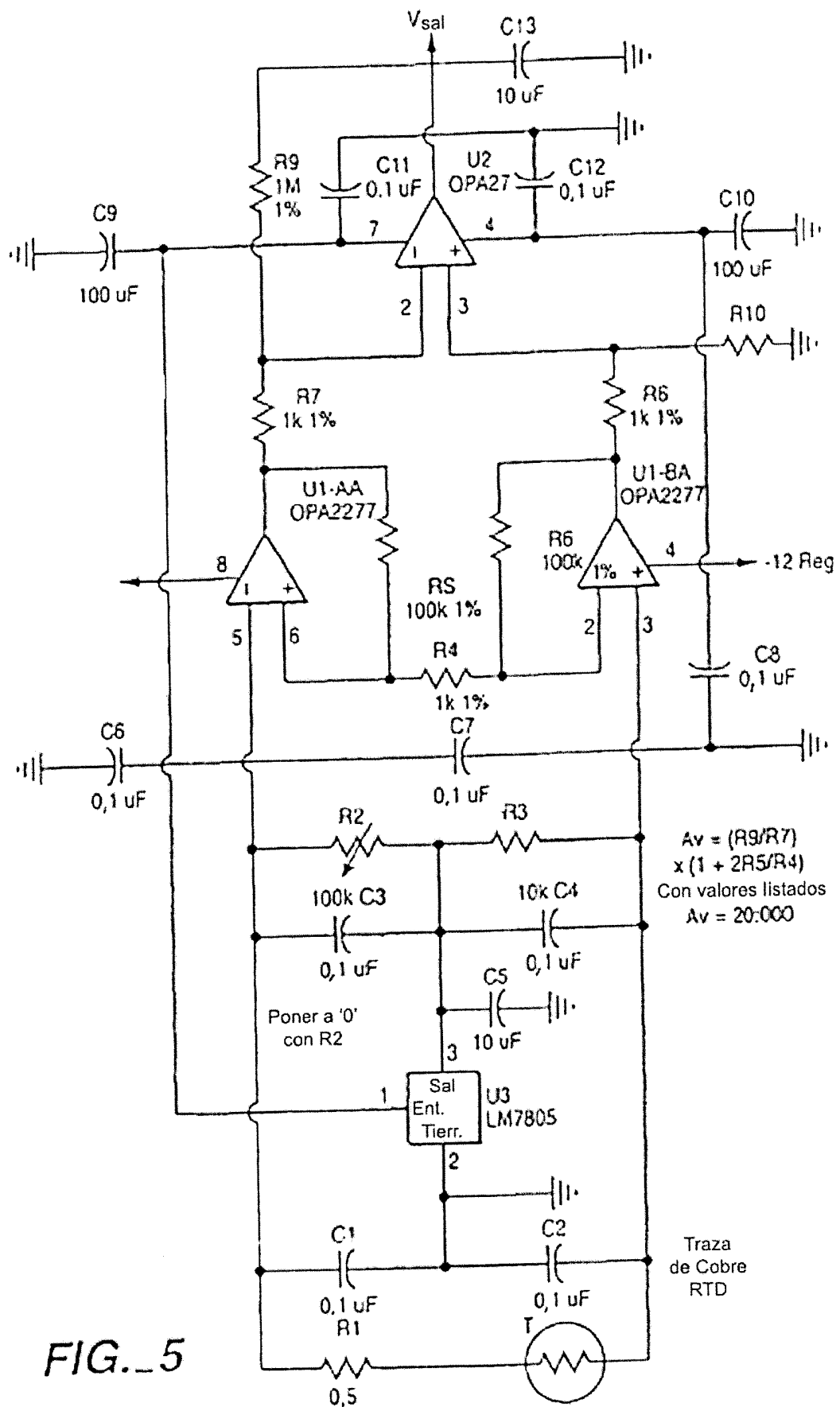


FIG._4D





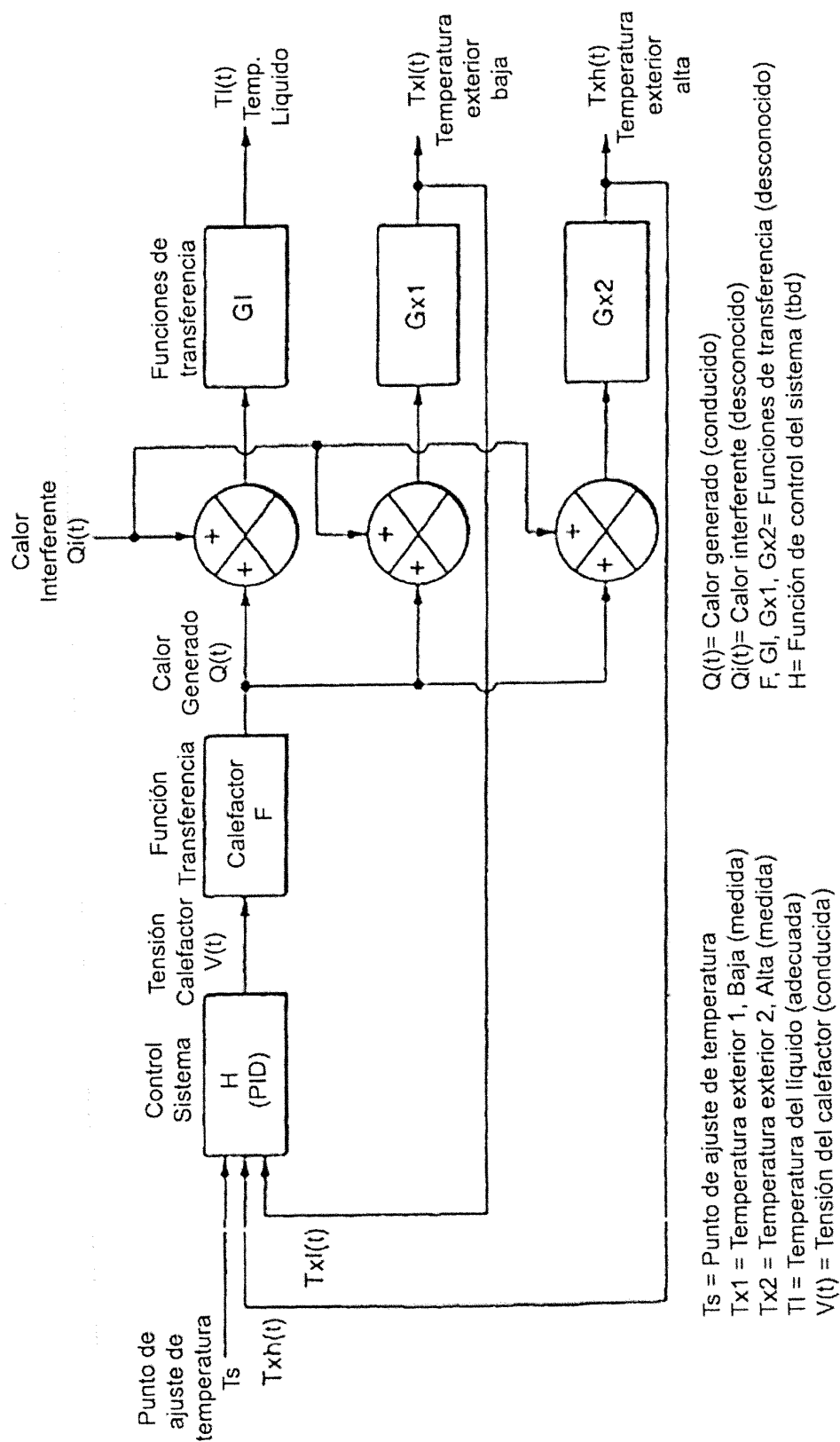
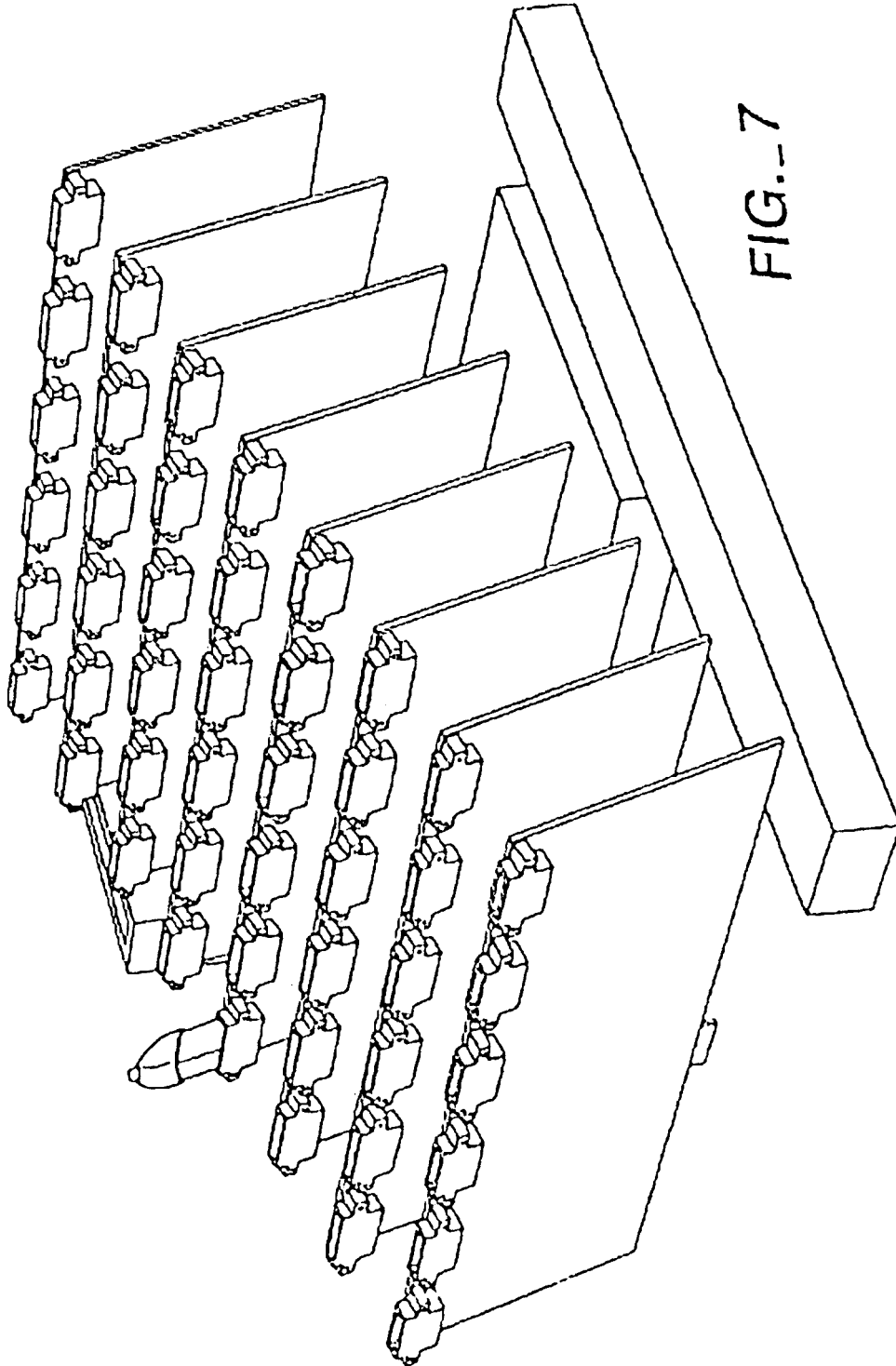
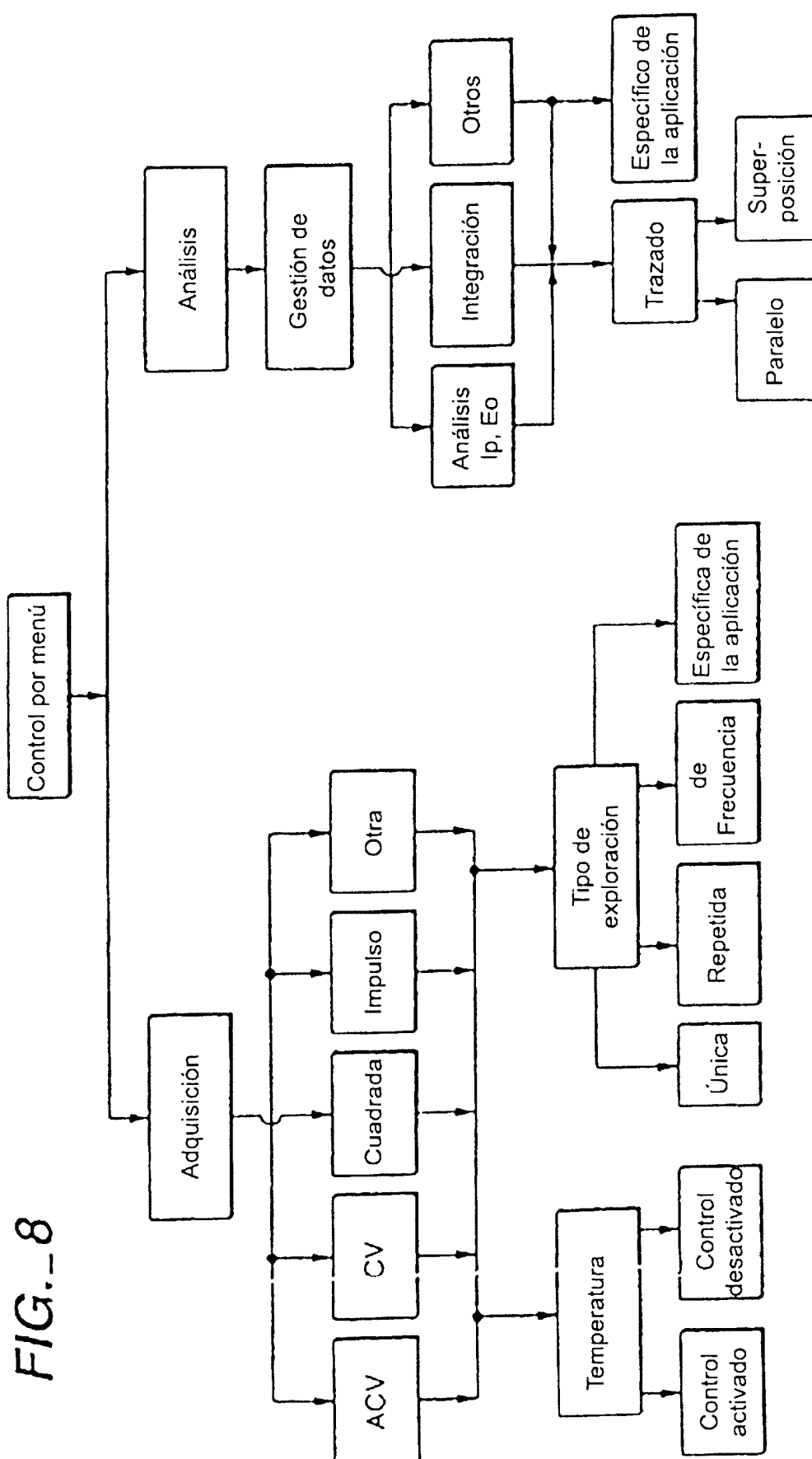


FIG._6





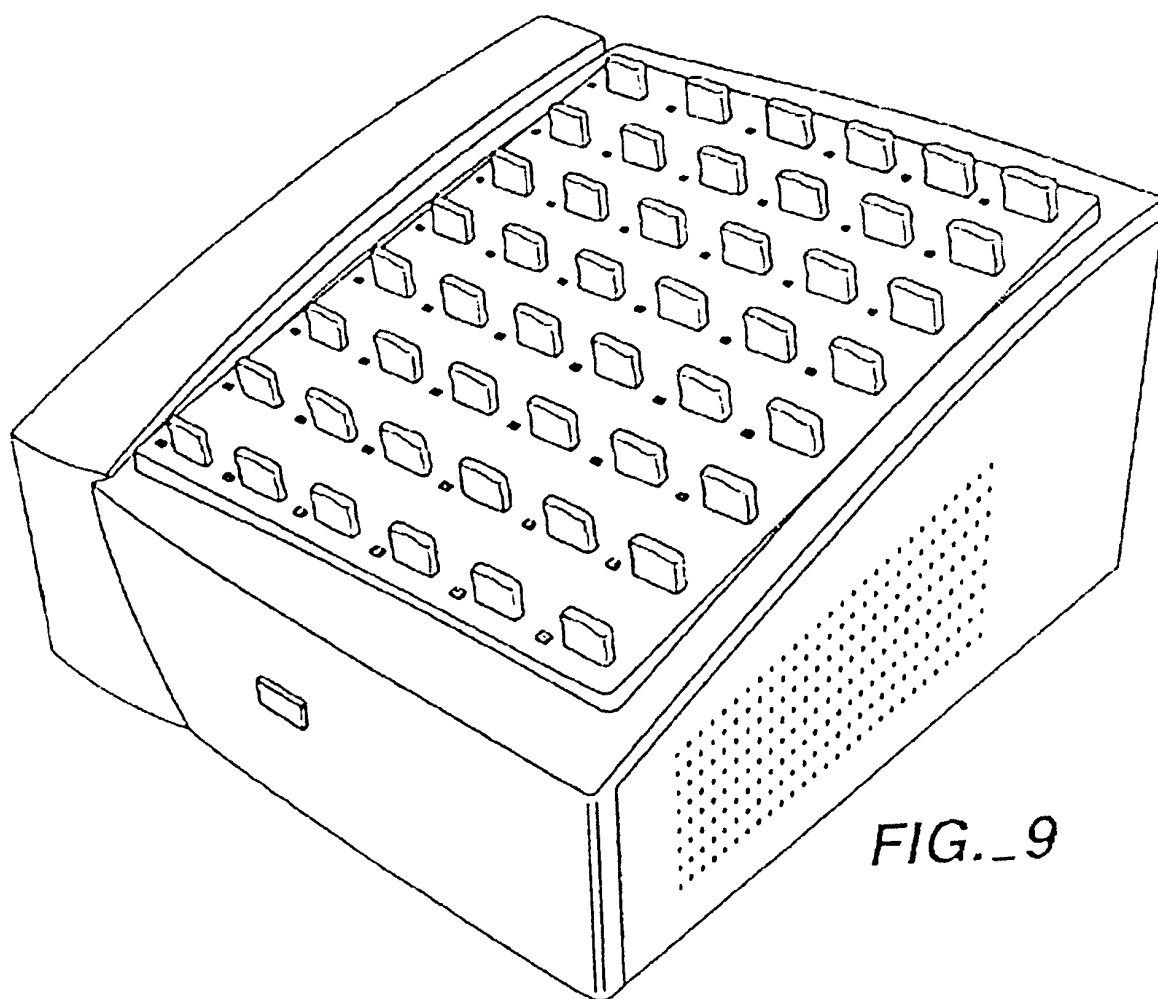


FIG._9

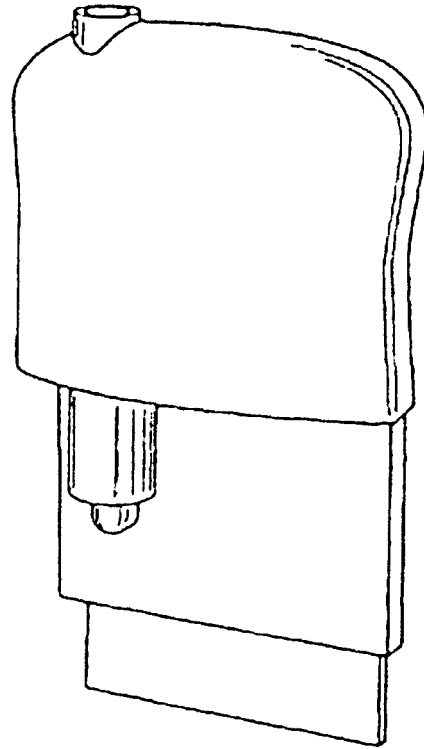


FIG._10A

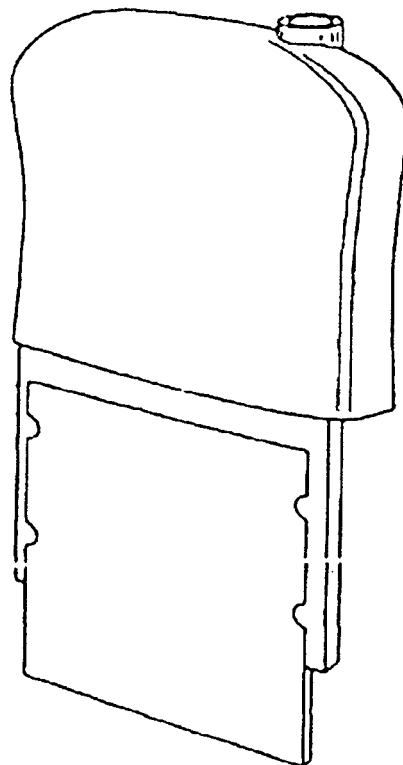


FIG._10B

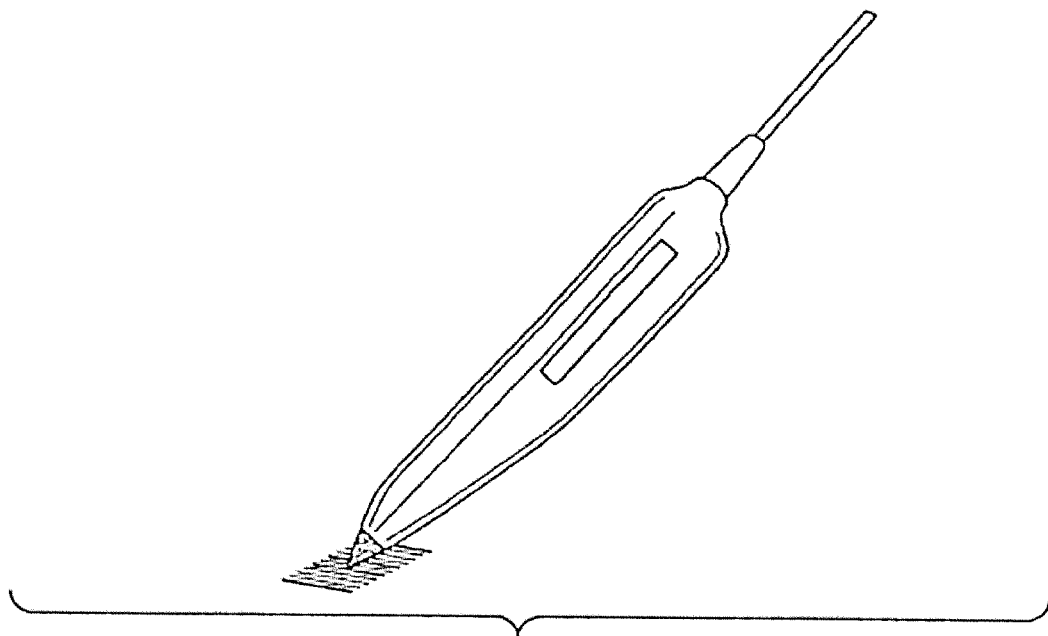


FIG. 11

FIG._12A

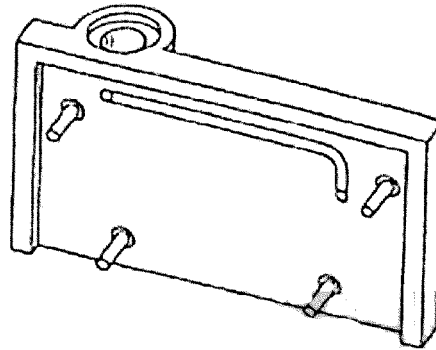


FIG._12B

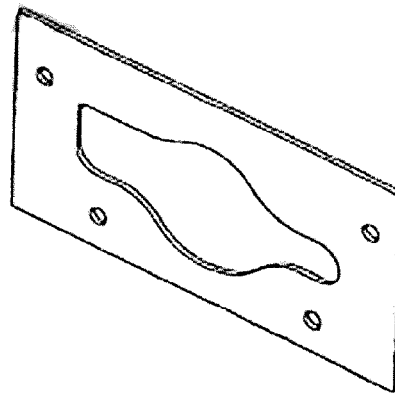


FIG._12C

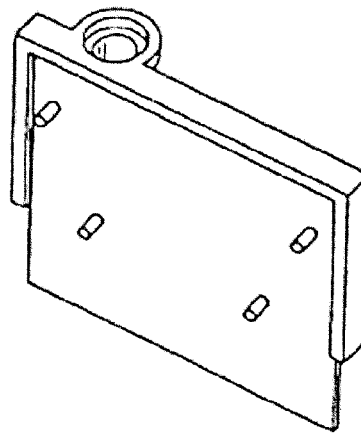
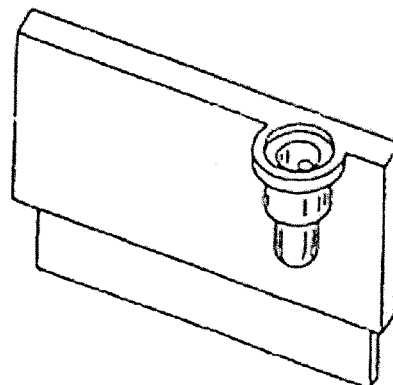


FIG._12D



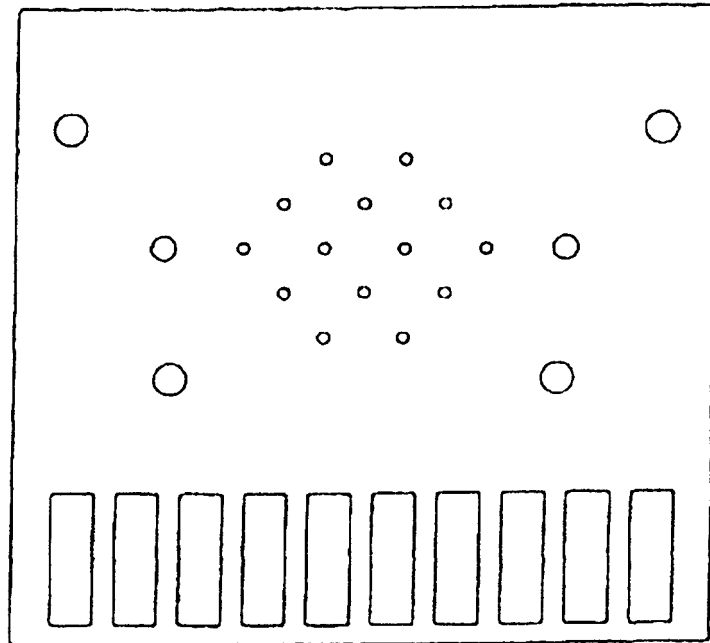


FIG. 12E

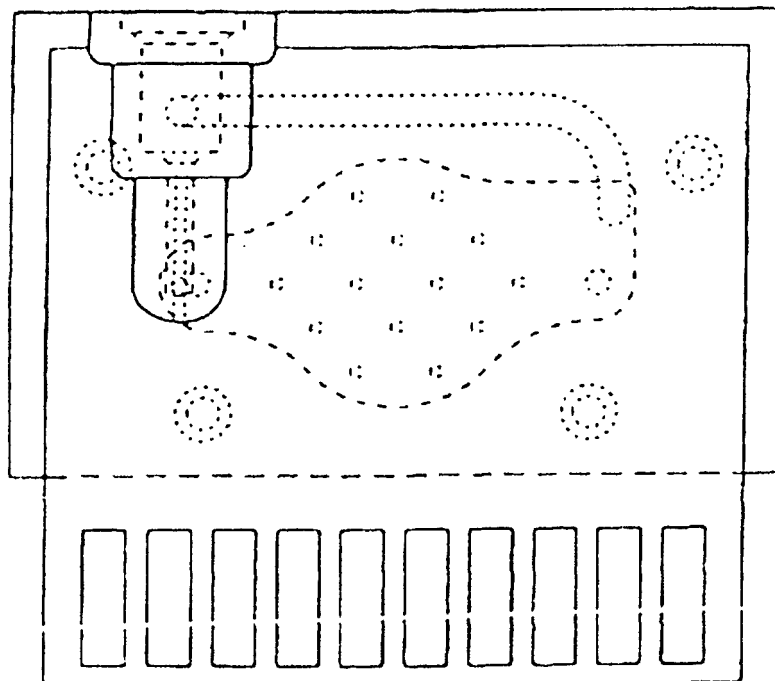


FIG. 12F

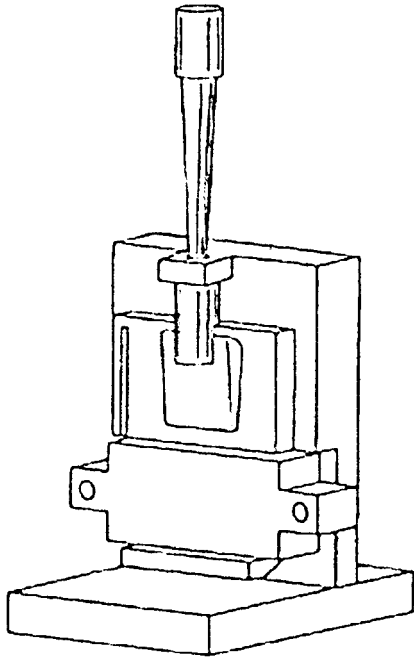


FIG. 13A

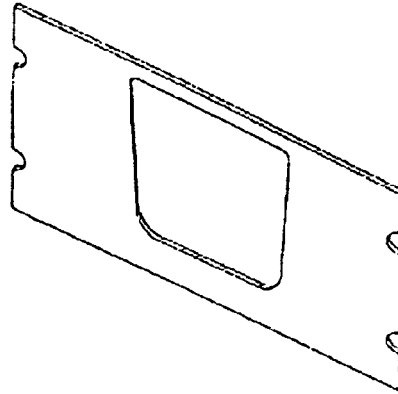


FIG. 13B

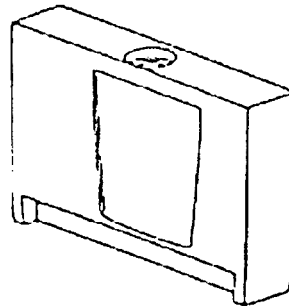


FIG. 13C

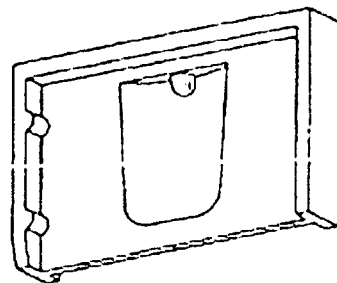


FIG. 13D

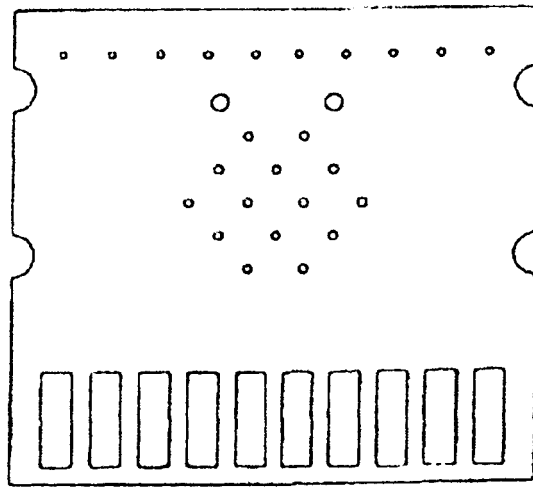


FIG. 13E

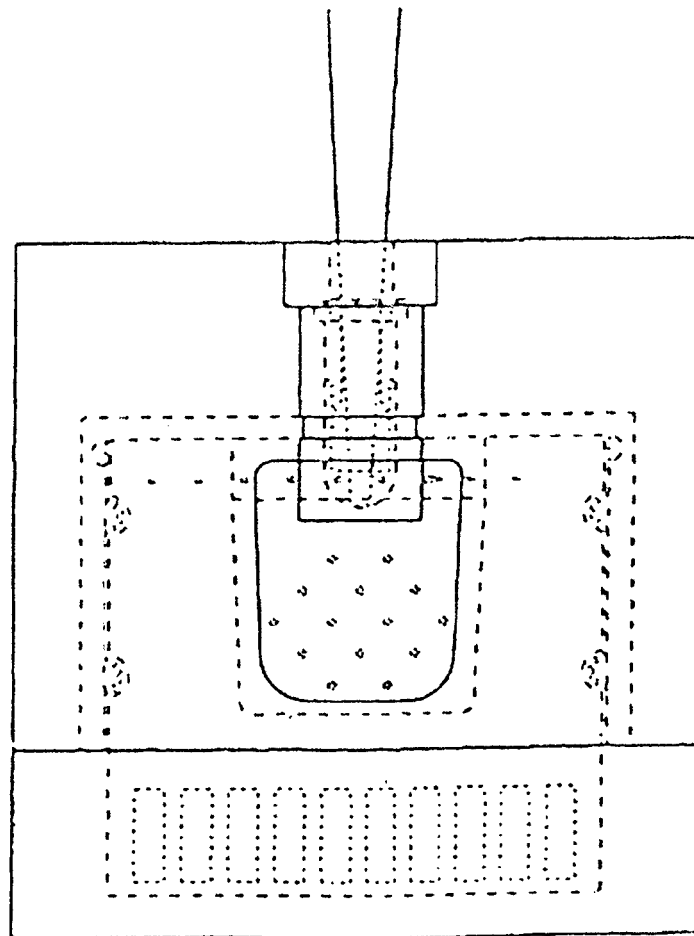


FIG. 13F