



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 298 730**

⑤1 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04720593 .5**

⑧6 Fecha de presentación : **15.03.2004**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1604042**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

⑤4 Título: **Procedimiento y dispositivo para detectar biomoléculas.**

③0 Prioridad: **14.03.2003 DE 103 11 315**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2008**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2008**

⑦3 Titular/es: **bioMérieux S.A.**  
**Chemin de l'Orme**  
**69280 Marcy l'Etoile, FR**

⑦2 Inventor/es: **Mandrand, Bernard y**  
**Dupont-Filliard, Agnès**

⑦4 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

**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

Procedimiento y dispositivo para detectar biomoléculas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar biomoléculas diana en muestras que comprenden una pluralidad de biomoléculas, y a un sistema para detectar dichas biomoléculas.

La detección de biomoléculas, por ejemplo material genético de patógenos o secuencias de ácidos nucleicos para la detección de enfermedades infecciosas, cribado genético y oncológico, está siendo cada vez más importante en la reciente investigación bioquímica y médica.

10 Por ejemplo, los procedimientos que usan sondas basadas en ácidos nucleicos ofrecen varias ventajas con respecto a los procedimientos microbiológicos o inmunológicos convencionales para la detección de organismos, según describen Nakamura y Bulund (J. Clinical Laboratory Analysis, 6, 73 - 83, 1992).

15 La mayoría de los procedimientos conocidos de la técnica anterior se basan en la detección de las señales generadas después de la hibridación de la sonda de ácido nucleico, por ejemplo, después de varios esquemas de amplificación, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), la reacción en cadena de la ligasa (*ligase chain reaction*, LCR), la amplificación basada en la transcripción, reacción de ciclación con sondas, etc.

20 Los ensayos con sondas, o de hibridación, se basan a menudo en la fijación de una sonda oligonucleotídica a una superficie con objeto de capturar una molécula de ácido nucleico diana de una muestra. La fijación de esta sonda a la superficie se consigue mediante la formación de enlaces covalentes, o mediante diversos mecanismos de absorción pasiva. La sonda inmovilizada es capaz de interactuar específicamente con las moléculas diana, por ejemplo, con secuencias de ácidos nucleicos en disolución. La interacción y la subsiguiente hibridación permiten la detección de la diana a través de diferentes procedimientos.

La patente U.S. No. 6.355.429 describe un dispositivo óptico para determinar la presencia de un primer ácido nucleico en una muestra que comprende un segundo ácido nucleico complementario del primer ácido nucleico, y que es capaz de hibridar con el primer ácido nucleico en condiciones de hibridación, estando el segundo ácido nucleico inmovilizado sobre un soporte sólido, en el que el soporte sólido está formado por una superficie que refleja la luz, en el que la hibridación de dicha muestra con el ácido nucleico diana da lugar a un cambio en las propiedades reflectoras de la luz, que se usa como un medio para detectar la presencia de dichos ácidos nucleicos diana en la muestra. La etapa final del ensayo de cambiar las propiedades ópticas de dicha superficie se lleva a cabo precipitando un sustrato enzimático que depositará moléculas grandes en la superficie mediante una reacción dependiente de enzimas. La precipitación da como resultado un cambio visible de color desde el dorado hasta el púrpura que puede ser detectado mediante procedimientos ópticos de medida.

40 La patente U.S. No. 6.096.825 describe el uso de películas de polímero de polipirrol conjugadas funcionalizadas conductoras eléctricas y electroactivas que pueden unirse a una primera molécula biológica. Estas películas de polipirrol son conductoras eléctricas y forman un electrodo plano. La molécula biológica así fijada puede usarse para ensayar, detectar y/o extraer una segunda molécula biológica que sea capaz de interactuar específicamente con dicha primera molécula biológica, cambiando así la conductividad global del "electrodo polimérico". Un importante inconveniente del procedimiento es que la modificación de la respuesta electromecánica con respecto al polímero de referencia debe ser de una magnitud tal que la sensibilidad global de dicho biochip disminuya considerablemente. La sensibilidad de estos biochips es limitada, del orden de  $>10^{11}$  moléculas/ml.

El documento WO 02/20838 describe un procedimiento y un sistema para detectar secuencias de ácidos nucleicos en muestras que contienen una mezcla de ácidos nucleicos. En una superficie, que comprende una pluralidad de electrodos metálicos, una sonda que comprende un oligonucleótido que es complementario de un segmento del ácido nucleico diana, se fija a un electrodo metálico, y subsiguientemente se pone en contacto una muestra con la superficie a la que está unido el oligonucleótido, permitiendo así que la sonda se una al ácido nucleico diana, seguido por la incubación del ácido nucleico diana unido con cuatro tipos de nucleótidos y un biocatalizador de replicación, formando una estructura de ácido nucleico multicatenario, en el que al menos uno de los tipos de nucleótidos está unido por un marcador, y detectar el marcador en la estructura del ácido nucleico multicatenario, detectando así indirectamente el ácido nucleico diana. La detección se consigue a través de una acción enzimática sobre los sustratos, que actúan como un par REDOX y precipitarán sobre el electrodo metálico cuya conductividad electrónica haya disminuido.

50 Un importante inconveniente de este procedimiento es la incubación del ácido nucleico diana con cuatro tipos diferentes de nucleótidos y el biocatalizador de replicación, dando lugar así a una complicación innecesaria en la etapa de detección. Otros inconvenientes adicionales resultan de la limitación del procedimiento sólo a ácidos nucleicos. Los biopolímeros diferentes de los ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, proteínas, péptidos, anticuerpos y similares, no pueden ser usados con este procedimiento. Adicionalmente, el electrodo metálico según el documento WO 02/20838 es un electrodo plano "bidimensional".

65 Por lo tanto, un objeto de la presente invención era proporcionar un procedimiento fiable y flexible con una elevada sensibilidad para la detección optimizada de biomoléculas en muestras.

El problema se resuelve mediante un procedimiento para detectar una biomolécula diana en una muestra que comprende una pluralidad de biomoléculas, mediante el cual la biomolécula diana es provista con una etiqueta, comprendiendo dicha etiqueta una fracción catalítica activa que cataliza la reacción de transformación de una especie soluble adicional en un precipitado insoluble, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar un soporte sólido con una pluralidad de ubicaciones espacialmente diferentes dispuestas en su superficie, mediante lo cual al menos una ubicación es conductora eléctrica, y una pluralidad de nanoelectrodos flexibles individuales con biomoléculas sonda fijadas a los mismos unidas a dicha ubicación,
- b) poner la muestra en contacto con el soporte sólido que comprende dichas biomoléculas sonda, formando así un complejo de reconocimiento entre una biomolécula sonda y una biomolécula diana,
- c) añadir una especie esencialmente soluble,
- d) transformar la especie soluble en precipitado insoluble formando un depósito esencialmente sobre o en los nanoelectrodos, disminuyendo así la flexibilidad de los nanoelectrodos.
- e) medir la conductividad eléctrica de la pluralidad de nanoelectrodos en al menos una ubicación.

El término “nanoelectrodo flexible” significa, en el contexto de la presente invención, que los propios nanoelectrodos son flexibles, es decir, que no son rígidos y que tienen una cierta movilidad incluso después de su fijación en la ubicación. Los nanoelectrodos pueden describirse mejor, por ejemplo, como filamentos individuales. Se entiende que la longitud de los nanoelectrodos está en el intervalo nanométrico, de desde 3 hasta 500 nm. Preferiblemente, los nanoelectrodos consisten en estructuras moleculares.

El precipitado puede ser aislante eléctrico o también conductor eléctrico. Se prefiere un precipitado esencialmente aislante eléctrico. Una de las funciones esenciales del precipitado es bloquear la flexibilidad/movilidad de los nanoelectrodos, lo que afecta a la conductividad de los nanoelectrodos.

Las estructuras moleculares que forman los nanoelectrodos consisten preferiblemente en cadenas de polímeros conductores eléctricos tales como polipirroles, politiofenos, politetrahidrofuranos, polianilinas, etc., sustituidos o no sustituidos, y copolímeros de los mismos. Además, están fijadas a los mismos una o una pluralidad de fracciones donantes electrones (*electron donor moieties*, EDM). Las EDM son preferiblemente complejos de metales de transición, por ejemplo, complejos de metales de transición de Fe, Ru, Co, Ni, Pt, Pd, Cn y similares, con varios ligandos donantes  $\sigma$  y  $\pi$ , algunos ejemplos de dichos ligandos comprenden, pero no se limitan a, ligandos donantes de nitrógeno, azufre y oxígeno tales como, por ejemplo, fenantrolina, ftalocianinas, porfirinas, porfirinógenos, calixarenos, bipyridina, además de ciclopentadieno, benzenopiridina y ligandos donantes  $\pi$  similares. Se prefieren los complejos en sándwich, y se prefieren más los metalocenos tales como ferroceno, rutenoceno, níqueloceno y similares. La respuesta eléctrica de las EDM es más precisa que la respuesta del polímero, y está fuertemente afectada y modulada por el depósito.

Cada cadena de polímero constituye un “nanoelectrodo” en sí misma. La conductividad eléctrica de las cadenas de polímero está correlacionada con su flexibilidad/movilidad. La longitud de la cadena de polímero puede variar en el intervalo de 20-300 nm, preferiblemente desde 30-200 nm y muy preferiblemente desde 90-180 nm. Sorprendentemente, el procedimiento según la invención permite establecer una correlación entre la flexibilidad y la movilidad de los nanoelectrodos y su conductividad. Esta correlación, es decir, el cambio en la conductividad eléctrica, es accesible a diversos procedimientos de medida eléctrica según se explica a continuación. Por lo tanto, el depósito del precipitado insoluble da lugar a un cambio en la conductividad de los nanoelectrodos, lo que indica la formación de un complejo de reconocimiento entre las biomoléculas sonda y las biomoléculas diana.

El procedimiento según la invención permite la detección de biomoléculas diana con una sensibilidad de  $< 10^8$  moléculas/ml. En una forma de realización, las etapas a) y b) tendrán lugar al mismo tiempo (es decir, la síntesis de las cadenas de polímero y la fijación de las biomoléculas sobre los sitios específicos del mismo). Pero se entiende que la síntesis de la cadena de polímero y la fijación de las biomoléculas también puede llevarse a cabo en momentos diferentes, es decir, la síntesis de las biomoléculas seguida por la fijación de los nanoelectrodos.

La medida de la conductividad eléctrica antes y después de la deposición del precipitado aislante eléctrico esencialmente insoluble en los nanoelectrodos se lleva a cabo esencialmente mediante dos procedimientos diferentes:

El primero, también denominado “medida cinética”, mide la conductividad eléctrica antes de la adición de la especie esencialmente insoluble soluble, es decir, antes de que tenga lugar la reacción de catálisis y después de la deposición del precipitado insoluble. La medida se lleva a cabo en intervalos de tiempo continuos, que tienen un período de intervalo igual o diferente, partiendo desde el inicio de la adición de la especie esencialmente insoluble hasta la finalización de la precipitación, siguiendo la reacción con el tiempo. Por lo tanto, se mide la diferencia en la conductividad eléctrica antes y después de la precipitación.

El segundo procedimiento hace uso de un electrodo de referencia “negativo” que habitualmente consiste en una capa metálica plana circular o rectangular, por ejemplo, hecha de oro. La capa metálica es habitualmente una parte de la matriz de ubicaciones (o “puntos”), consistiendo habitualmente todos ellos en una o más capas metálicas a las

que están fijados los nanoelectrodos. La conductividad de este electrodo de referencia “desnudo” es comparada con la conductividad de un punto con nanoelectrodos después de la deposición del precipitado sobre los nanoelectrodos. Se entiende que también puede haber presente más de un electrodo de referencia.

En otra forma de realización específica de la presente invención, el precipitado es coloreado. El precipitado coloreado es por lo tanto detectable adicionalmente mediante medios ópticos tales como colorimetría, espectroscopia de absorción en UV/VIS y similares, que pueden aportar una información complementaria sobre, por ejemplo, los acontecimientos de hibridación o interacción, a la que se obtendría basándose únicamente en las medidas eléctricas.

El precipitado insoluble, preferiblemente aislante eléctrico, interactúa electrostáticamente con los nanoelectrodos mediante el bloqueo de la movilidad libre de los nanoelectrodos flexibles. La conformación de los nanoelectrodos se considera en este caso “congelada”. Esta interacción da como resultado una disminución en la flexibilidad de las cadenas de nanoelectrodos. Esta disminución en la flexibilidad de los nanoelectrodos se correlaciona con una correspondiente disminución en su conductividad, que puede ser medida mediante las técnicas esencialmente conocidas por el artesano.

Preferiblemente, el cambio en la conductividad de los nanoelectrodos se detecta mediante un procedimiento elegido del grupo formado por medidas amperométricas, voltametría de pulso diferencial, espectroscopia de impedancia y cronoamperometría. Se prefiere especialmente la voltametría cíclica, que permite el uso de un equipo que es barato y fácil de operar. En general, la elección del procedimiento de medida adecuado dependerá de la aplicación y la sensibilidad deseadas.

Por ejemplo, se prefieren la voltametría cíclica y la cronoamperometría si se requiere un equipo de pequeño tamaño, compuestos económicos del sistema y una fácil manipulación. Se prefiere la voltametría cíclica cuando los nanoelectrodos son cadenas de polímero, que incorporan especies donantes de electrones. Las especies donantes de electrones pueden ser una parte integral de la cadena de polímero o estar fijadas al mismo. La espectroscopia de impedancia será el procedimiento de elección si se requiere un procedimiento extremadamente sensible.

La espectroscopia de impedancia aporta información sobre la conductividad del sistema investigado. La voltametría cíclica, o la voltametría en general, examinan las reacciones electroquímicas implicadas.

Cuando el sistema que se va a examinar cambia su conductividad, como por ejemplo afectando a la conductividad de los nanoelectrodos formados esencialmente por cadenas de polímero, se prefiere la espectroscopia de impedancia.

Se prefiere especialmente que la fracción catalítica activa sea un biocatalizador. Los biocatalizadores son preferiblemente enzimas que muestran una amplia variedad con respecto a su naturaleza química, estructura y reacciones que catalizan. Por lo tanto, pueden ajustarse y elegirse según las necesidades específicas. Adicionalmente, las enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones bioquímicas y químicas sin consumirse.

Algunos ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas son, por ejemplo, proteasas, oxidasas, reductasas y deshidrogenasas. Se prefieren las peroxidasas. Se prefieren especialmente la fosfatasa alcalina, la oxidasa de glucosa, la acetilcolinesterasa y la peroxidasa de rábano picante.

En una forma de realización preferida adicional, la etiqueta comprende adicionalmente un complejo de biotina/estreptavidina o de biotina/avidina. Esto es debido al hecho de que el par de unión biotina-avidina o estreptavidina ha sido investigado con considerable detalle (véase, por ejemplo, Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90, 5076-5080). Parece que la fuerza de la interacción de unión está dirigida principalmente por la entalpía. La biotina se introduce fácilmente en biomoléculas tales como oligonucleótidos, péptidos y similares. También puede acoplarse fácilmente una enzima al esqueleto peptídico de la avidina o la estreptavidina. Entonces se forma el par biotina/avidina o biotina/estreptavidina con su fuerte fuerza de unión de una forma mucho más conveniente que introduciendo la enzima directamente en la biomolécula diana. La última forma es a menudo tediosa, tiene un bajo rendimiento y no ofrece la posibilidad de elegir entre una amplia variedad de enzimas distintas. Esto se consigue mucho mejor mediante la presente invención.

En una forma de realización preferida de la presente invención se fija una única biomolécula sonda a cada nanoelectrodo, obteniéndose así un incremento en la flexibilidad de los nanoelectrodos. La precipitación de la especie de detección da como resultado una reducción significativa de su flexibilidad, dependiendo de la naturaleza de los nanoelectrodos, más específicamente de los polímeros usados. Esto puede resultar incluso en una inmovilización total de las cadenas de polímero. La significativa disminución en la flexibilidad da como resultado por lo tanto un correspondiente descenso agudo en su conductividad eléctrica. Este descenso se detecta fácilmente y permite una medida más precisa, con un aumento de la sensibilidad.

En otra forma de realización preferida se fijan al menos dos biomoléculas sonda a cada nanoelectrodo. Las biomoléculas sonda pueden ser iguales o diferentes entre sí. Se entiende que también está fijada a un nanoelectrodo una pluralidad, es decir, más de dos biomoléculas sonda iguales o diferentes. En otra forma de realización más se fija una pluralidad de moléculas sonda. Cuantas más biomoléculas sonda se fijan a cada nanoelectrodo, más precipitado se formará. La menor disminución significativa debida a la disminución en la flexibilidad de los nanoelectrodos provis-

tos con una pluralidad de biomoléculas sonda está compensada por un aumento en el precipitado detectable, lo que incrementa la sensibilidad.

El término “biomolécula” según se usa en este documento significa cualquier molécula biológica en forma de un polímero, tal como oligonucleótidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, etc. El término “nucleótido” según se usa en este documento comprende tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos. El término “oligonucleótido” se refiere a un oligonucleótido que tiene unidades de desoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos. El término comprende por tanto el ADN, ARN, LNA, PNA y quimeras de los mismos. En el contexto de la presente invención se prefieren especialmente las biomoléculas que son oligonucleótidos, polipéptidos y carbohidratos.

Se prefiere que la biomolécula sonda comprenda adicionalmente una fracción donante de electrones (EDM). La presencia de una EDM incrementa la actividad eléctrica del polímero conductor eléctrico. En las formas de realización especialmente preferidas de la invención, la EDM comprende un complejo en sándwich de un metal de transición, tales como ferroceno sustituido o no sustituido, rutenoceno, níqueloceno, cobaltoceno y similares. Estos complejos son fáciles de sintetizar y fáciles de funcionalizar, lo que facilita la fijación a las biomoléculas sonda.

En una forma de realización preferida adicional, los nanoelectrodos, es decir, habitualmente la cadena del polímero o copolímero, comprenden una fracción donante de electrones (EDM). La EDM puede ser parte de la cadena del polímero (esqueleto), es decir, está incorporada en la cadena como un “miembro de la cadena” si la EDM es por ejemplo bifuncional, es decir, que comprende dos grupos funcionales, o está fijada a la misma si la EDM es monofuncional, es decir, que comprende un grupo funcional.

Se prefiere que el soporte sólido sea conductor eléctrico. En otra forma de realización, el soporte comprende una capa aislante eléctrica o está formado esencialmente por un material aislante eléctrico tal como, por ejemplo, un material plástico que está cubierto, al menos parcialmente, por una capa conductora eléctrica. El soporte es, en otra forma de realización, un material semiconductor que comprende una capa aislante eléctrica, siempre que, en cada caso, pueda establecerse preferiblemente una conexión eléctrica con una unidad de un dispositivo controlador eléctrico, preferiblemente a través de ubicaciones espacialmente diferentes o electrodos metálicos bidimensionales “planos” (“puntos”) que forman la denominada “matriz” de puntos en la superficie del soporte.

En una forma de realización especialmente preferida de la invención, la biomolécula diana es un oligonucleótido (ADN O ARN) que comprende un segmento que es parcial o totalmente complementario de la molécula sonda, que también es un oligonucleótido. El oligonucleótido sonda puede contener nucleótidos  $\alpha$  análogos a los nucleótidos naturales y que pueden ser producidos en sintetizadores automáticos. Los oligonucleótidos diana pueden ser ADN bicatenario, ADN monocatenario, un híbrido de ADN-ARN o ARN (ribosómico o mensajero). Por supuesto, en el caso de oligonucleótidos bicatenarios o híbridos, deberían desnaturalizarse antes de llevar a cabo el procedimiento de detección según la invención usando las técnicas de hibridación en sándwich conocidas.

En las formas de realización preferidas específicas, la etiqueta comprende adicionalmente una primera especie de detección, que es especialmente una secuencia a oligonucleotídica. Adicionalmente se prefiere aun más que el oligonucleótido comprenda un segmento que sea parcialmente complementario de la biomolécula diana. Por lo tanto, las moléculas diana que no pueden ser etiquetadas mediante las técnicas convencionales o convenientes, pueden ser etiquetadas indirectamente.

Se prefiere especialmente que la especie de detección soluble se elija del grupo formado por 5-bromo-4-cloro-3-fosfato-1H-indol (BCIP), cloruro de azul de nitrotetrazolio (*nitrobluetetrazolium chloride*, NBT), dimetilbencidina, diaminobencidina, 4-cloronaftol, 3-amino-3-etilcarbazol y tetrametilbencidina (TMB). Lo que más se prefiere es la mezcla de BCIP/NBT, en la que el NBT actúa como un amplificador cromogénico. Por lo tanto, el uso de BCIP/NBT ofrece la posibilidad de una medida electroquímica y/u óptica del precipitado.

En el procedimiento de la invención puede usarse un biochip que comprende un soporte sólido con una pluralidad de nanoelectrodos redondeados flexibles fijados a una pluralidad de ubicaciones espacialmente diferentes sobre el soporte sólido, y moléculas sonda unidas a todos o a una pluralidad de dichos nanoelectrodos, que pueden ser iguales o diferentes, siendo capaz un segmento de dichas moléculas sonda de interactuar específicamente con un segmento de las biomoléculas diana.

El biochip proporciona una pluralidad de “nanoelectrodos” individuales, portando cada “nanoelectrodo”, o un número definido de los “nanoelectrodos”, una, dos o una pluralidad de biomoléculas sonda. Preferiblemente, las biomoléculas sonda se eligen del grupo formado por oligonucleótidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, receptores hormonales, lípidos. Los oligonucleótidos son especialmente preferidos.

El biochip se usa preferiblemente para la detección de las secuencias de ácidos nucleicos de diferentes microorganismos patógenos, de secuencias de ácidos nucleicos relacionadas con diferentes enfermedades genéticas o de secuencias de ácidos nucleicos de diferentes tejidos.

También se describe un kit para la detección de biomoléculas diana en una muestra que comprende una pluralidad de biomoléculas, que comprende:

- a) un soporte parcialmente funcionalizado con una pluralidad de nanoelectrodos individuales en diversas ubicaciones sobre el soporte, y con biomoléculas sonda fijados a los mismos,
- b) una especie de detección

El término “especie de detección” en el contexto de la presente invención es sinónimo de la especie esencialmente soluble adicional mencionada anteriormente que es transformable en un precipitado insoluble.

### Definiciones y abreviaturas

A continuación se explican los términos y definiciones según se usan en este documento para la ilustración adicional de la presente invención.

El término “para detectar” o “detección”, según se usa en este documento, se refiere a la determinación cualitativa y cuantitativa y a la identificación de moléculas diana en la muestra mediante técnicas de medidas eléctricas u ópticas.

El término “biomolécula” se refiere a cualquier molécula existente en la naturaleza o sintetizada artificialmente según una matriz existente en la naturaleza, que comprende, por ejemplo, anticuerpos, proteínas, péptidos, secuencias de ácidos nucleicos, es decir, polinucleótidos u oligonucleótidos que comprenden al menos dos desoxirribonucleótidos u ribonucleótidos, que comprenden opcionalmente al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, un nucleótido que contiene una base modificada, receptores hormonales, lípidos o antígenos.

El término “péptido”, según se usa en este documento, se refiere en particular a cualquier péptido de al menos dos aminoácidos, en particular una proteína, un fragmento de proteína o un oligopéptido que es extraído, separado o sustancialmente aislado o sintetizado, en particular, los obtenidos mediante síntesis química o mediante su expresión en un organismo recombinante.

El término “soporte” denota cualquier cuerpo sólido tridimensional, que no interactúa química o físicamente con una muestra. El soporte puede ser conductor eléctrico o no conductor eléctrico.

El término “interactuar”, según se usa en este documento, significa cualquier interacción entre entidades moleculares que comprende la formación de un enlace químico (covalente o iónico), interacciones de van der Waals, interacciones de puentes de hidrógeno, fenómenos de adsorción y similares.

El término “complejo” se refiere a una entidad formada por al menos dos entidades moleculares diferentes, interactuando según se especificó anteriormente. Un complejo según la invención se mantiene unido mediante las interacciones según se especificó anteriormente.

A continuación se explica detalladamente la invención con respecto a las figuras y a la descripción técnica. Se entiende que los siguientes ejemplos tienen únicamente un propósito ilustrativo y no pretenden restringir el ámbito de la invención.

Fig. 1 muestra una forma de realización del procedimiento según la invención,

Fig. 2 muestra un diagrama de la reacción química de la especie de detección tras la reacción inducida por la especie catalítica activa,

Fig. 3 muestra dos formas de realización según la invención para la incorporación de biomoléculas sonda en un nanoelectrodo formado por una cadena de polímero,

Fig. 4 muestra la influencia del estado de oxidación de las cadenas de polímero de los nanoelectrodos PPy/PPy-ODN funcionalizados con nitrógeno sobre su conductividad.

Fig. 5 muestra la influencia de la longitud de las cadenas de polímero de los nanoelectrodos PPy/PPy-ODN funcionalizados con nitrógeno sobre su conductividad.

Fig. 6 muestra la influencia de la posición de la funcionalización (funcionalización en N con respecto a la funcionalización en 3 sobre la conductividad del nanoelectrodo consistente en cadenas de polímero (longitud de 180 nm)

Fig. 7 muestra la estabilidad de las respuestas de las medidas de impedancia para los nanoelectrodos consistentes en copolímeros PPy-OH/PPy-CP y PPy-OH/PPy-M5, funcionalizados en la posición 3, antes de la hibridación y la precipitación.

Fig. 8 muestra una comparación de las curvas de la respuesta de los nanoelectrodos de polímero que comprenden una cadena de polímero funcionalizada en la posición 3, PPy-OH/PPy-CP (curva 1) frente a PPyOH/PPy-M5 (curva 2), con una longitud de la cadena de 120 nm, después de la hibridación (con CP-bio) y la precipitación.

Fig. 9 muestra la proporción entre los módulos de impedancia de los nanoelectrodos PPy-OH/PPy-CP y PPy-OH/Py-M5 funcionalizados en la posición 3 (longitud de la cadena de 120 nm; [diana] = 1 nM)

Fig. 10 muestra la sensibilidad de las medidas por espectroscopía de impedancia en función de la concentración de las moléculas diana

Fig. 11 muestra la respuesta de las medidas voltamperométricas de los nanoelectrodos PPy-OH/PPy-CP (curva 1) y PPyOH/PPy-M5 (curva 2), funcionalizados en la posición 3, después de la hibridación con CP-bio y la precipitación de BCIP/NBT (longitud del nanoelectrodo: 50 nm)

Fig. 12a muestra la respuesta de las medidas por espectroscopía de impedancia de una muestra negativa con el nanoelectrodo PPy-OH/PPy-M5 funcionalizado en la posición 3 durante la precipitación de BCIP/NBT en PPy-OH/PPy-CP (medida cinética).

Fig. 12b muestra la respuesta de las medidas por espectroscopía de impedancia durante la precipitación de BCIP/NBT sobre nanoelectrodos consistentes en el copolímero PPy-OH/PPy-CP funcionalizado en la posición 3 (medida cinética).

La fig. 1 muestra un sustrato 101, por ejemplo, hecho de un metal o de una aleación metálica (por ejemplo cobre, plata, silicio recubierto de oro, silicio recubierto de cobre, etc.). El sustrato 101 porta una pluralidad de nanoelectrodos 102 que están fijados al sustrato 101 a través de uniones covalentes. Los nanoelectrodos son preferiblemente cadenas de polímero individuales que están dispuestas regular o irregularmente, y que tienen una longitud igual o diferente. En una forma de realización preferida, están dispuestas regularmente y forman un “cepillo” en el que los nanoelectrodos tienen esencialmente la misma longitud. Preferiblemente, el polímero del nanoelectrodo es un polipirrol, un polímero unido a la superficie preferiblemente a través de su posición 2, 3 ó 1. En otra forma de realización de la invención, puede usarse otro polímero conductor eléctrico como el polipirrol (y sus derivados sustituidos), por ejemplo, politiofeno, polianilina, politetrahidrofurano, sus derivados sustituidos y similares. Los bloques monoméricos de construcción de los homopolímeros están unidos a través de sus respectivas posiciones 3 ó 1. Se entiende que también están comprendidos en el ámbito de la invención los copolímeros de diferentes bloques monoméricos de construcción según se mencionó anteriormente. Con respecto a los sustituyentes, es evidente que el experto en la materia elegirá los sustituyentes según el grado de conductividad eléctrica requerido.

Adicionalmente, los nanoelectrodos pueden comprender, es decir, incorporar en la cadena de polímero o tener fijadas a la misma, una o más fracciones donantes de electrones (EDM), preferiblemente complejos de metales de transición tales como metalocenos como ferroceno, niqueloceno y similares, según se describió anteriormente de modo específico.

En una forma de realización adicional de la presente invención, los nanoelectrodos consistentes en cadenas de polímeros fueron obtenidos mediante la copolimerización de tres componentes diferentes, a saber, a) 3 hidroxipirrol, b) ferroceno unido al 3 hidroxipirrol y c) un oligonucleótido unido al 3 hidroxipirrol, generando así tres segmentos diferentes en cada cadena de polímero. Cuando se considera la pluralidad de todas las cadenas de polímero, puede considerarse que los tres segmentos diferentes de la pluralidad de los nanoelectrodos forman tres “capas” en un punto, si los segmentos están, en cada nanoelectrodo, en la misma o al menos esencialmente en la misma posición.

Una biomolécula 105, por ejemplo, un oligonucleótido, portador de un conector 104 y un segmento complementario 103, es fijada a través del conector 104 sobre la cadena de polímero 102. La fijación se consigue a través de la formación de un enlace químico entre la biomolécula sonda y la cadena de polímero mediante procedimientos esencialmente conocidos por el experto en la materia.

Para efectuar la detección de una biomolécula diana, el sustrato 101, con las biomoléculas sonda 105 fijadas a una pluralidad de cadenas de polímero 102, se pone en contacto con una molécula diana 106. Las biomoléculas diana están contenidas en una disolución, una dispersión, una emulsión y similares. Antes de poner en contacto la biomolécula diana 106 con el biochip, la biomolécula diana 106 experimenta una reacción con una biomolécula de detección 107 mediante la cual la biomolécula diana 106 y la biomolécula de detección 107 tienen secciones complementarias capaces de experimentar interacciones químicas o físicas entre sí. Se prefiere que la biomolécula diana 106 y la biomolécula de detección 107 sean oligonucleótidos con secuencias complementarias. La biomolécula de detección 107 comprende adicionalmente una etiqueta 109 que preferiblemente es biotina. La biotina se conecta a la biomolécula de detección 107, preferiblemente mediante un enlace covalente químico. Se entiende que en otra forma de realización específica, el uso de la biomolécula de detección no es necesario. En este caso, la etiqueta se fija directamente a la biomolécula diana.

La biomolécula sonda 105 y la biomolécula diana 106, junto con la biomolécula de detección 107, forman un complejo de reconocimiento según se muestra en la fig. 1c. El complejo de reconocimiento 1c se hace reaccionar entonces con un agente generador de señal 110 que comprende una porción de unión a la etiqueta 111 que, por ejemplo, puede ser avidina o estreptavidina. La etiqueta 110 comprende adicionalmente un biocatalizador 112 que es, por ejemplo, fosfatasa alcalina, pero puede usarse alternativamente cualquier otro catalizador enzimático, según se menciona en la sección anterior, adecuado para el propósito de la invención.

La biotina 109 y la estreptavidina 111 formarán el complejo biotina-estreptavidina, fijando así la especie catalítica activa 112 al complejo de reconocimiento.

La subsiguiente reacción con BCIP/NBT da lugar a una oxidación del BCIP y a una reducción del NBT. El BCIP/NBT oxidado precipita como el precipitado 113 sobre la cadena de polímero 102 del biochip. Las cadenas de polímero están estructuralmente rígidas ("congeladas") e inmóviles después de la precipitación del BCIP/NBT 113. La fijación da lugar a un cambio en su conductividad eléctrica que puede ser detectado mediante medidas de conductividad, según se mencionó anteriormente.

En otra forma de realización se usan diferentes pares de enzimas y agentes generadores de señal. Estos pares incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante junto con 4-cloro-1-naftaleno, fosfatasa alcalina y derivados del fosfato de indolilo, oxidasa de glucosa y sales de tetrazolio.

La medida del cambio en la conductividad eléctrica de las cadenas de polímero 102 se lleva a cabo mediante espectroscopía de impedancia, voltametría cíclica y similares.

La fig. 2 muestra la reacción REDOX de la especie de detección BCIP/NBT bajo la influencia de la fosfatasa alcalina. Después de la oxidación y la adición de protones ácidos, se obtiene un producto NBT tetramérico coloreado que tiene un intenso color que absorbe a 530 nm. El NBT está precipitando sobre las cadenas de polímero 102 y también puede ser detectado mediante medidas colorimétricas o de UV/VIS.

La fig. 3 muestra dos formas de realización sobre cómo fijar una biomolécula sonda oligonucleotídica sobre un nanoelectrodo consistente en una cadena de polímero que comprende unidades de pirrol.

La fig. 3a muestra un sustrato S. Fijadas al sustrato S, por ejemplo, un sustrato que comprende silicio recubierto de oro, hay cadenas de polipirrol unidas en 3. Además, hay una fracción de ferroceno fijada al polímero a través de un conector adecuado. Una fracción cp del ferroceno porta un grupo sustituyente acilo que puede ser modificado para que la molécula sonda oligonucleotídica se fije al mismo. Pero cualesquiera otros sustituyentes adecuados distintos al acilo también están comprendidos en el ámbito de la invención. Las letras n y l son números enteros entre 1 y 4. Según se muestra en la fig. 3a, hay una única biomolécula sonda fijada a cada bloque monomérico de construcción, es decir, a cada unidad pirrol de las cadenas poliméricas.

La fig. 3b muestra otra forma de realización para fijar una biomolécula sonda oligonucleotídica a una cadena de polipirrol unida en 3. Según se muestra en la fig. 3b, sólo hay una biomolécula sonda oligonucleotídica fijada a cada cadena de polímero.

La fig. 4 muestra la evolución de la resistencia de la transferencia de carga ( $R_t$ ) a través del nanoelectrodo, funcionalizado en la posición nitrógeno, en función del potencial aplicado sobre el nanoelectrodo. Esta resistencia disminuye cuando el potencial aplicado aumenta hacia valores positivos. Esto es una indicación de que cuanto más oxidadas están las cadenas de polímero, más conductoras son. Para un potencial de + 0,5 V, la resistencia  $R_t$  disminuye ocho veces cuando se compara con un potencial aplicado de 0 V. Consecuentemente, los nanoelectrodos poliméricos conductores o semiconductores eléctricos forman, en un aspecto, una matriz para la inmovilización de los oligonucleótidos sobre el soporte sólido, y forman en otro aspecto, un transductor en el que puede modularse la conductividad intrínseca.

La fig. 5 muestra la influencia de la longitud del nanoelectrodo polimérico PPy/PPy ODN (los polímeros están funcionalizados en su posición nitrógeno) sobre la conductividad como un diagrama de Nyquist (parte imaginaria de la impedancia en función de su parte real). La curva 1 muestra la medida sobre un nanoelectrodo con una longitud de 80 nm y la curva 2 un nanoelectrodo con una longitud de 160 nm. Como puede observarse a partir de la fig. 5, parece que la conductividad es diez veces mayor cuando la longitud de los nanoelectrodos es de 160 nm con respecto a una longitud de 80 nm. Por lo tanto, cuanto más largos son los nanoelectrodos (hasta aproximadamente 200 nm), más conductores son. La conductividad iónica aumenta al aumentar la longitud. Sin embargo, a partir de una cierta longitud (aproximadamente desde los 200 nm) la conductividad electrónica disminuye, lo que supone el factor limitante para el aumento de la conductividad. Por lo tanto, es posible configurar la conductividad de los nanoelectrodos poliméricos variando su longitud.

La fig. 6 muestra la diferencia, como un diagrama de Nyquist, para un nanoelectrodo copolimérico funcionalizado en nitrógeno y para un nanoelectrodo copolimérico funcionalizado en 3. La curva 1 muestra un copolímero funcionalizado en la posición N y la curva 2 muestra un copolímero funcionalizado en la posición 3. La conductividad es seis veces mayor debido a la funcionalización en la posición 3 del oligonucleótido con respecto a una funcionalización en nitrógeno. Por lo tanto, se prefiere especialmente fijar los oligonucleótidos en la posición 3 de los monómeros pirrólicos si se prefiere trabajar con transductores que sean más conductores.

La fig. 7 muestra la estabilidad de las respuestas de impedancia (diagrama de Bode, que muestra el módulo de la impedancia en función de una frecuencia) de los nanoelectrodos copoliméricos funcionalizados en 3 PPy-OH/Py-CP y PPy-OH/PPy-M5 antes de la hibridación y la precipitación. Las respuestas que se obtienen son idénticas y perfectamente estables.

La fig. 8 muestra un diagrama de Bode de nanoelectrodos formados por los copolímeros funcionalizados en 3 PPy-OH/PPy-CP y PPy-OH/PPy-M5 con una longitud de 120 nm con o sin precipitado del diana, con una concentración de diana de  $[diana] = 1 \text{ nM}$ . Las curvas están en función de la frecuencia en Hz con respecto al módulo de impedancia  $Z$ .

La curva 1 muestra la respuesta de impedancia con precipitado, y la curva 2 la respuesta de impedancia sin precipitado. Como puede observarse a partir de la fig. 8, a bajas frecuencias (1-100 Hz) la diferencia en la respuesta con y sin precipitado es considerable. El módulo  $Z$  es aproximadamente dos veces mayor con precipitado. La fig. 8 demuestra claramente la alta sensibilidad del procedimiento en relación con el sustrato. Por lo tanto, es posible diferenciar con claridad entre puntos positivos (CP en este ejemplo) y puntos negativos (M5) mediante técnicas de impedancia.

La fig. 9 muestra la proporción entre los módulos de impedancia de los nanoelectrodos poliméricos PPy-OH/PPy-CP y PPy-OH/PPy-M5, funcionalizados en la posición 3, con una longitud de 120 nm. La concentración de las moléculas diana era  $0,1 \text{ nM}$ . La proporción entre esos módulos está en el intervalo de dos con una frecuencia de 1 Hz y para una longitud de nanoelectrodo de 120 nm. También es evidente a partir del ejemplo de la fig. 9, que la frecuencia influye sobre la sensibilidad de la detección.

La fig. 10 muestra la sensibilidad de las medidas de impedancia en función de la concentración de moléculas diana. La concentración ( $\log \mu\text{M}$ ) es función de la proporción entre los módulos de impedancia de los nanoelectrodos PPy-OH/PPy-CP y PPy-OH/PPy-M5, funcionalizados en la posición 3. Medidos con una concentración de concentración diana de  $0,1 \mu\text{M}$ , la proporción entre los módulos de impedancia es de 8, y con una concentración de  $1 \text{ nM}$  de moléculas diana, la proporción entre los módulos de impedancia es de 2.

Conclusión: para una concentración de oligonucleótidos diana de  $1 \text{ nM}$ , la proporción entre los módulos de impedancia a una frecuencia de 1 Hz es de 2. Por lo tanto, esta técnica permite disminuir la concentración de los oligonucleótidos diana en intervalo de  $10^3$  antes de aproximarse al límite de detección, que se obtiene a un factor de 1 de la proporción entre los módulos de los CP y M5.

La fig. 11 muestra dos voltamperogramas relativos a un nanoelectrodo consistente en un copolímero PPy-OH/PPy-CP funcionalizado en 3 después de la hibridación y la precipitación, y en el otro lado sobre un nanoelectrodo de control negativo consistente en un copolímero PPy-OH/PPy-M5 funcionalizado en su posición 3. La concentración del CP-bio diana era  $1 \text{ nM}$ . La intensidad medida del pico de oxidación de la respuesta del nanoelectrodo PPy-OH/PPy-CP (3) es más débil que la del nanoelectrodo PPy-OH/PPy-M5 que no tiene precipitado. La proporción entre la intensidad del pico de oxidación de los nanoelectrodos CP y M5 a un potencial de  $-50 \text{ mV}$  es de aproximadamente 1,6. Se mantiene lo mismo para el pico de reducción, que está situado alrededor de los  $-180 \text{ mV}$ . Por lo tanto, esta técnica electroquímica permite también diferenciar entre nanoelectrodos positivos (CP) y nanoelectrodos negativos (M5).

La fig. 12a muestra las medidas de impedancia del tampón del sustrato. Esto permite seguir la evolución de la reacción de precipitación durante el tiempo de reacción. Sobre el nanoelectrodo consistente en el copolímero PPy-OH/PPy-M5 (3) en el que no se produjo hibridación, el diagrama de Bode, que muestra el módulo de impedancia en función de la frecuencia, se desarrolla con respecto al tiempo de reacción sólo levemente. La conductividad de los nanoelectrodos poliméricos no está por lo tanto alterada.

La fig. 12b muestra el cambio en la conductividad eléctrica en un diagrama de Bode durante la precipitación de BCIP/NBT sobre nanoelectrodos poliméricos de un copolímero PPy-OH/PPy-CP funcionalizado en 3. El diagrama en curva de la fig. 12b es una función de la frecuencia en Hz frente al módulo de impedancia en kHz. La concentración de las moléculas diana era de  $1 \text{ nM}$  (CP-bio) y la longitud de los nanoelectrodos era de  $180 \text{ nm}$ .

Con el nanoelectrodo copolimérico PPy-OH/PPy-CP funcionalizado en 3 en el que tuvo lugar una hibridación, la curva obtenida a partir del módulo de impedancia en función de la frecuencia se desarrolla durante un tiempo de aproximadamente 40 minutos. Para cada frecuencia en el intervalo de entre 1 y  $100 \text{ Hz}$ , el valor del módulo se duplica durante este tiempo de reacción. Este aumento está relacionado con la cinética del precipitado formado sobre el nanoelectrodo como consecuencia de la hibridación del oligonucleótido.

## Ejemplos

### Abreviaturas y definiciones

ECS: electrodo de calomelanos saturado (electrodo de referencia)

CP: oligonucleótido para el control positivo con la siguiente secuencia:

5' TTT TTT TTT TGC CTT GAC GAT ACA GCT A 3'

CP-biotina (CP-bio): oligonucleótido complementario biotinilado de CP con la siguiente secuencia:

5' biotina - T AGC TGT ATC GTC AAG GCA 3'

## ES 2 298 730 T3

|    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | M5                        | oligonucleótido para el control negativo; con la siguiente secuencia:<br>5' TTT TTT TTT TTT GGA GCT GCT GGC G 3'                                                                                                                                    |
| 5  | M5-biotina (M5-bio)       | oligonucleótido complementario biotinilado de M5; con la siguiente secuencia:<br>5' biotina - C GCC AGC AGC TCC AAA 3'                                                                                                                              |
|    | ODN                       | oligonucleótido                                                                                                                                                                                                                                     |
| 10 | TH1X                      | TH1X es una disolución tampón consistente en <13,3 g/l de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 29,22 g/l de NaCl, 20 g/l de PEG 4000, 6,5% de Tween 20, 1 g/l de gelatina, 14% de ADN de esperma de arenque, 10 mg/ml, con aplicación de ultrasonidos |
| 15 | TR:                       | TR es un tampón de lavado consistente en 8 g/l de NaCl; 0,2 g/l de KCl; 0,76 g/l de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,19 g/l de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5% de tween 20; EDTA 1 mM.                                                   |
|    | PAL                       | fosfatasa alcalina                                                                                                                                                                                                                                  |
| 20 | BM púrpura sustrato de AP | sustrato cromogénico para la fosfatasa alcalina, (Roche Applied Substrate)                                                                                                                                                                          |
|    | CV                        | voltimetría cíclica.                                                                                                                                                                                                                                |

La celda electroquímica usada en el siguiente ejemplo 2 es una celda Micam con un volumen de 1 ml con un contraelectrodo de platino (diámetro: 4 mm). La estructura global tiene 3 electrodos. Para el ejemplo 3 no se usó celda electroquímica. Se aplica una gotita de 50  $\mu$ l de disolución electrosintetizada en el biochip, que tenía integrado un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

### Ejemplo 1

#### 1. Electropolimerización de polipirrol funcionalizado en nitrógeno para obtener nanoelectrodos

Todos los copolímeros son electrosintetizados con un potencial aplicado de +1 V frente a (ECS) a partir de una disolución acuosa de LiClO<sub>4</sub> 0,1 M que contiene monómeros de pirrol 20 mM y un monómero oligonucleotídico de pirrol 5  $\mu$ M (CP o M5). El homopolímero de polipirrol también fue electrosintetizado con un potencial aplicado de +1 V frente a ECS a partir de una disolución de pirrol 20 mM. Se usó una celda Micam como celda electroquímica.

Junto con los nanoelectrodos poliméricos se proporcionaron 9 puntos en una disposición circular (OLISA™) consistentes en círculos metálicos de una capa de oro sobre cada biochip consistente esencialmente en un material plástico. Los puntos están conectados mediante el medio habitual a unidades de control externas.

Se sintetizaron 4 puntos con cadenas de copolímeros de polipirrol/polipirrol-CP (Qs = 55  $\mu$ C; Qs = 70  $\mu$ C; Qs = 40  $\mu$ C; Qs = 100  $\mu$ C), cuatro puntos de copolímero de polipirrol/polipirrol-M5 (Qs = 55  $\mu$ C; Qs = 70  $\mu$ C; Qs = 40  $\mu$ C; Qs = 100  $\mu$ C) y un punto de homopolímero de polipirrol sin biomolécula sonda (Qs = 60  $\mu$ C). Después de la deposición de los nanoelectrodos poliméricos sobre cada punto, se midió la respuesta electroquímica de cada polímero mediante medidas voltamétricas cíclicas (CV) en una disolución acuosa de LiClO<sub>4</sub> 0,1 M variando los potenciales entre -0,2 V y +0,6 V frente a ECS. A continuación cada punto se analizó con un tampón de hibridación.

#### Hibridación

La hibridación de las cinco sondas M5 se realizó incubando el biochip en una disolución que comprende ODN M5 biotina diana con una concentración de 0,5  $\mu$ M durante 30 min.

A continuación se analizó cada punto mediante VC con un tampón de hibridación variando los potenciales entre -0,2 V y +0,6 V frente a ECS.

Después de medir cada punto, el biochip se lavó cuatro veces con un tampón de lavado.

Sobre cada punto se añadió una gotita de una disolución de estreptavidina fosfatasa alcalina (PAL) que estaba diluida 100 veces. El biochip se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, el biochip se lavó cuatro veces con el tampón de lavado.

#### Precipitación

Sobre cada punto se aplicó una gotita de una disolución de BM púrpura sustrato de AP. El biochip se dejó durante una hora (incubación) a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, el biochip se lavó cuatro veces con el tampón de lavado. El tampón de lavado consistía en 8 g/l de NaCl; 0,2 g/l de KCl; 0,76 g/l de Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,19 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5% de Tween 20; EDTA 1 mM.

Sobre cada punto M5 apareció un depósito o precipitado azul.

Cada película fue analizada mediante CV con una nueva disolución de disolución tampón de hibridación variando los potenciales entre -0,2 V y +0,6 V frente a ECS.

## Ejemplo 2

Se prepararon cuatro biochips que comprendían cada uno 9 puntos. En cada chip, 4 puntos fueron provistos con nanoelectrodos copoliméricos consistentes en PPY/PPY-CP funcionalizados en la posición N, 4 puntos fueron provistos con nanoelectrodos copoliméricos consistentes en PPY/PPY-M5 funcionalizados en la posición N. Un punto consistió únicamente en oro puro, y es el contraelectrodo.

La síntesis de los nanoelectrodos poliméricos conductores eléctricos se realizó con un potencial aplicado de + 0,9 V frente a ECS. La disolución para la electrosíntesis de los copolímeros era de LiClO<sub>4</sub> 0,1 M en agua que contenía pirrol monomérico 20 mM y un pirrol monomérico 5 μM funcionalizado con oligonucleótido (CP o M5). La celda electroquímica era una celda Micam con tres electrodos.

El biochip 1 se sintetizó ( $Q_s = 20 \text{ mC} \times \text{cm}^{-2}/\text{punto}$ ) con una longitud del nanoelectrodo polimérico de 40 nm. El biochip 2 se sintetizó ( $Q_s = 30 \text{ mC} \times \text{cm}^{-2}/\text{punto}$ ) con una longitud del nanoelectrodo polimérico de 60 nm. El biochip 3 se sintetizó ( $Q_s = 40 \text{ mC} \times \text{cm}^{-2}/\text{punto}$ ) con una longitud del nanoelectrodo polimérico de 80 nm. El biochip 4 se sintetizó ( $Q_s = 10 \text{ mC} \times \text{cm}^{-2}/\text{punto}$ ) con una longitud del nanoelectrodo polimérico de 20 nm.

## Hibridación

Se incubó 1 μl de ODN-biotina (ODN = CP o M5, cada uno a 10 μM) en 99 μl de tampón TH1X durante 1 h a 37°C. La concentración final de ODN-biotina era de 0,1 μM). Los biochips 1 y 3 se incubaron con CP-biotina, mientras que los biochips 2 y 4 se incubaron con M5-biotina.

## Etiquetado

Se aplica una gotita de 30 μl de complejo de estreptavidina-PAL (0,4 μl de Ci = 1 mg/ml) diluida en 30 μl de tampón de hibridación sobre cada biochip, seguido de una incubación durante 5 min a temperatura ambiente y un lavado con tampón de lavado (TR).

## Precipitación

Se aplica una gotita de 30 μl de disolución de BM púrpura sustrato de AP sobre cada biochip, seguido de una incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente seguida por lavar 4 veces con TR.

Apareció un precipitado azul sobre cada punto hibridado en el que tuvo lugar una reacción de hibridación.

## Análisis de los nanoelectrodos poliméricos con respecto a su longitud media

El análisis de los nanoelectrodos poliméricos de los biochips 1 a 4 se llevó a cabo mediante voltametría cíclica tras la precipitación. Se midió la respuesta electroquímica de cada punto con una velocidad de barrido de 10 mV/s en una disolución acuosa de LiClO<sub>4</sub> 0,1 M variando el potencial en un intervalo entre -0,1 V y + 0,5 V frente a ECS.

La tabla 1 muestra la influencia del precipitado sobre los nanoelectrodos copoliméricos consistentes en el PPY/PPY-ODN funcionalizado en nitrógeno con longitud variable. La tabla 1 muestra los valores de intensidad de los picos de oxidación de las respuestas voltamperométricas obtenidas sobre nanoelectrodos copoliméricos de PPY/PPY-ODN funcionalizados en nitrógeno después de la hibridación y la precipitación. La medida de referencia está representada por el nanoelectrodo copolimérico PPY/PPY-M5 en el que no tuvo lugar la hibridación, y consecuentemente, no se formó precipitado. Se obtiene una intensidad menos importante, en el intervalo del 20-30%, sobre los nanoelectrodos poliméricos en los que tuvo lugar la hibridación y la formación de un precipitado aislante. Los valores muestran que la longitud del nanoelectrodo polimérico juega un papel importante en la sensibilidad de la medida. Los nanoelectrodos se prepararon con una longitud media de 20 nm. La oxidación Ip del punto no hibridado era de 35 nA (a un E = +0,35 V/ECS), mientras que la oxidación Ip del punto hibridado con precipitado era de 27 nA (a un E = +0,35 V/ECS).

TABLA 1

|                                                      | Longitud del nanoelectrodo polimérico de polímeros PPy/PPy-ODN funcionalizados en N |       |       |       |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                                                      | 20 nm                                                                               | 40 nm | 60 nm | 30 nm |
| <b>intensidad (nA) precipitación punto hibridado</b> | 27                                                                                  | 33    | 49    | 50    |
| <b>intensidad (nA) punto no hibridado</b>            | 35                                                                                  | 45    | 65    | 73    |
| <b>proporción entre la intensidad CP/M5 (%)</b>      | 23                                                                                  | 27    | 25    | 32    |

La tabla 1 también muestra la influencia del precipitado sobre un nanoelectrodo copolimérico con una longitud media de 40 nm. La oxidación  $I_p$  del punto no hibridado era de 45 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS), mientras que la oxidación  $I_p$  del punto hibridado con precipitado era de 33 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS).

La tabla 1 también muestra la influencia del precipitado sobre un nanoelectrodo copolimérico con una longitud media de 60 nm. La oxidación  $I_p$  del punto no hibridado era de 65 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS), mientras que la oxidación  $I_p$  del punto hibridado con precipitado era de 49 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS).

Además, también se muestra en la tabla 1 la influencia del precipitado sobre un nanoelectrodo copolimérico con una longitud media de 80 nm. La oxidación  $I_p$  del punto no hibridado era de 73 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS), mientras que la oxidación  $I_p$  del punto hibridado con precipitado era de 50 nA (a un  $E = +0,35$  V/ECS).

La intensidad más importante observada para un nanoelectrodo copolimérico PPy/PPy-CP funcionalizado en nitrógeno con respecto a un nanoelectrodo copolimérico ciego PPy/PPy-M5 (funcionalizado en la posición N) se obtiene con nanoelectrodos poliméricos con una longitud de 80 nm. En este caso, la intensidad es aproximadamente un 30% más débil. Por lo tanto, la longitud óptima de la cadena en el caso de un nanoelectrodo copolimérico funcionalizado en nitrógeno es de alrededor de 50-160 nm, muy preferida entre 80-120 nm. La formación de un precipitado aislante sobre la superficie de un nanoelectrodo polimérico largo influye en la medida de los nanoelectrodos poliméricos. Cuanto más largos son los nanoelectrodos poliméricos, más fácil es que el precipitado se inserte entre los nanoelectrodos poliméricos largos y que disminuya considerablemente la conductividad iónica.

Es importante mostrar la influencia del estado de oxidación de los nanoelectrodos poliméricos, su longitud y su estructura (posición de la funcionalización por los oligonucleótidos) sobre su conductividad. El ajuste de la conductividad de los nanoelectrodos poliméricos es una de las principales ventajas del presente modo de fijación con respecto a otros procedimientos de inmovilización de oligonucleótidos conocidos en la materia. Las figuras 4, 5 muestran el resultado de las medidas de espectroscopía de impedancia sobre unos nanoelectrodos poliméricos PPy/PPy-CP funcionalizados en nitrógeno.

Adicionalmente, la posición de la sustitución de los oligonucleótidos en los pirroles monoméricos también permite modular la conductividad de los nanoelectrodos poliméricos resultantes (fig. 6). Las diferentes posibles interacciones entre los sustituyentes pueden provocar una torsión de las cadenas poliméricas. La estructura de un polímero funcionalizado en 3 es más favorable para la conductividad eléctrica porque la torsión es menos importante. La transferencia electrónica de la cadena mejora, y la conductividad de los nanoelectrodos copoliméricos funcionalizados mejora considerablemente en comparación con un copolímero funcionalizado en N.

Las medidas se han realizado en una jaula de Faraday con objeto de minimizar el ruido de fondo. Se usó un filtro para una corrección de la estabilidad. Para cada frecuencia se ha hallado la media de tres medidas ( $N_a = 3$ ). El experto en la materia puede seleccionar el potencial aplicado sobre el electrodo mediante las medidas habituales. El intervalo de frecuencia seleccionado está en el orden de 100 kHz - 0,1 Hz. La amplitud de la entrada sinusoidal señalizada se eligió a aproximadamente 40 mV.

La conductividad de los nanoelectrodos poliméricos puede mejorarse aumentando el estado de oxidación de las cadenas poliméricas (fig. 4). La estructura electrónica de los nanoelectrodos poliméricos del tipo polipirrol está correlacionada con el potencial de oxidación impuesto. La movilidad de las cargas en la cadena conjugada del polímero aumenta mediante un aumento en el potencial de oxidación. Sin embargo, las medidas de impedancia se están haciendo menos estables si las cadenas no están cercanas a su potencial de equilibrio.

La longitud de los nanoelectrodos poliméricos influye sobre la impedancia medida (fig. 5).

La longitud de los nanoelectrodos poliméricos influye sobre la impedancia medida de tal forma que cadenas más largas dan como resultado una medida de impedancia disminuida. Esto significa que las cadenas poliméricas largas son más conductores eléctricos que las cadenas poliméricas cortas.

## Ejemplo 3

*Material*

5 Los nanoelectrodos poliméricos fueron electrosintetizados mediante una gotita de 50  $\mu\text{l}$  aplicada sobre el chip que tenía integrados un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

Como potenciostato se usó un VMP-2 de cuatro canales (Bio-logic Grenoble, Francia), los programas informáticos para las medidas de cronoamperometría y de impedancia fueron: EGG y Bio-logic. Los nanoelectrodos poliméricos se electrosintetizaron sobre un sustrato según se explicó en el ejemplo 2, con un potencial aplicado de +0,75 V/ECS. La disolución para la electrosíntesis de los nanoelectrodos copoliméricos era  $\text{LiClO}_4$  0,1 M en agua que contenía monómero de pirrol-OH funcionalizado en la posición 3 0,1 M, y monómero de pirrol-ODN funcionalizado en la posición 3 (CP y M5) 25  $\mu\text{M}$ . Se sintetizaron cuatro puntos con los nanoelectrodos copoliméricos PPY-OH/PPY-CP y cuatro puntos con los nanoelectrodos copoliméricos PPY-OH/PPY-M5. La longitud de los nanoelectrodos poliméricos sobre cada punto era diferente.

La hibridación se realizó como sigue:

20 incubación durante 1 h a temperatura ambiente seguida por la adición de la disolución de hibridación

[ODN-bio]1 = 1  $\mu\text{M}$

o

25 [ODN-bio]2 = 0,1  $\mu\text{M}$

o

30 [ODN-bio]3 = 1 nM

*Procedimiento de marcaje*

35 Incubación durante 5 min a temperatura ambiente a una gotita de 30  $\mu\text{l}$  de una disolución de estreptavidina fosfatasa alcalina (PAL) (concentración de PAL como 1 mg/ml), esto es, 0,4  $\mu\text{l}$  de PAL y 30  $\mu\text{l}$  de THIX, que rindieron 400 ng/gotita sobre el biochip (8 puntos).

*Procedimiento de precipitación*

40 La posición de una disolución de BM púrpura sustrato de AP sobre el biochip seguida por una incubación de 40 min a temperatura ambiente sin exposición a la luz.

Después de la etapa de incubación, los puntos y el biochip se lavaron con un tampón de lavado (TR).

45 *Medidas de impedancia*

Las medidas de impedancia se realizaron sobre puntos de cada nanoelectrodo polimérico del biochip (cuatro puntos positivos (CP) y cuatro puntos ciegos (M5) en  $\text{LiClO}_4$  0,1 M después de la precipitación.

50 Las medidas de impedancia se realizaron en las mismas condiciones a las indicadas en el ejemplo 2.

La fig. 7 muestra la variación en la comparación de las respuestas de impedancia de los denominados nanoelectrodos copoliméricos positivos en los que tuvieron lugar la hibridación y la precipitación, y la respuesta de los nanoelectrodos copoliméricos negativos de calibrado en los que no tuvo lugar la hibridación. Antes de la hibridación, la respuesta electroquímica de ambos nanoelectrodos copoliméricos es idéntica. Por lo tanto, incluso la secuencia oligonucleotídica fijada (CP o M5) no influye sobre la conductividad de los nanoelectrodos poliméricos.

Las medidas de impedancia después de la hibridación y la precipitación (fig. 8) confirman que la formación de un precipitado aislante sobre los nanoelectrodos poliméricos bloquea la transferencia iónica y la transferencia electrónica en la interfase nanoelectrodos poliméricos/disolución. La conductividad del nanoelectrodo polimérico se ve fuertemente afectada, incluso para una cantidad muy pequeña de precipitado, lo que se correlaciona con una cantidad pequeña de oligonucleótidos diana hibridados. Esta técnica electroquímica está perfectamente adaptada al sistema seleccionado, la precipitación de un sustrato aislante, para detectar la hibridación de los oligonucleótidos. Para una longitud de nanoelectrodo de aproximadamente 120 nM, se encontró que el precipitado estaba insertado considerablemente entre la pluralidad individual de electrodos poliméricos, y disminuía su conductividad.

## ES 2 298 730 T3

Las variaciones en la conductividad eléctrica de los nanoelectrodos copoliméricos son más importantes cuando se usan frecuencias débiles de entre 1 y 100 Hz (fig. 9).

La sensibilidad de detección es del orden de 1 pM, lo que es aproximadamente  $10^8$  moléculas/mL (fig. 10).

Las medidas de impedancia pueden llevarse a cabo en el sustrato tampón (figuras 12). Por lo tanto, es posible seguir la evolución de la reacción de precipitación en tiempo real. La detección de la hibridación a través de la medición cinética de la precipitación es más rápida y más fiable, como el procedimiento comparativo de la medida de los módulos de impedancia de los nanoelectrodos copoliméricos de calibración y los nanoelectrodos copoliméricos positivos.

También se ha llevado a cabo un estudio de voltamperometría cíclica sobre nanoelectrodos copoliméricos funcionalizados en 3 para una concentración de un CP-bio diana de 1 nM (fig. 11). La intensidad de los picos de oxidación medidos sobre la respuesta de un nanoelectrodo copolimérico CP es un 40% más débil que las medidas para el nanoelectrodo copolimérico M5. Esta pérdida en la intensidad se correlaciona directamente con una disminución de la conductividad de los nanoelectrodos poliméricos. Esto es una consecuencia directa de la formación de un precipitado aislante sobre la superficie de los nanoelectrodos poliméricos. Mediante esta técnica, también es posible detectar y cuantificar el fenómeno de hibridación. Se entiende que esta técnica también permite cuantificar ensayos con proteínas o haptenos siempre que los ligandos específicos sean accesibles. Sin embargo, la sensibilidad disminuye ligeramente cuando se compara con la espectroscopía de impedancia. Esta última técnica de detección es por lo tanto preferida debido a su facilidad de uso y también por la posibilidad de una miniaturización de los aparatos de medida.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar una biomolécula diana en una muestra que comprende una pluralidad de biomoléculas, mediante el cual la biomolécula diana es provista directa o indirectamente con una etiqueta, que está unida a un agente generador de señal, comprendiendo dicho agente generador de señal una fracción catalítica activa que cataliza la transformación de una especie soluble adicional en un precipitado insoluble, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar un soporte sólido con una pluralidad de ubicaciones espacialmente diferentes dispuestas en su superficie, mediante lo cual al menos una ubicación es conductora eléctrica, y una pluralidad de nanoelectrodos flexibles individuales con biomoléculas sonda fijadas a los mismos unidas a dicha ubicación,
- b) poner la muestra en contacto con el soporte sólido que comprende dichas biomoléculas sonda, interactuando así la biomolécula sonda y la biomolécula diana,
- c) añadir la especie esencialmente soluble,
- d) transformar la especie soluble en el precipitado insoluble, formando un depósito esencialmente sobre o en los nanoelectrodos, disminuyendo así la flexibilidad de los nanoelectrodos
- e) medir la conductividad eléctrica de la pluralidad de nanoelectrodos en al menos una ubicación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el valor de la conductividad eléctrica obtenida en la etapa e) se compara con un valor obtenido antes de la etapa e).

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el cambio en la conductividad eléctrica se mide mediante un procedimiento elegido del grupo formado por medidas amperométricas, voltimetría de pulso diferencial, cronoamperometría, medidas de impedancia.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la fracción catalítica activa es un biocatalizador.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el biocatalizador es una enzima.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la enzima se elige del grupo formado por oxidasas, peroxididasas, reductasas y deshidrogenasas, es muy preferido que la enzima sea una peroxidasa o una fosfatasa.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la etiqueta comprende adicionalmente un complejo de biotina/avidina o de biotina/estreptavidina.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizado** porque se fija una única biomolécula sonda a cada nanoelectrodo.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 8 ó 9, **caracterizado** porque se fijan dos o más biomoléculas sonda a cada nanoelectrodo, en el que las biomoléculas sonda son iguales o diferentes.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la biomolécula sonda se elige del grupo formado por oligonucleótidos, polipéptidos, proteínas, antígenos, anticuerpos, enzimas, receptores y carbohidratos.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la biomolécula sonda y/o todos o una porción de los nanoelectrodos comprenden adicionalmente un grupo donante de electrones.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el grupo donante de electrones comprende un complejo de un metal de transición.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el soporte sólido es conductor eléctrico o es un aislante depositado sobre una capa conductora.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la biomolécula diana es un oligonucleótido que comprende un segmento que es parcialmente complementario de la molécula sonda.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la etiqueta unida a una primera especie de detección.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la primera especie de detección es un oligonucleótido.

## ES 2 298 730 T3

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el oligonucleótido comprende un segmento que es parcialmente complementario de la biomolécula diana.

18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la especie esencialmente soluble se elige del grupo formado por 5-bromo-4-cloro-3-fosfato-1H-indol (BCIP), cloruro de azul de nitrotetrazolio (*nitrobluetetrazolium chloride*, NBT), dimetilbencidina, diaminobencidina, 4-cloronaftol, 3-amino-3-etilcarbazol, tetrametilbencidima (TMB).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

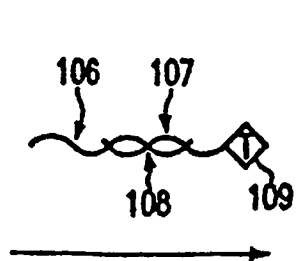
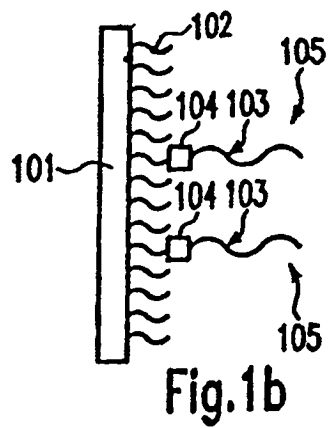
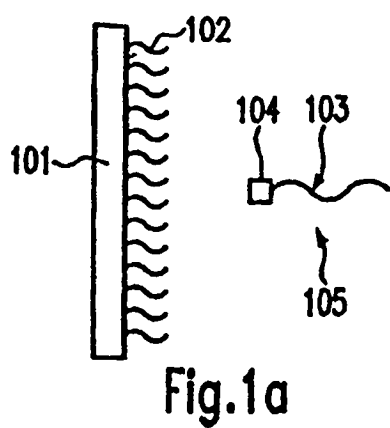


Fig. 1c

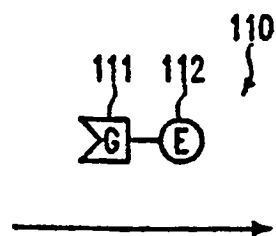
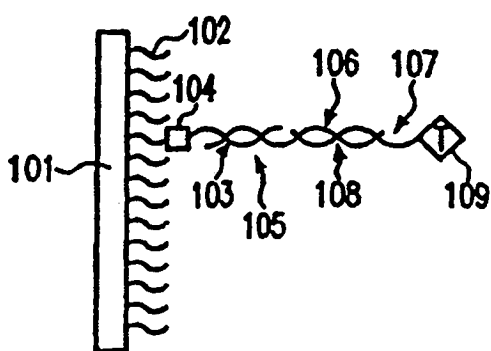


Fig. 1d

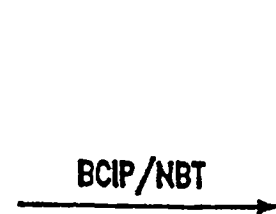
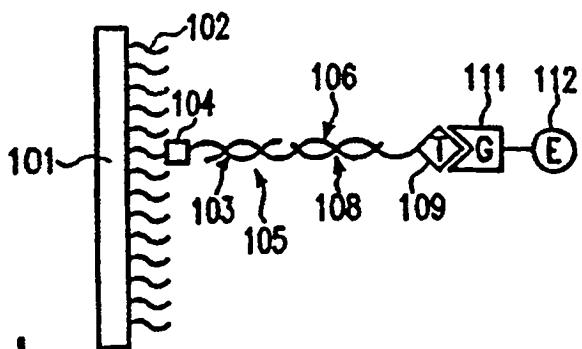
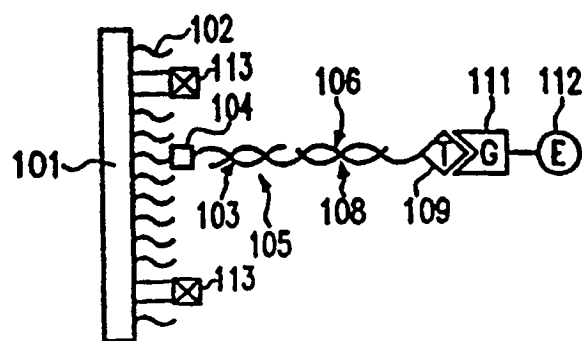


Fig. 1e



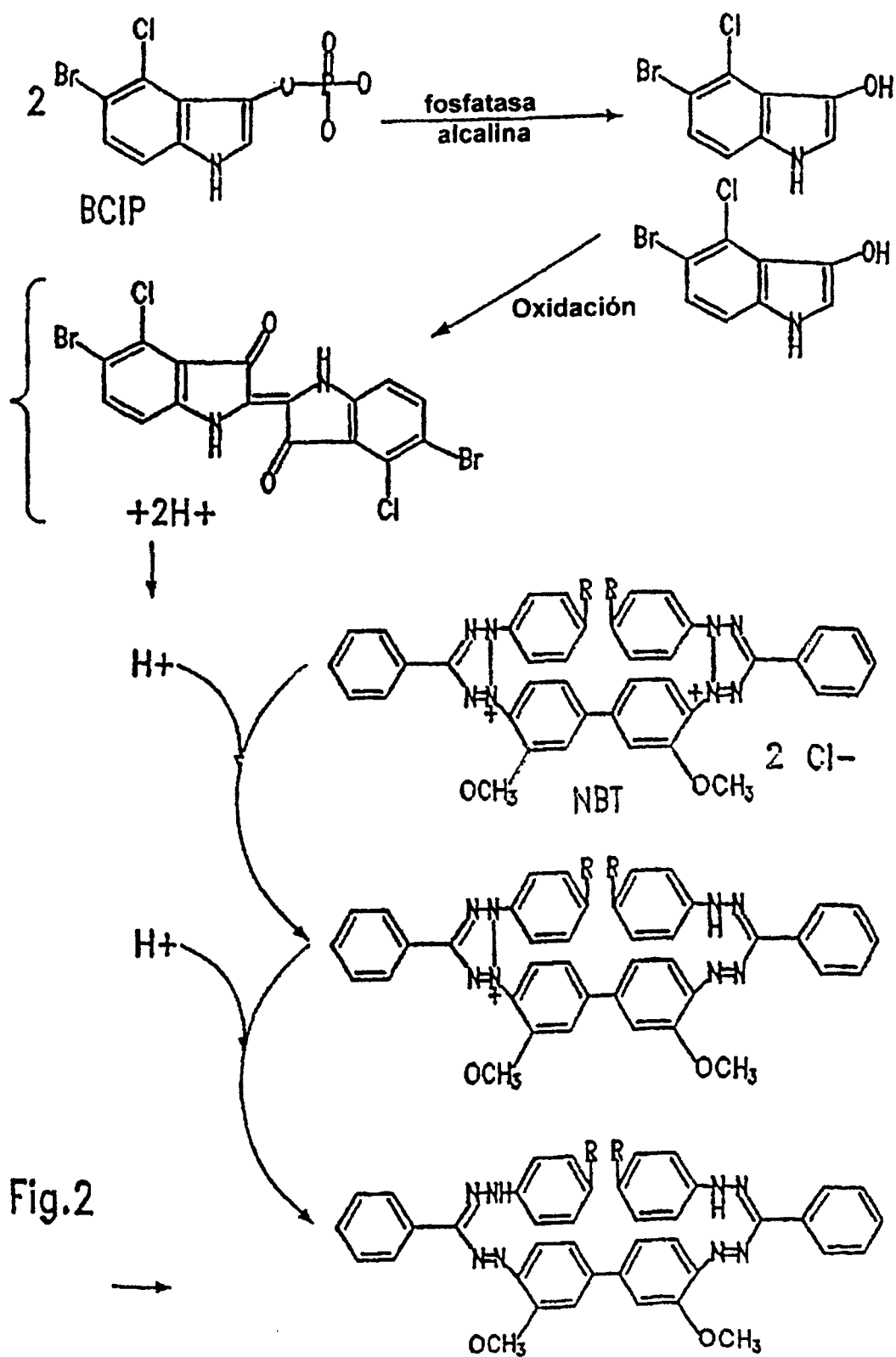


**Figura 3**

**Figura 3a**

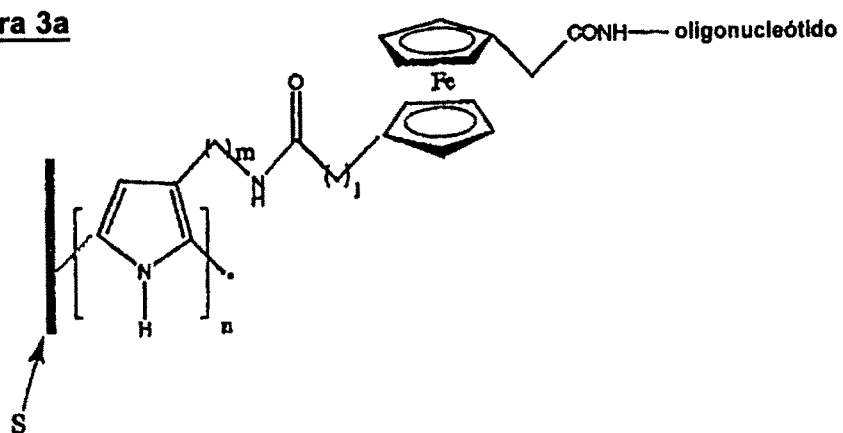


**Figura 3b**

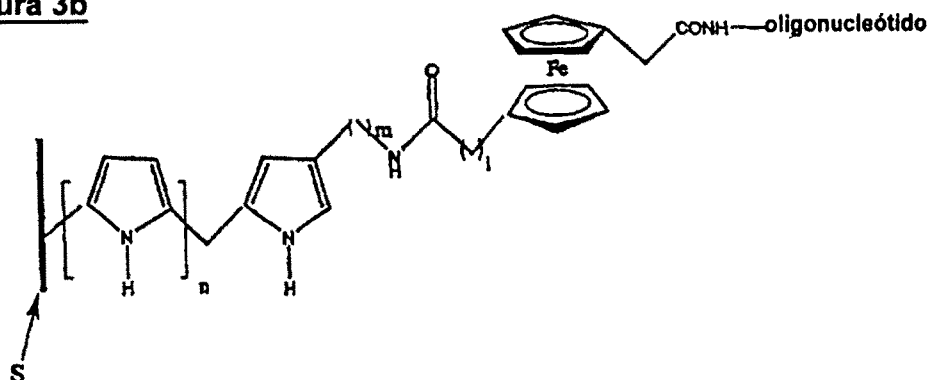


Figura 4

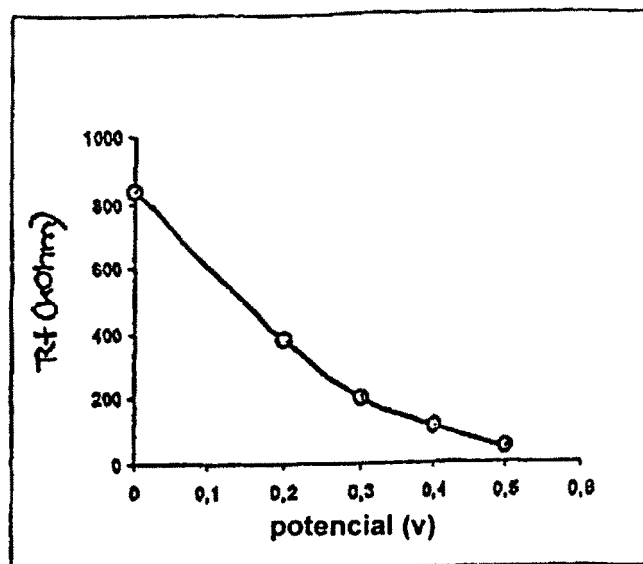


Figura 5

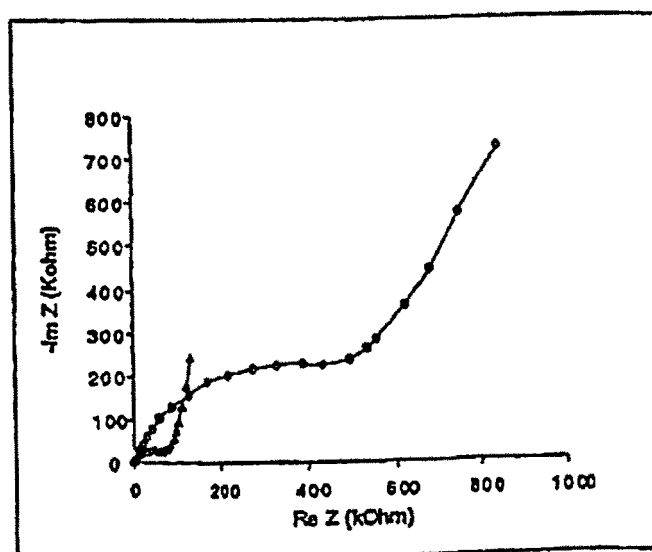


Figura 6

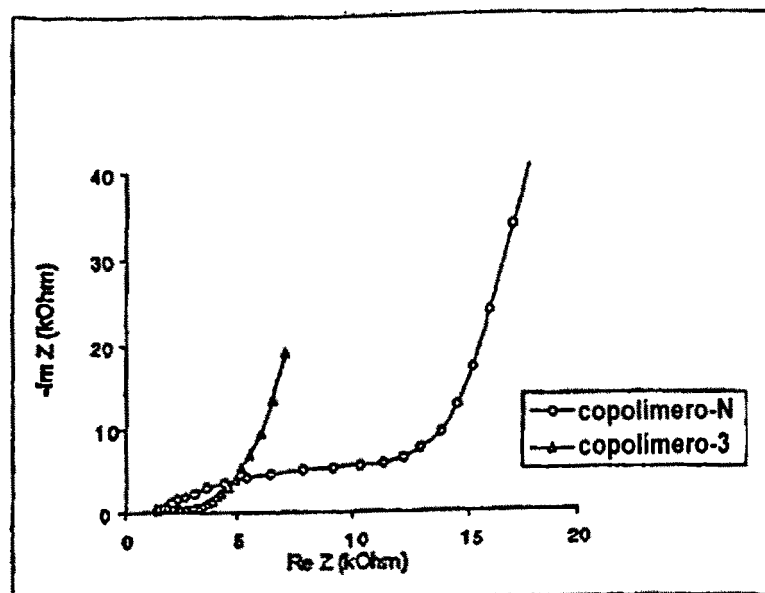


Figura 7

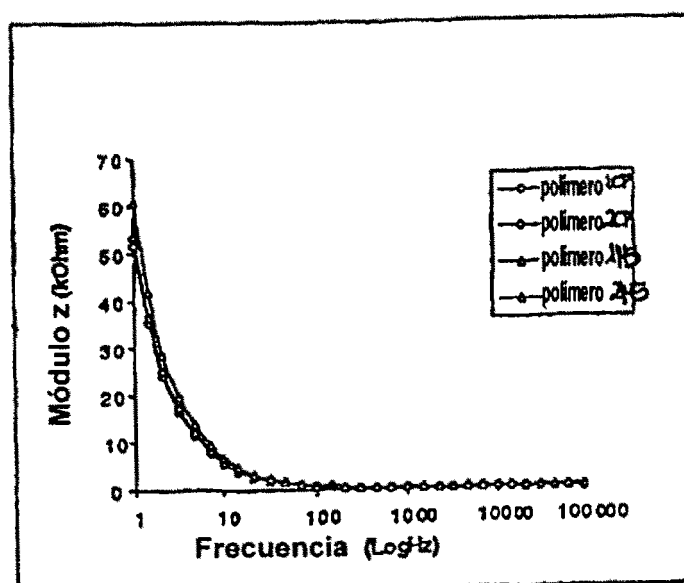


Figura 8

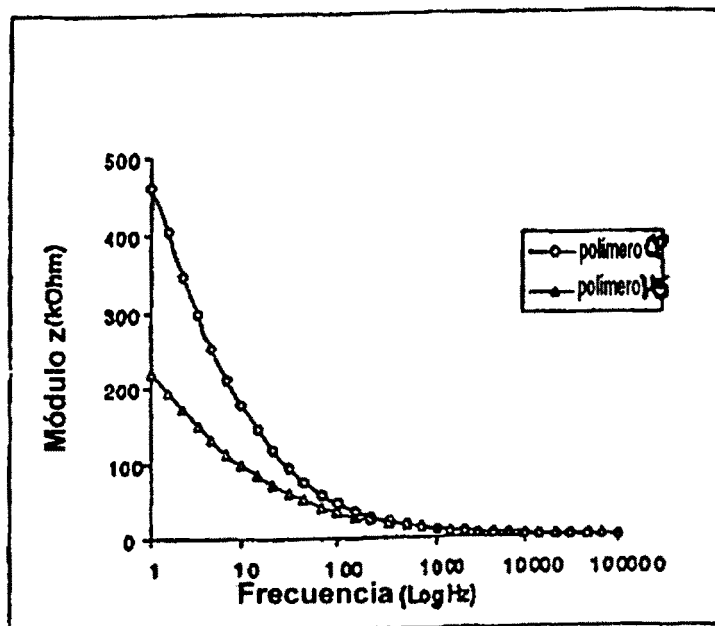


Figura 9

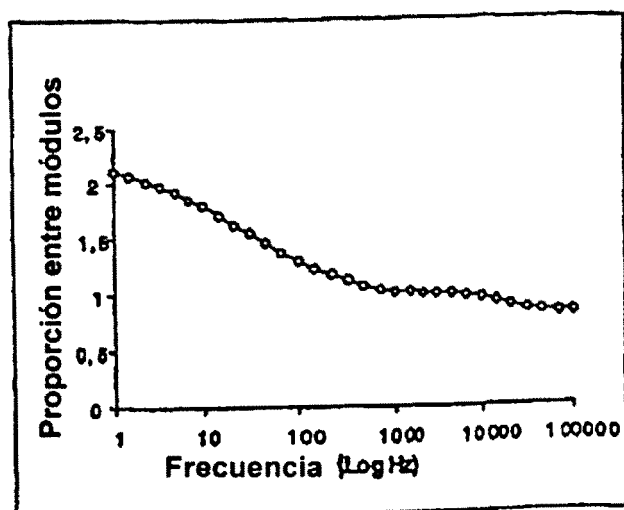


Figura 10

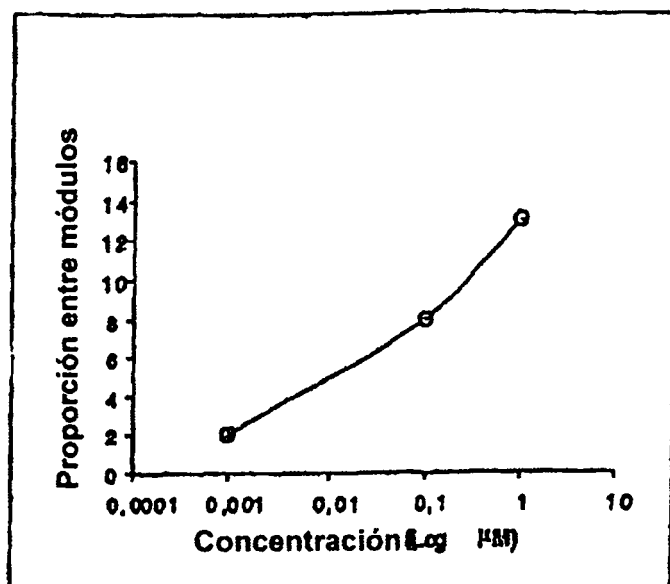


Figura 11

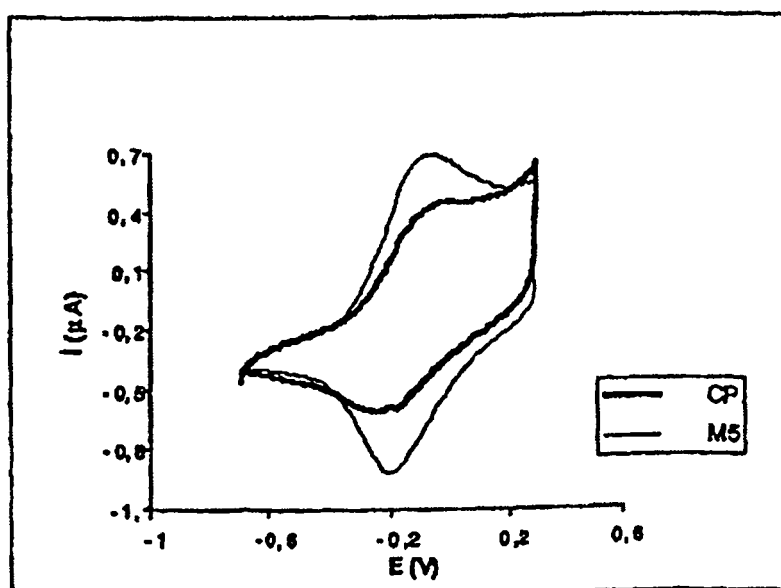


Figura 12a

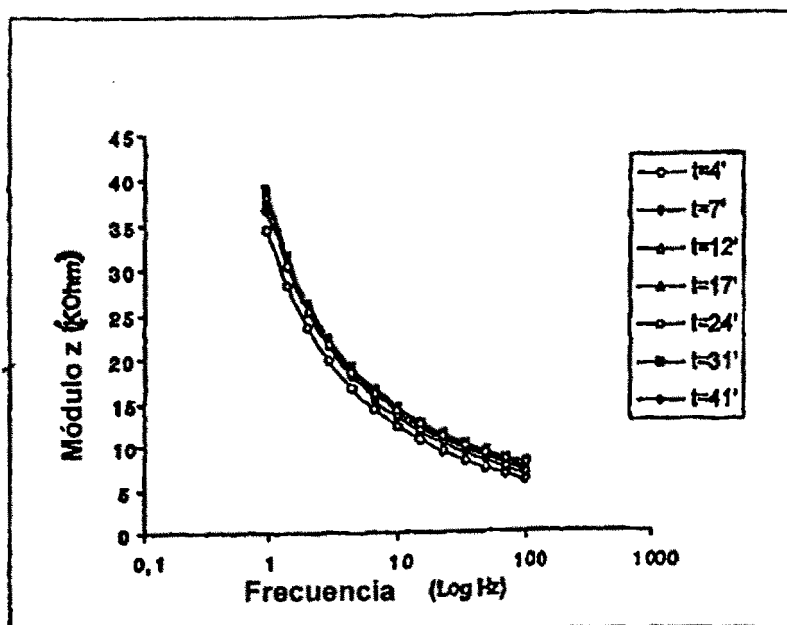
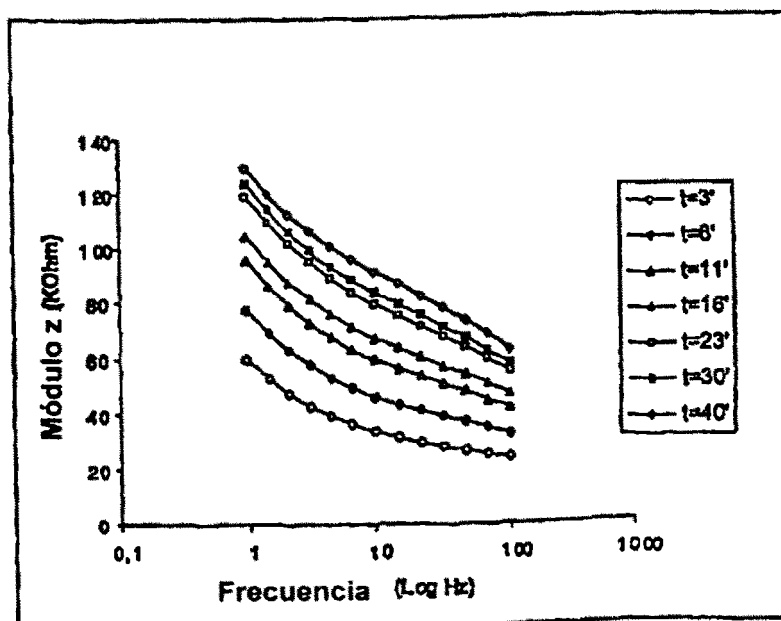


Figura 12b



# ES 2 298 730 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> APIBIO SAS

5 <120> Procedimiento y dispositivo para detectar biomoléculas

<130> PCT/EP04/002685

10 <140> PCT/EP04/002685

<141> 2003-03-15

<150> DE 103 11 315.0

15 <151> 2003-03-14

<160> 4

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 28

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: CP (oligonucleótido para el control positivo)

<400> 1

35 tttttttt gccttgacga tacagcta

28

<210> 2

<211> 20

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: CP Biotina) (oligonucleótido biotinilado complementario de CP)

<220>

50 <221> misc\_ feature

<222> (1) .. (1)

<223> N = biotina

55 <400> 2

ntagctgtat cgtcaaggca

20

60 <210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: M5 (oligonucleótido para el control negativo)

## ES 2 298 730 T3

<400> 3

tttttttt ttggagctgc tggcg 25

5

<210> 4

<211> 17

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: M5-biotina (M5-bio) (oligonucleótido biotinilado complementario de M5)

15

<220>

<221> misc\_feature

20 <222> (1)..(1)

<223> N = biotina

<400> 4

25

ncgccagcag ctccaaa 17

30

35

40

45

50

55

60

65