

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 586**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012 E 17207095 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3369828**

54 Título: **Biosondas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

07.02.2011 US 201161440336 P

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

13.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KELLEY, SHANA, O.;
FANG, ZHICHAO y
VASILYEVA, ELIZAVETA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 818 586 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biosondas y métodos de uso de las mismas

CAMPO TÉCNICO

5 La presente descripción se refiere generalmente a biosensores, matrices de biosensores, sondas para biosensores y a un método para detectar biomarcadores usando un biosensor. La descripción también se refiere a biosondas basadas en biomoléculas que se han reducido o están libres de agregación. Las biosondas basadas en biomoléculas pueden usarse además junto con un sistema informador electroquímico para detectar pequeñas cantidades de marcadores biológicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La detección y análisis de bajas concentraciones de analitos en diversos entornos biológicos y orgánicos se está volviendo cada vez más importante. Para que un enfoque de detección sea útil no solo para el diagnóstico, sino también para monitorizar niveles bajos de enfermedad residual, los límites de detección deben alcanzar actualmente niveles bajos, por ejemplo, niveles femtomolares, para lograr la detección de analitos escasos en muestras clínicas con un nivel aceptablemente bajo de falsos negativos. Se requieren altos niveles de especificidad para garantizar
15 bajos niveles de falsos positivos. Desde una perspectiva práctica, igualmente importante es un enfoque simplificado para el procesamiento de muestras, ya que la necesidad de un procesamiento de muestras extenso puede abrumar los beneficios de la alta sensibilidad y especificidad innatas de un sensor.

El análisis cualitativo generalmente se limita a los niveles de concentración más altos, mientras que el análisis
20 cuantitativo normalmente requiere el marcaje con un radioisótopo o reactivo fluorescente. Tales procedimientos generalmente requieren mucho tiempo y son inconvenientes. Los avances recientes en el desarrollo de sistemas de análisis de marcadores biológicos bioelectrónicos abren nuevas oportunidades para el diagnóstico molecular y han atraído importantes esfuerzos de investigación (Boon, E. M., et al., *Nat. Biotechnol.*, 18, 1096, 2000; Rodriguez, M. y Bard, A., *J. Anal. Chem.*, 62, 1658, 1990). Se han dado a conocer métodos de transducción ópticos (Jordan, C. E., et al., *Anal. Chem.*, 69, 4939, 1997; Fotin, A. V., et al., *Nucleic Acids Res.*, 26, 1515, 1998), electroquímicos (Kelley, S. O., et al., *Bioconjug. Chem.*, 8, 31, 1997; Kelly, S. O., et al., *Nucleic Acids Res.*, 27, 4830, 1999), y microbalanceo microgravimétrico y de microbalanza de cristal de cuarzo (Bardea, A., et al., *Chem. Commun.*, 839, 1998; Wang, J., *Nucleic Acids Res.*, 28, 3011, 2000) para la detección de sucesos de hibridación de ADN. Fang y Kelley, *Analytical Chemistry*, 2009, Vol. 81, No. 2, p. 612-617, hacen referencia a la detección directa de ARNm electrocatalítica utilizando sensores de nanoalambres de ANP.

30 Uno de los objetivos descritos aquí es proporcionar biosondas basadas en biomoléculas que estén libres de agregación. Otro objeto es el uso de las biosondas descritas útiles para detectar pequeñas cantidades de marcadores biológicos. Otro objetivo es proporcionar biosensores que comprendan las biosondas descritas aquí. Un objetivo adicional es proporcionar biosensores que comprendan las biosondas descritas aquí, inmovilizadas en un sustrato adecuado, y un sistema informador adecuado unido al mismo.

35 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define en las reivindicaciones anejas. Se describen métodos y sistemas para la detección y manipulación de biomoléculas usando biosondas basadas en biomoléculas descritas aquí.

Esta descripción se refiere a una nueva clase de moléculas de biosondas basadas en quimeras de aminoácidos/ácidos nucleicos que aumentan la sensibilidad y la selectividad, y superan las limitaciones que pueden
40 surgir cuando se usan moléculas de sondas, que incluyen poca solubilidad, agregación, y mala calidad de la monocapa. También se proporcionan biosensores, que comprenden las biosondas descritas aquí. Se describen aquí biosensores que requieren solo una única etapa simple de lisis celular antes del análisis. En algunas realizaciones, las muestras analizadas usando los biosensores descritos aquí están sustancialmente sin purificar.

En una realización, se describen aquí biosondas que comprenden una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse
45 con un nucleótido diana; y al menos un grupo funcional cargado que comprende un grupo funcional aniónico, un grupo funcional catiónico y/o un aminoácido cargado unido a la secuencia de nucleobase. En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase es una secuencia de ácido nucleico, tal como ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o análogo del mismo, que incluye, por ejemplo, un ácido nucleico de morfolino, un ácido nucleico de metilfosfonato y un ácido nucleico peptídico (ANP), que contiene un esqueleto compuesto de unidades
50 de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, u oligómeros de morfolino de fosfordiamidato. En condiciones apropiadas, la sonda puede hibridarse con un ácido nucleico complementario para proporcionar una indicación de la presencia del ácido nucleico complementario en la muestra.

En ciertas realizaciones, el grupo funcional aniónico es un carboxilato, un sulfato o un sulfonato. En ciertas
55 realizaciones, el grupo funcional catiónico es un grupo amina o guanadino. En algunas realizaciones, el aminoácido cargado es un L-aminoácido que comprende una carga neta positiva, tal como lisina (Lys, K), ornitina (Orn, O), ácido

5 diaminobutírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap), y arginina (Arg, R). En algunas realizaciones, el aminoácido cargado es un L-aminoácido o un D-aminoácido que comprende una carga negativa neta, tal como ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), o ácido aminoadípico (Aad), 4-fosfonometil-L-fenilalanina, 4-fosfonometil-D-fenilalanina, ácido L-carboxiglutámico, ácido D-carboxiglutámico, ácido 5-aminosalicílico, o cualquier otro aminoácido cargado del grupo que se muestra en la Tabla 2.

10 En ciertas realizaciones, la sonda también comprende un péptido o una proteína que puede unirse o interactuar de otro modo con una diana de biomarcador (por ejemplo, receptor o ligando) para proporcionar una indicación de la presencia del ligando o receptor en la muestra. La sonda puede incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un electrodo. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones bicatenarias y/o monocatenarias, enlazadores de polyT, dúplex bicatenarios como enlazadores rígidos y espaciadores de PEG. Las biosondas pueden inmovilizarse en resinas, nanopartículas, nanocristales, o micropartículas.

15 En algunas realizaciones, la biosonda está asociada con un electrodo. En ciertas realizaciones, el electrodo es un microelectrodo. En algunas realizaciones, el microelectrodo es un microelectrodo nanoestructurado (NME). En realizaciones adicionales, los electrodos están presentes como una pluralidad de electrodos dispuestos en un sustrato.

En ciertas realizaciones, los electrodos asociados a la biosonda pueden prepararse en un dispositivo de biodetección, tal como un formato basado en chip, de modo que se pueda obtener una serie de electrodos en un solo chip para permitir experimentos multiplexados.

20 En ciertas realizaciones se proporcionan dispositivos de biodetección, tales como circuitos integrados, que comprenden, por ejemplo, un sustrato; un cable conductor de electricidad en el sustrato; una capa aislante o de pasivación que cubre el cable, teniendo la capa aislante una abertura que expone una porción del cable; y un electrodo en comunicación eléctrica con la porción expuesta del cable, estando adaptado el electrodo para generar una carga en respuesta a un estímulo biomolecular tal como hibridación o interacción.

25 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para llevar a cabo un procedimiento de biodetección usando electrodos que contienen una biosonda incorporada en un dispositivo; polarizar el microelectrodo con respecto a un electrodo de referencia; medir una carga de referencia o flujo de corriente de referencia entre el microelectrodo y el electrodo de referencia; exponer el electrodo que contiene la biosonda a un estímulo biomolecular (por ejemplo, hibridación con un ácido nucleico complementario o unión con una pareja de unión presente en una muestra biológica); medir una carga o flujo de corriente generado en el microelectrodo en respuesta al estímulo biomolecular; y determinar la cantidad de estímulo biomolecular presente comparando la carga medida o el flujo de corriente medido con la carga de referencia o el flujo de corriente de referencia.

30 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar una biomolécula o un biomarcador, usando las biosondas y los dispositivos de biodetección descritos aquí. El método implica poner en contacto una muestra purificada o no purificada con un dispositivo de biodetección que comprende una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con el biomarcador diana de interés, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con el biomarcador diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia del biomarcador de interés en la muestra. En ciertas realizaciones, esta detección se realiza por medio de un informador activo redox. En ciertas realizaciones, este método se usa para detectar la presencia de biomoléculas diana en disoluciones, tales como fluidos biológicos obtenidos de un sujeto de ensayo.

35 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de identificación de una biomolécula específica (por ejemplo, ácidos nucleicos) dentro de una población de biomoléculas heterogéneas. El método comprende poner en contacto una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con la biomolécula diana de interés, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con la biomolécula diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia de la biomolécula de interés.

40 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para diagnosticar una enfermedad o afección en un sujeto, usando las biosondas y los dispositivos de biodetección descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, la enfermedad es un cáncer. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con la secuencia del gen diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia de células cancerosas en la muestra.

45 En algunas realizaciones, el cáncer que se diagnostica o detecta se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, suprarrenales, tejido neural, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, carcinoma de piel metastásico, melanoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de

5 células retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de pulmonar microcítico, cálculos biliares, tumor de células de los islotes, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinales, tumor de nervio corneal hiperplásico, tumor de hábito marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de ovario, tumor leiomioma, displasia cervical y carcinoma in situ, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejidos blandos, carcinoide maligno, lesión cutánea tópica, micosis fungoide, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, y carcinomas epidermoides. En otras realizaciones, el cáncer que se está tratando es cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer de pulmón, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de laringe, melanoma, cáncer de ovario, 10 cáncer de cerebro, sarcoma de Ewing o cáncer de colon.

En aún otra realización, se proporciona un método para llevar a cabo una empresa, que incluye proporcionar biosensores descritos aquí a un médico o proveedor de atención médica.

15 En otras realizaciones, la muestra se obtiene de un sujeto que es un mamífero, preferiblemente un ser humano. En algunas realizaciones, la muestra puede incluir sangre, orina, semen, leche, esputo, moco, un hisopo bucal, un hisopo vaginal, un hisopo rectal, un aspirado, una biopsia con aguja, una sección de tejido obtenida, por ejemplo, mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, secreciones externas de la piel, vías respiratorias, intestinales y genitourinarias, lágrimas, saliva, tumores u órganos.

20 Estos y otros aspectos, realizaciones, objetos y características descritos aquí se apreciarán más plenamente cuando se lea la siguiente descripción detallada junto con los dibujos que se acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1E representan biosensores basados en chips.

25 La Figura 1A muestra el diseño del chip en el que se deposita un patrón de oro sobre la superficie del chip con 8 contactos externos que se extienden hasta cables estrechos de una anchura terminal de 5 micrómetros. Se aplica al chip una capa pasivante de dióxido de silicio, y después se abren aberturas de 5 micrómetros al final de cada cable para proporcionar una plantilla de microelectrodo.

La Figura 1B es una micrografía electrónica de barrido de un sensor de 100 micrómetros formado mediante electrodeposición de oro en la superficie del chip.

30 La Figura 1C muestra la secuencia de etapas utilizada para el análisis de ácidos nucleicos. Los sensores se funcionalizan primero con moléculas de sonda, y después se hibridan con una disolución que contiene la diana.

La Figura 1D muestra grupos informadores Ru(III)/Fe(III) que permiten entonces que se detecte el material hibridado.

La Figura 1E representa el flujo general del ensayo de análisis.

Las Figuras 2A-2D muestran la diana y las biosondas.

35 La Figura 2A representa la región de unión entre el gen bcr y el gen abl dentro del ARNm expresado que genera la bcr-abl cinasa.

La Figura 2B muestra estructuras de biosondas de ADN, ANP y ANA (quimera de aminoácidos/ácidos nucleicos).

La Figura 2C muestra ensayos de sondas de ADN, ANP y ANA para la hibridación de ARNm aislado de la línea celular K562 que porta la fusión del gen bcr-abl.

40 La Figura 2D muestra diferentes opciones de colocación para aminoácidos cargados en conjugación con una secuencia de sonda de 20 nucleobases para generar biosondas descritas aquí.

La Figura 3 muestra la sensibilidad de los biosensores modificados con una biosonda ANA hacia el ARNm de la línea celular K562 que porta la fusión del gen bcr-abl.

45 Las Figuras 4A-4E representan el comportamiento de los sensores modificados con ANA cuando se les expone a lisados celulares brutos.

La Figura 4A muestra los lisados K562 en los que las señales obtenidas antes y después de la incubación de microelectrodos modificados con sonda con lisados de células K562 se compararon monitorizando la corriente reductora limitante en una disolución de electrocálisis Ru(III)/Fe(III). El volumen total de muestras fue 30 microlitros.

Las Figuras 4B y 4C son voltamogramas de pulso diferencial representativos que muestran el cambio en la señal cuando se introdujeron lisados que contienen 10 y 1000 células. Las líneas discontinuas representan la señal recogida antes de la hibridación, y las líneas continuas son señales recogidas después de la hibridación.

5 La Figura 4D muestra la detección de la fusión génica *bcr-abl* en leucocitos de pacientes con CML. Los lisados se generaron a partir de 10-1000 células, y los cambios de señal se monitorizaron después de 30 minutos. La presencia de la fusión *bcr-abl* se confirmó mediante PCR (recuadro). Se usaron cebadores específicos para cada gen para analizar un fragmento de la fusión, y se usaron con células K562 (banda izquierda) y células del paciente (banda derecha).

La Figura 4E muestra la detección de la fusión del gen *bcr-abl* en sangre completa.

10 La Figura 5 muestra la optimización de las condiciones de deposición del biosensor: variación del potencial de galvanoplastia para aumentar la huella del sensor. Se identificó 0 mV como el potencial óptimo a usar con el fin de generar sensores de 100 micrómetros.

15 La Figura 6 muestra voltamogramas de pulso diferencial representativos obtenidos con tres tipos sondas diferentes, antes (discontinua) y después (continua) de la disolución de ARNm de K562 con una concentración de 1 ng/ul.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 En una realización, se describen aquí biosondas que comprenden una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un nucleótido diana; y al menos un grupo funcional cargado que comprende al menos un grupo funcional aniónico, grupo funcional catiónico y/o un aminoácido cargado unido a la secuencia de nucleobase. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleobase es una secuencia de ácido nucleico tal como ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o análogo del mismo, que incluye, por ejemplo, un ácido nucleico peptídico (ANP), que contiene un esqueleto principal que comprende unidades de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por péptidos en lugar de desoxirribosa o ribosa, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, u oligómeros de morfolino fosfordiamidato. En condiciones apropiadas, la sonda puede hibridarse con un ácido nucleico complementario para proporcionar una indicación de la presencia del ácido nucleico en la muestra.

25 En ciertas realizaciones, el grupo funcional aniónico es un carboxilato, sulfato o sulfonato. En ciertas realizaciones, el grupo funcional catiónico es un grupo amina o guanadino. En ciertas realizaciones, el aminoácido cargado es un aminoácido quiral, que es un L-aminoácido o un D-aminoácido. En ciertas realizaciones, el aminoácido comprende una carga neta positiva tal como lisina (Lys, K), ornitina (Orn, O), ácido diaminobutírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap), y arginina (Arg, R). En ciertas realizaciones, el aminoácido cargado comprende una carga negativa neta tal como ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E), ácido aminoadípico (Aad), 4-fosfonometil-L-fenilalanina, 4-fosfonometil-D-fenilalanina, ácido L-carboxiglutámico, ácido D-carboxiglutámico, ácido 5-aminosalicílico, o cualquier otro aminoácido cargado seleccionado del grupo que se muestra en la Tabla 2.

En una realización, se describe aquí una biosonda, que comprende:

35 una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un nucleótido diana;

al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase, en la que dicho grupo funcional cargado comprende un grupo funcional catiónico, un grupo funcional aniónico, un aminoácido cargado, o una combinación de los mismos; y

40 en la que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas, en comparación con las biosondas que no comprenden un grupo funcional cargado unido a dicha nucleobase.

45 En una realización, las biosondas no se agregan con una pluralidad de biosondas. En otra realización, la secuencia de nucleobase es un ADN, ARN, ANP, ácido nucleico de morfolino u oligómero de ácido nucleico de metilfosfonato. En aún otra realización, la secuencia de nucleobase es un ANP. En otra realización, el grupo funcional aniónico es un carboxilato, un sulfato o un sulfonato. En todavía otra realización, el grupo funcional catiónico es una amina o un guanadino. En otras realizaciones, el aminoácido es Asp, Glu, Aad, Ser, Lys, Orn, Dab, Dap, Arg, 4-fosfonometil-L-fenilalanina, 4-fosfonometil-D-fenilalanina, ácido L-carboxiglutámico, ácido D-carboxiglutámico, ácido 5-aminosalicílico, o un aminoácido que se muestra en la Tabla 2.

50 En algunas realizaciones, la biosonda comprende entre alrededor de 10 y alrededor de 40 nucleobases. En otras realizaciones, la biosonda comprende entre alrededor de 1 y alrededor de 20 grupos funcionales cargados. En todavía otras realizaciones, los grupos funcionales cargados están dispuestos como se muestra en la Tabla 3. En algunas realizaciones, las biosondas se inmovilizan en una superficie, en la que la superficie puede ser nitrocelulosa, membrana de nailon, placa de vidrio, o una superficie de difluoruro de polivinilo. En algunas realizaciones, la superficie puede ser una placa de múltiples pocillos, una resina, una nanopartícula, un nanocristal, o una micropartícula. En otras realizaciones, la biosonda se inmoviliza en un electrodo. En todavía otras realizaciones, la biosonda comprende además

un marcador redox, en el que la biosonda es capaz de unirse a un informador redox cuando se hibrida con una secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la agregación de la biosonda, en comparación con las biosondas que carecen del grupo funcional cargado, disminuye en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 100%. En aún otras realizaciones, la agregación disminuye entre alrededor de 30% y alrededor de 90%, o entre alrededor de 50% y alrededor de 80%.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar un biomarcador de interés, comprendiendo el método:

poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con el biomarcador de interés, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase, en el que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas;

hibridar la biosonda con el biomarcador; y

detectar la hibridación como indicativa de la presencia del biomarcador de interés en la muestra.

En algunas realizaciones, el grupo funcional cargado es un grupo funcional catiónico, un grupo funcional aniónico, un aminoácido cargado, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el grupo funcional aniónico es un carboxilato, un sulfato o un sulfonato. En otras realizaciones, el grupo funcional catiónico es una amina o un guanadino. En aún otras realizaciones, el aminoácido es Asp, Glu, Aad, Ser, Lys, Orn, Dab, Dap, Arg, 4-fosfonometil-L-fenilalanina, 4-fosfonometil-D-fenilalanina, ácido L-carboxiglutámico, ácido D-carboxiglutámico, ácido 5-aminosalicílico, o un aminoácido que se muestra en la Tabla 2.

En todavía otras realizaciones, es detectable tras la hibridación un aumento en la señal de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 125%, o al menos 150% con respecto a una señal de control. En otras realizaciones, es detectable tras la hibridación un aumento en la señal de al menos 20% - 100% con respecto a una señal de control. En todavía otras realizaciones, es detectable tras la hibridación un aumento en la señal de al menos 25% - 50% con respecto a una señal de control. En algunas realizaciones, las biosondas se inmovilizan sobre una superficie sólida. En otras realizaciones, se inmovilizan una pluralidad de biosondas en ubicaciones distintas en la superficie sólida. En algunas realizaciones, la detección se realiza observando una señal del informador, y en la que un cambio en la señal del informador en la hibridación de la biosonda con el biomarcador, en comparación con dicha señal del informador en ausencia de hibridación de dicha biosonda, es indicativo de la presencia de dicho biomarcador en la muestra. En algunas realizaciones, la señal del informador disminuye en la hibridación de la biosonda con el biomarcador. En algunas realizaciones, la señal del informador disminuye en alrededor de 10% a alrededor de 30% en la hibridación de la biosonda con el biomarcador. En algunas realizaciones, la señal del informador disminuye en alrededor de 20% a alrededor de 50% en la hibridación de biosonda con el biomarcador. En algunas realizaciones, la señal del informador disminuye en alrededor de 50% a alrededor de 100% en la hibridación de biosonda con el biomarcador.

En algunas realizaciones, la detección se realiza por medio de un grupo informador fluorescente. En otras realizaciones, la detección se realiza mediante un sistema de FRET. En otras realizaciones, la detección es por medio de un colorante. En todavía otras realizaciones, la detección se realiza por medio de un sistema informador redox, en la que el sistema informador redox puede ser soluble en agua. En algunas realizaciones, el grupo informador redox puede comprender un metal, en el que el metal puede ser uno de cobre (Cu), cobalto (Co), paladio (Pd), 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), volframio (W) e iridio (Ir). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleobase es un oligómero de ADN, un oligómero de ARN, o un oligómero de ANP. En algunas realizaciones, la agregación de la biosonda, en comparación con las biosondas que carecen del grupo funcional cargado, disminuye en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 100%. En aún otras realizaciones, la agregación disminuye entre 30%-90%, o entre 50%-80%.

En una realización, el biomarcador diana es ADN, ARN o una proteína. En algunas realizaciones, la muestra puede ser un fluido biológico, en el que el fluido biológico puede seleccionarse de humor acuoso, humor vítreo, suero sanguíneo, leche materna, líquido cefalorraquídeo, cerumen, endolinfa y perilinfa, jugo gástrico, moco (incluyendo drenaje nasal y flema), líquido peritoneal, líquido pleural, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, vómito y orina.

También se proporciona aquí un método para detectar la presencia de un biomarcador en un individuo, comprendiendo el método:

obtener una muestra de fluido biológico del individuo;

poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con dicho biomarcador, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; en el que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas;

hibridar la biosonda con el gen biomarcador; y

detectar la hibridación como indicativa de la presencia del biomarcador en el individuo.

También se proporcionan aquí métodos para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra biológica, comprendiendo el método:

- 5 poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; en el que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas;

hibridar la biosonda con la secuencia del gen diana; y

- 10 detectar la hibridación como indicativa de la presencia de células cancerosas en la muestra.

En algunas realizaciones, las células cancerosas detectadas son cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, suprarrenal, tejido neural, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, carcinoma de piel metastásico, melanoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células del retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor pulmonar microcítico, cálculos biliares, tumor de células de los islotes, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinales, tumor del nervio corneal hiperplásico, tumor del hábito marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de ovario, tumor leiomioma, displasia cervical y carcinoma in situ, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejidos blandos, carcinoide maligno, lesión cutánea tópica, micosis fungoide, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, o carcinomas epidermoides.

- 25 En aún otras realizaciones, también se proporcionan métodos para detectar la presencia de células cancerosas en un individuo, que comprenden:

obtener una muestra de fluido biológico del individuo;

- 30 poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase, en la que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas;

hibridar la biosonda con la secuencia del gen diana; y

detectar la hibridación como indicativa de la presencia de células cancerosas en la muestra.

En todavía otras realizaciones, se proporcionan biosensores que comprenden:

un electrodo; y

- 35 una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase, en la que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas.

En aún otras realizaciones, se proporcionan dispositivos de biodetección que comprenden:

- 40 una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un grupo funcional cargado unido a dicha secuencia de nucleobase, en la que la unión de dicho grupo funcional cargado a dicha nucleobase da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas; y

al menos un informador activo redox.

- 45 En ciertas realizaciones, la sonda también comprende un péptido o una proteína que puede unirse o interactuar de otro modo con una diana biomarcadora (por ejemplo, receptor o ligando) para proporcionar una indicación de la presencia del ligando o receptor en la muestra. La sonda puede incluir un grupo funcional (por ejemplo, tiol, ditiol, amina, ácido carboxílico) que facilita la unión con un electrodo. Las sondas también pueden contener otras características, tales como espaciadores longitudinales, regiones bicatenarias y/o monocatenarias, enlazadores de polyT, dúplex bicatenarios como enlazadores rígidos y espaciadores de PEG.

En algunas realizaciones, la biosonda está unida o asociada de otro modo con un sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato puede ser una superficie sólida. En otras realizaciones, el sustrato puede ser nitrocelulosa, una membrana de nailon, una placa de vidrio, o fluoruro de polivinilo ("PVDF"), una placa de múltiples pocillos u otro sustrato, tal como la punta de una guía de luz, fibra óptica, material conductor, o dispositivo biosensor. Otros ejemplos de sustratos incluyen materiales que están compuestos por un material semiconductor, tal como silicio, silíce, cuarzo, germanio, arseniuro de galio, carburo de silicio, y compuestos de indio (por ejemplo, arseniuro de indio, antimoniuro indio, y fosfuro de indio), sulfuro de selenio, cerámica, vidrio, plástico, policarbonato, u otro polímero, o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los sustratos pueden incluir opcionalmente una capa de pasivación, que está compuesta por un material, que ofrece alta resistencia y mantiene una pequeña área de superficie activa. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen: dióxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de silicio dopado con nitrógeno (SiOxNy) o paraleno. En algunas realizaciones, se puede usar un enlazador u otro espaciador para unir o asociar de otro modo las biosondas descritas aquí con el sustrato.

En algunas realizaciones, la biosonda está asociada con un electrodo. Los electrodos pueden estar compuestos de un metal noble (por ejemplo, oro, platino, paladio, plata, osmio, indio, rodio, rutenio); aleaciones de metales nobles (por ejemplo, oro-paladio, plata-platino, etc.); polímeros conductores (por ejemplo, polipirrol (PPY)); metales no nobles (por ejemplo, cobre, níquel, aluminio, estaño, titanio, indio, volframio, platino); óxidos metálicos (por ejemplo, óxido de cinc, óxido de estaño, óxido de níquel, óxido de estaño indio, óxido de titanio, óxido de titanio dopado con nitrógeno (TiOxNy)); sulfuros metálicos (sulfuro de níquel, sulfuro de platino); nitruros metálicos (nitruro de titanio (TiN), nitruro de volframio (WN) o nitruro de tantalio (TaN)), carbono (nanotubos, fibras, grafeno y amorfo), o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

En ciertas realizaciones, el electrodo es un microelectrodo. Los microelectrodos ejemplares tienen una altura en el intervalo de alrededor de 0,5 a alrededor de 100 micrómetros (μm), por ejemplo en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 20 micrómetros (por ejemplo, 10 micrómetros); un diámetro en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 500 micrómetros, por ejemplo en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 100 micrómetros, o por ejemplo en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 50 micrómetros, o por ejemplo en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 1 micrómetros. Los microelectrodos pueden tener cualquiera de una variedad de formas, incluyendo hemiesférica, irregular (por ejemplo, puntiagudo), cíclica (similar a un cable), o fractal (por ejemplo, dendrítica). La superficie de un microelectrodo puede recubrirse o funcionalizarse adicionalmente con un material que mantiene la alta conductividad del electrodo, pero facilita la unión con una sonda.

En otras realizaciones, el electrodo es un microelectrodo nanoestructurado (NME). Los NME son electrodos, que están nanotexturizados, y de este modo tienen un área superficial aumentada. Los NMEs de los materiales descritos anteriormente son altamente conductores y forman fuertes enlaces con las biosondas. Los NMEs ejemplares tienen una altura en el intervalo de alrededor de 0,5 a alrededor de 100 micrómetros (μm), por ejemplo en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 20 micrómetros (por ejemplo, 10 micrómetros); un diámetro en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 100 micrómetros, por ejemplo en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 50 micrómetros, o por ejemplo en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 10 micrómetros; y tienen morfología a nanoescala (por ejemplo, están nanoestructurados en una escala de longitud de alrededor de 1 a alrededor de 300 nanómetros, y más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 10 a alrededor de 20 nanómetros). Los NMEs pueden tener cualquiera de una variedad de formas, incluyendo hemiesférica, irregular (por ejemplo, puntiaguda), cíclica (similar a un cable), o fractal (por ejemplo, dendrítica). La superficie de un NME puede recubrirse o funcionalizarse adicionalmente con un material, que mantiene la alta conductividad del electrodo, pero facilita la unión con una sonda. Por ejemplo, los NMEs que contienen nitrógeno (por ejemplo, TiN, WN o TaN) pueden unirse con un grupo funcional amina de la sonda. De manera similar, la química de silicio/silíce como parte del NME puede unirse con un grupo silano o siloxano en la sonda.

En una realización adicional, una pluralidad de electrodos está dispuesta sobre un sustrato. Los sustratos ejemplares están compuestos por un material semiconductor, tal como silicio, silíce, cuarzo, germanio, arseniuro de galio, carburo de silicio, y compuestos de indio (por ejemplo, arseniuro de indio, antimoniuro indio, y fosfuro de indio), sulfuro de selenio, cerámica, vidrio, plástico, policarbonato, u otro polímero, o combinaciones de cualquiera de los anteriores. Los sustratos pueden incluir opcionalmente una capa de pasivación, que se compone de un material, que ofrece alta resistencia y mantiene una pequeña área de superficie activa. Los ejemplos de materiales apropiados incluyen: dióxido de silicio, nitruro de silicio, óxido de silicio dopado con nitrógeno (SiOxNy) o paraleno. En ciertas realizaciones, la pluralidad de electrodos está dispuesta en el sustrato, comprende biosondas junto con espaciadores monocapa, que minimizan la densidad de la sonda, maximizando así la eficiencia de complejación. Los espaciadores monocapa ejemplares tienen afinidad con el metal, y pueden estar compuestos, por ejemplo, de un alcohol tiol, tal como mercaptohexanol, alcanotioles, cisteína, cistamina, tiol-aminas, tioles aromáticos (por ejemplo, benceno tiol, ditiol), ácidos fosfónicos o ácidos fosfínicos.

Las presentes descripciones pueden comprender en sus realizaciones cualquier tecnología de matriz direccionable conocida en la técnica. Una realización de las matrices polinucleotídicas se ha descrito generalmente en la patente estadounidense n° 5.143.854; publicaciones PCT WO 90/15070 y 92/10092. Estas matrices generalmente pueden producirse utilizando métodos de síntesis mecánica o métodos de síntesis dirigida por luz, que incorporan una combinación de métodos fotolitográficos y síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. (Fodor et al., *Science*, 251:767-777, (1991)). La inmovilización de matrices de oligonucleótidos sobre soportes sólidos ha sido posible

- gracias al desarrollo de una tecnología generalmente identificada como "Síntesis de polímeros inmovilizados a gran escala" en la que, típicamente, las sondas se inmovilizan en una matriz de alta densidad en una superficie sólida de un chip. Los ejemplos de tales tecnologías se proporcionan en las patentes estadounidense nºs 5.143.854 y 5.412.087 y en las publicaciones PCT WO 90/15070, WO 92/10092 y WO 95/11995, que describen métodos para formar matrices de oligonucleótidos a través de técnicas tales como las técnicas de síntesis dirigida por luz. Al diseñar estrategias destinadas a proporcionar matrices de nucleótidos inmovilizados en soportes sólidos, en las publicaciones PCT WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212 y WO 97/31256 se describen estrategias de presentación adicionales para ordenar y mostrar las matrices de oligonucleótidos en los chips en un intento de maximizar los patrones de hibridación y la información de secuencia.
- En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar una biomolécula o un biomarcador, usando las biosondas y los dispositivos de biodetección descritos aquí. El método implica poner en contacto una muestra purificada o no purificada con un dispositivo de biodetección que comprende una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con el biomarcador diana de interés, y al menos un grupo funcional cargado, que incluye un grupo funcional catiónico, un funcional grupo aniónico, o un aminoácido cargado, unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con el biomarcador diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia del biomarcador de interés en la muestra. En ciertas realizaciones, esta detección se realiza por medio de un informador activo redox. En ciertas realizaciones, este método se usa para detectar la presencia de biomoléculas diana en disoluciones, tales como fluidos biológicos obtenidos de un sujeto de ensayo. Estos fluidos biológicos incluyen, pero no se limitan a, humor acuoso, humor vítreo, suero sanguíneo, leche materna, líquido cefalorraquídeo, cerumen (cera de los oídos), endolinfa y perilinfa, jugo gástrico, moco (incluyendo drenaje nasal y flema), líquido peritoneal, líquido pleural, saliva, sebo (aceite de la piel), semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, vómito, y orina.
- En algunas realizaciones, se proporciona un método de identificación de una biomolécula específica (por ejemplo, ácidos nucleicos) dentro de una población de biomoléculas heterogéneas. El método comprende poner en contacto una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con la biomolécula diana de interés, y al menos un aminoácido cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con la biomolécula diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia de la biomolécula de interés.
- En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para diagnosticar una enfermedad o afección en un sujeto, usando las biosondas y los dispositivos de biodetección descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, la enfermedad es un cáncer. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un aminoácido cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con la secuencia del gen diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia de células cancerosas en la muestra.
- En algunas realizaciones, el cáncer que se diagnostica o detecta se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de hueso, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, suprarrenales, tejido neural, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios, riñones, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de tipo ulcerante y papilar, carcinoma de piel metastásico, melanoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células del retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor pulmonar microcítico, cálculos biliares, tumor de células de los islotes, tumor cerebral primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinales, tumor hiperplásico del nervio corneal, tumor del hábito marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de ovario, tumor leiomioma, displasia cervical, y carcinoma in situ, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejidos blandos, carcinóide maligno, lesión cutánea tópica, micosis fungoide, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma osteogénico y otros, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, y carcinomas epidermoides. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer de pulmón, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de laringe, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, sarcoma de Ewing, o cáncer de colon.
- En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para detectar un patógeno usando las biosondas y los dispositivos de biodetección descritos aquí. En ciertas realizaciones, el patógeno es una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra biológica, que comprende: poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con un biomarcador diana, y al menos un aminoácido cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; hibridar la biosonda con la secuencia del gen diana; y detectar la hibridación como indicativa de la presencia de un patógeno, que incluye una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito, en la muestra.
- Las realizaciones de los métodos de multiplexación descritos aquí pueden usarse para seleccionar un solo individuo contra una batería de las biosondas descritas aquí. De acuerdo con esto, diferentes tipos de biosondas pueden marcarse con diferentes informadores para que se pueda lograr la presencia de múltiples biosondas unidas a biomoléculas diana procedentes de una muestra biológica del individuo. Alternativamente, las diferentes biosondas

pueden estar unidas a posiciones distintas en un sustrato sólido, de modo que pueda discernirse la detección de biosondas unidas a biomoléculas diana específicas procedentes de una muestra biológica del individuo. Se obtiene y prepara una muestra biológica del individuo a cribar, y las biomoléculas a sondear se disponen sobre un soporte. Las diversas biosondas se ponen en contacto con las biomoléculas, las sondas no unidas y unidas no específicamente se eliminan mediante lavado, y las señales se detectan y resuelven.

DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la tecnología. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos aquí, prevalecerán las de esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y puede ir y venir información particular en Internet, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a la misma evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Como se usa aquí, el término "nucleobase", como se usa aquí, pretende ser sinónimo de "base de ácido nucleico o mimético de la misma". En general, una nucleobase es cualquier subestructura que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de unirse mediante enlace de hidrógeno a una base de un ácido nucleico.

Como se usa aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroxi-metilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil- y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propil- y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, y derivados alquílicos de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo-, 8-amino-, 8-tiol-, 8-tioalquil-, 8-hidroxil adeninas y guaninas y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo-, particularmente 5-bromo-, 5-trifluorometil-uracilos y citosinas y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina, 3-desazaguanina y 3-desazaadenina, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases de tamaño expandido, y bases fluoradas como se definen aquí. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se sustituye con otros heterociclos, por ejemplo 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las descritas en la patente estadounidense nº 3.687.808, las descritas en *Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por English et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y las descritas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993.

Las nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases de tamaño expandido y bases fluoradas como se define aquí. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos descritos aquí. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Ratón, 1993, p. 276-278), y actualmente son sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, la patente estadounidense nº 3.687.808 señalada anteriormente, así como las patentes estadounidenses nºs 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941.

El término "nucleobase" también abarca polímeros que tienen sustituyentes adicionales que incluyen, sin limitación, grupos proteicos, grupos lipófilos, agentes intercalantes, diaminas, ácido fólico, colesterol, y adamantano. El término "nucleobase" también abarca cualquier otra nucleobase que contenga polímero, incluyendo, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (ANP), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos de morfolino, ácidos nucleicos de metilfosfonato, y oligonucleótidos que tienen secciones de cadena principal con enlazadores de alquilo o enlazadores de amino.

Como se usa aquí, se pretende que el ADN incluya todos los tipos y tamaños de moléculas de ADN, incluyendo ADNc, plásmidos y ADN que incluye nucleótidos modificados y análogos de nucleótidos.

Como se usa aquí, los nucleótidos incluyen nucleósidos mono-, di- y trifosfatos. Los nucleótidos también incluyen nucleótidos modificados, tales como, pero sin limitarse a, nucleótidos de fosforotioato y nucleótidos de desazapurina, y otros análogos de nucleótidos.

5 Como se usa aquí, el término “sujeto” se refiere a animales, plantas, insectos y pájaros. Se incluyen organismos superiores, tales como mamíferos y aves, incluyendo seres humanos, primates, roedores, ganado vacuno, cerdos, conejos, cabras, ovejas, ratones, ratas, conejillos de indias, gatos, perros, caballos, pollos, y otros.

10 Como se usa aquí, los “marcadores seleccionables o identificables” confieren un cambio identificable a una célula que permite una fácil identificación de las células que contienen un vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

15 Como se usa aquí, “expresión” se refiere al proceso por el cual el ácido nucleico se traduce en péptidos o se transcribe en ARN, que, por ejemplo, se puede traducir en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula u organismo hospedante eucariota apropiado, incluir el ajuste del ARNm. Para que el ácido nucleico heterólogo se exprese en una célula hospedante, inicialmente debe administrarse en la célula y después, una vez en la célula, residir finalmente en el núcleo.

20 La expresión “célula hospedante” denota, por ejemplo, microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que se pueden usar, o se han utilizado, como receptores para múltiples constructos para producir un vector de suministro dirigido. La expresión incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. De este modo, una “célula hospedante”, como se usa aquí, generalmente se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una sola célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como el progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

25 Como se usa aquí, la “secuencia de ácido nucleico heterólogo” es típicamente ADN que codifica ARN y proteínas que normalmente no se producen *in vivo* por la célula en la que se expresa, o que media o codifica mediadores que alteran la expresión del ADN endógeno al afectar la transcripción, traducción u otros procesos bioquímicos regulables. Una secuencia de ácido nucleico heterólogo también puede denominarse ADN extraño. Cualquier ADN que un experto en la técnica reconocería o consideraría heterólogo o ajeno a la célula en la que se expresa está aquí incluido por el ADN heterólogo. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ADN que codifica proteínas marcadoras trazables, tal como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ADN que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, tales como agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas, y ADN que codifica otros tipos de proteínas, tales como los anticuerpos. Los anticuerpos codificados por el ADN heterólogo pueden segregarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ADN heterólogo.

35 El término “resto” se refiere a un segmento específico o grupo funcional de una molécula. Los restos químicos a menudo se reconocen como entidades químicas integradas o anexadas a una molécula.

La expresión “soporte sólido” se refiere a los soportes utilizados para anclar las biosondas descritas aquí. El soporte sólido puede ser una superficie sólida tal como nitrocelulosa, una membrana de nailon, una placa de vidrio, una resina, nanopartículas, nanocristales, micropartículas, material semiconductor, o un electrodo.

40 La expresión “resto de unión” se refiere a cualquier resto opcionalmente situado entre el nucleósido terminal y el soporte sólido, o entre el nucleósido terminal y otro nucleósido, nucleótido o ácido nucleico.

45 Una “molécula de ADN” se refiere a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma monocatenaria o en una hélice bicatenaria. Esta expresión se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no lo limita a ninguna forma terciaria particular. De este modo, esta expresión incluye ADN bicatenario encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al analizar la estructura de moléculas de ADN bicatenarias particulares, las secuencias se pueden describir aquí de acuerdo con la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

50 Una “secuencia codificante” o “región codificante” de ADN es una secuencia de ADN bicatenaria que se transcribe y traduce a un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias de control de expresión apropiadas. Los límites de la secuencia codificante (el “marco de lectura abierto” u “ORF”) están determinados por un codón de inicio en el término 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el término 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero), y secuencias de ADN sintético. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción generalmente se ubican 3' con respecto a la secuencia codificante. La expresión “secuencia no codificante” o “región no codificante” se refiere a regiones de una secuencia polinucleotídica que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, regiones 5' y 3' no traducidas).

La expresión “marco de lectura” se refiere a uno de los seis marcos de lectura posibles, tres en cada dirección, de la molécula de ADN bicatenaria. El marco de lectura que se usa determina qué codones se usan para codificar aminoácidos dentro de la secuencia codificante de una molécula de ADN.

5 Como se usa aquí, una molécula de ácido nucleico “antisentido” comprende una secuencia nucleotídica que es complementaria a un ácido nucleico “sentido” que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADN bicatenaria, complementaria a una secuencia de ARNm, o complementaria a la cadena codificante de un gen. En consecuencia, una molécula de ácido nucleico antisentido puede enlazarse mediante hidrógeno a una molécula de ácido nucleico sentido.

10 La expresión “par de bases” o (“pb”): una asociación de adenina (A) con timina (T), o de citosina (C) con guanina (G) en una molécula de ADN bicatenaria. En el ARN, el uracilo (U) sustituye a la timina.

Como se usa aquí, un “codón” se refiere a los tres nucleótidos que, cuando se transcriben y traducen, codifican un único resto de aminoácido; o en el caso de UUA, UGA o UAG codifican una señal de terminación. Los codones que codifican aminoácidos son bien conocidos en la técnica, y se proporcionan aquí por conveniencia en la Tabla 1.

Tabla 1

Tabla de uso de codones							
Codón	Aminoácido	AA	Abr.	Codón	Aminoácido	AA	Abr.
UUU	Fenilalanina	Phe	F	UCU	Serina	Ser	S
UUC	Fenilalanina	Phe	F	UCC	Serina	Ser	S
UUA	Leucina	Leu	L	UCA	Serina	Ser	S
UUG	Leucina	Leu	L	UCG	Serina	Ser	S
CUU	Leucina	Leu	L	CCU	Prolina	Pro	P
CUC	Leucina	Leu	L	CCC	Prolina	Pro	P
CUA	Leucina	Leu	L	CCA	Prolina	Pro	P
CUG	Leucina	Leu	L	CCG	Prolina	Pro	P
AUU	Isoleucina	Ile	I	ACU	Treonina	Thr	T
AUC	Isoleucina	Ile	I	ACC	Treonina	Thr	T
AUA	Isoleucina	Ile	I	ACA	Treonina	Thr	T
AUG	Metionina	Met	M	ACH	Treonina	Thr	T
GUU	Valina	Val	V	GCU	Alanina	Ala	A
GUC	Valina	Val	V	GCC	Alanina	Ala	A
GUA	Valina	Val	V	GCA	Alanina	Ala	A
GUG	Valina	Val	V	GCG	Alanina	Ala	A
UAU	Tirosina	Tyr	Y	UGU	Cisteína	Cys	C
UAC	Tirosina	Tyr	Y	UGC	Cisteína	Cys	C
UUA		Stop		UGA		Stop	

Tabla de uso de codones							
Codón	Aminoácido	AA	Abr.	Codón	Aminoácido	AA	Abr.
UAG		Stop		UGG	Triptófano	Trp	W
CAU	Histidina	His	H	CGU	Arginina	Arg	R
CAC	Histidina	His	H	CGC	Arginina	Arg	R
CAA	Glutamina	Gln	Q	CGA	Arginina	Arg	R
CAG	Glutamina	Gln	Q	CGG	Arginina	Arg	R
AAU	Asparagina	Asn	N	AGU	Serina	Ser	S
AAC	Asparagina	Asn	N	AGC	Serina	Ser	S
AAA	Lisina	Lys	K	AGA	Arginina	Arg	R
AAG	Lisina	Lys	K	AGG	Arginina	Arg	R
GAU	Aspartato	Asp	D	GGU	Glicina	Gly	G
GAC	Aspartato	Asp	D	GGC	Glicina	Gly	G
GAA	Glutamato	Glu	E	GGA	Glicina	Gly	G
GAG	Glutamato	Glu	E	GGG	Glicina	Gly	G

5 Como se usa aquí, una “posición de oscilación” se refiere a la tercera posición de un codón. Las mutaciones en una molécula de ADN dentro de la posición de oscilación de un codón, en algunas realizaciones, dan como resultado mutaciones silenciosas o conservativas a nivel de aminoácidos. Por ejemplo, hay cuatro codones que codifican glicina, es decir, GGU, GGC, GGA y GGG; de este modo, la mutación de cualquier nucleótido en la posición de oscilación, a cualquier otro nucleótido, no produce un cambio en el nivel de aminoácidos de la proteína codificada, y, por lo tanto, es una sustitución silenciosa.

10 Como se usa aquí, una “sustitución silenciosa” o “mutación silenciosa” es aquella en la que se modifica un nucleótido dentro de un codón, pero no da como resultado un cambio en el resto de aminoácido codificado por el codón. Los ejemplos incluyen mutaciones en la tercera posición de un codón, así como en la primera posición de ciertos codones, tal como en el codón “CGG” que, cuando muta a AGG, todavía codifica Arg.

15 Las expresiones “gen”, “gen recombinante” y “constructo génico”, como se usan aquí, se refieren a una molécula de ADN, o una porción de una molécula de ADN, que codifica una proteína o una porción de la misma. La molécula de ADN puede contener un marco de lectura abierto que codifica la proteína (como secuencias de exón), y puede incluir además secuencias de intrón. El término “intrón”, como se usa aquí, se refiere a una secuencia de ADN presente en un gen dado que no se traduce en proteína y se encuentra en algunos, pero no en todos los casos, entre exones. Puede ser deseable que el gen esté operativamente unido a (o puede comprender) uno o más promotores, potenciadores, represores y/u otras secuencias reguladoras para modular la actividad o expresión del gen, como es bien conocido en la técnica.

20 Como se usa aquí, un “ADN complementario” o “ADNc” incluye polinucleótidos recombinantes sintetizados por transcripción inversa de ARNm y de los que se han eliminado las secuencias intermedias (intrones).

25 “Homología” o “identidad” o “similitud” se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología y la identidad se pueden determinar, cada una, comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente ocupado por el mismo o un resto de ácido nucleico similar (por ejemplo, similar en naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión, como porcentaje de homología/similitud o identidad, se refiere a una función del número de ácidos nucleicos

idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Una secuencia “no relacionada” o “no homóloga” comparte menos del 50% de identidad, menos del 40% de identidad, menos del 35% de identidad, menos del 30% de identidad, menos del 25% de identidad, menos del 20% de identidad, menos del 15% de identidad o menos del 10% de identidad con una secuencia descrita aquí. Al comparar dos secuencias, la ausencia de restos (aminoácidos o ácidos nucleicos) o la presencia de restos adicionales, también disminuye la identidad y la homología/similitud.

El término “homología” puede describir una comparación matemática de similitudes de secuencia que se utiliza para identificar genes con funciones o motivos similares. Las secuencias de ácido nucleico descritas aquí pueden usarse como una “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar a otros miembros de la familia, secuencias relacionadas u homólogos. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas de ácido nucleico descritas aquí. Para obtener alineaciones con espacios para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y BLAST) (véase www.ncbi.nlm.nih.gov).

Como se usa aquí, “identidad” significa el porcentaje de restos de nucleótidos idénticos en las posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando las secuencias están alineadas para maximizar la coincidencia de secuencias, es decir, teniendo en cuenta los espacios vacíos e inserciones. La identidad se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Además, los métodos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de los programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete del programa GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990), y Altschul et al. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). El programa BLAST X está disponible públicamente en NCBI y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). Para determinar la identidad, también se puede utilizar el algoritmo de Smith Waterman bien conocido.

Una región “heteróloga” de una secuencia de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una secuencia de ADN más grande que no se encuentra en asociación con la secuencia más grande en la naturaleza. De este modo, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen generalmente puede estar flanqueado por un ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una secuencia en la que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc en el que la secuencia codificante genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones o motivos diferentes del gen no modificado). Las variaciones alélicas o los eventos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define aquí.

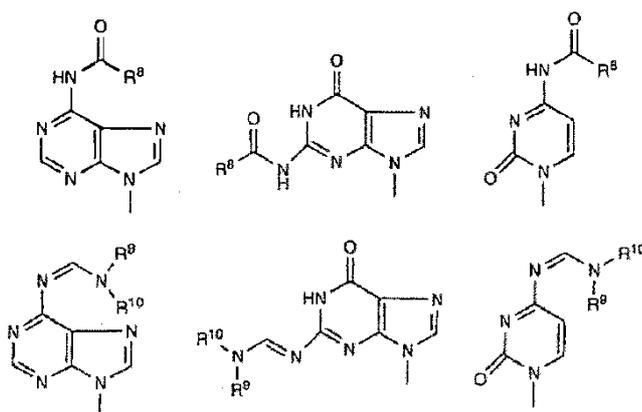
La expresión “mutaciones de transición” se refiere a cambios de base en una secuencia de ADN en la que una pirimidina (citidina (C) o timidina (T) se reemplaza por otra pirimidina, o una purina (adenosina (A) o guanosina (G) se reemplaza por otra purina.

La expresión “mutaciones de transversión” se refiere a cambios de base en una secuencia de ADN en la que una pirimidina (citidina (C) o timidina (T) se reemplaza por una purina (adenosina (A) o guanosina (G), o una purina se reemplaza por una pirimidina.

NUCLEOBASES Y NUCLEOBASES MODIFICADAS

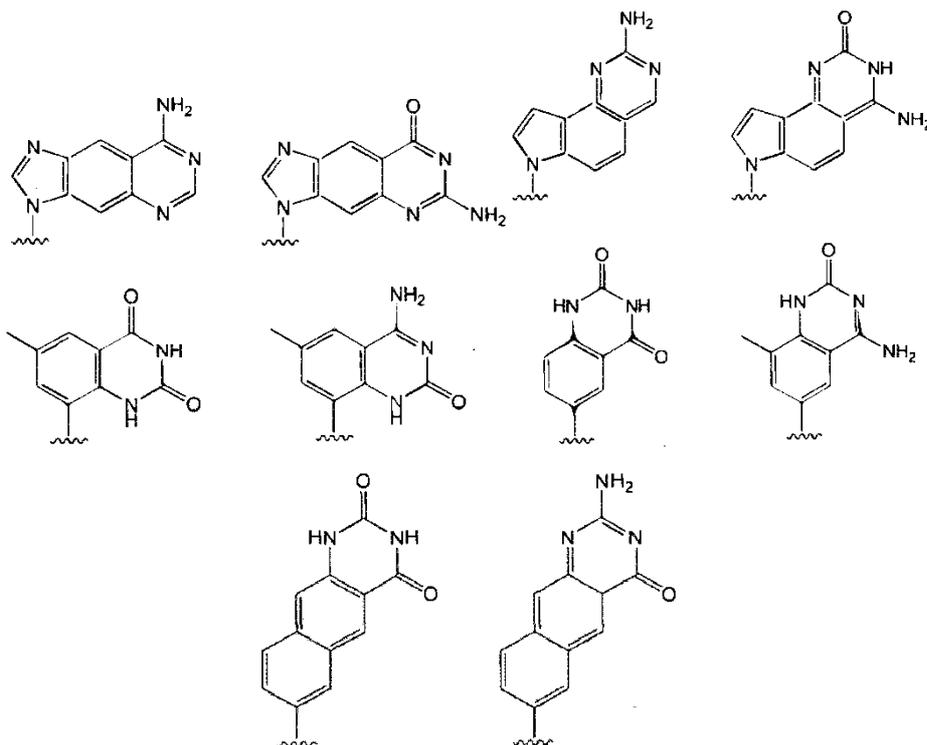
Las nucleobases usadas aquí son nucleobases naturales o nucleobases modificadas derivadas de nucleobases naturales. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina que tienen sus respectivos grupos amino protegidos por grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo, y otras nucleobases modificadas tales como purinas 8-sustituidas, xantina, o hipoxantina (siendo estas dos últimas los productos de degradación natural). Las nucleobases modificadas descritas en Chiu et al. *RNA* 9: 1034-1048 (2003), Limbach et al., *Nucleic Acids Research* 22: 2183-2196 (1994), también se contemplan como restos de nucleobases.

Los compuestos representados por las siguientes fórmulas generales también se contemplan como nucleobases modificadas:

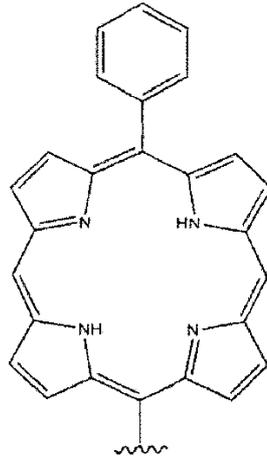


5 En las fórmulas anteriores, R^8 es un grupo alquilo lineal o ramificado, arilo, aralquilo, o ariloxilalquilo que tiene 1 a 15 átomos de carbono, que incluye, a modo de ejemplo solamente, un grupo metilo, isopropilo, fenilo, bencilo, o fenoximetilo; y cada uno de R^9 y R^{10} representa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

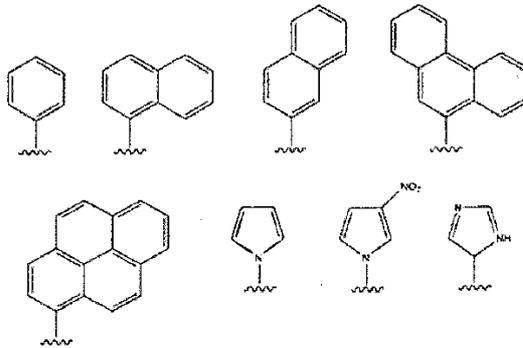
10 Las nucleobases modificadas también incluyen nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. Las sustituciones de bases nucleicas descritas en el catálogo de Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT et al., *Acc. Chem. Res.* 40: 141-150 (2007); Kool, ET. *Acc. Chem. Res.* 35: 936-943 (2002); Benner S.A., et al., *Nat. Rev. Genet.* 6: 553-543 (2005); Romesberg, F.E., et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 723-733 (2003, se consideran útiles para la síntesis de los ácidos nucleicos descritos aquí. A continuación, se muestran algunos ejemplos de estas nucleobases de tamaño expandido:



15 Aquí, las nucleobases modificadas también abarcan estructuras que no se consideran nucleobases pero que son otros restos tales como, pero sin limitarse a, anillos derivados de corrina o de porfirina. Las sustituciones de bases derivadas de porfirina se han descrito en Morales-Rojas, H y Kool, ET, *Org. Lett.* 4: 4377-4380 (2002). A continuación, se muestra un ejemplo de un anillo derivado de porfirina que se puede usar como sustitución de base:

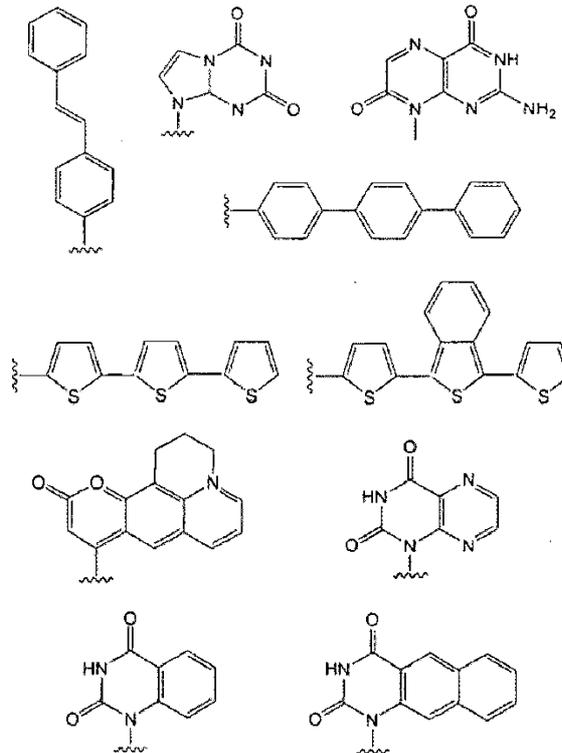


Otras nucleobases modificadas también incluyen sustituciones de bases tales como las que se muestran a continuación:

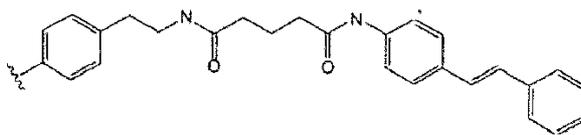


5

También se contemplan nucleobases modificadas que son fluorescentes. Ejemplos no limitantes de estas sustituciones de bases incluyen fenantreno, pireno, estilbeno, isoxantina, isozantopterina, terfenilo, tertiofeno, benzotertiofeno, cumarina, lumazina, estilbeno atado, benzo-uracilo y nafto-uracilo, como se muestra a continuación:



10



Las nucleobases modificadas pueden no estar sustituidas o contener sustituciones adicionales tales como heteroátomos, grupos alquilo o restos enlazantes conectados a restos fluorescentes, restos de biotina o avidina, u otras proteínas o péptidos. Las nucleobases modificadas también incluyen ciertas “bases universales” que no son nucleobases en el sentido más clásico, pero funcionan de manera similar a las nucleobases. Un ejemplo representativo de una base universal de este tipo es el 3-nitropirrol.

En algunas realizaciones, las nucleobases o nucleobases modificadas comprenden restos de unión a biomoléculas tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, biotina, avidina, estreptavidina, ligandos de receptores, o restos quelantes. En otras realizaciones, las nucleobases pueden ser 5-bromouracilo, 5-yodouracilo o 2,6-diaminopurina. En aún otras realizaciones, la nucleobase se modifica mediante sustitución con un resto fluorescente o de unión a biomolécula. En algunas realizaciones, el sustituyente en la nucleobase es un resto fluorescente. En otras realizaciones, el sustituyente es biotina o avidina.

BIOSONDAS QUE COMPRENDEN NUCLEOBASES

En términos generales, es posible identificar segmentos de ácido nucleico específicos de secuencia, y diseñar secuencias complementarias a esos segmentos, creando así una sonda específica para una célula diana, tales como diferentes células patógenas o células de mamífero que, por ejemplo, han mutado a partir de sus contrapartes normales. En principio, se pueden diseñar secuencias complementarias para cualquier segmento de ácido nucleico identificado. En muchos casos, se pueden usar secuencias únicas específicas de un organismo como sondas para un organismo particular o tipo de célula. El análisis fenotípico cuantitativo de mutantes de supresión de levadura, por ejemplo, ha utilizado identificadores únicos de secuencia de ácido nucleico para analizar las cepas de supresión mediante hibridación con sondas etiquetadas utilizando una matriz paralela de alta densidad.

La hibridación implica unir una sola cadena de ácido nucleico con una secuencia de sonda complementaria. La hibridación de una biosonda que comprende nucleobases a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias génicas procedentes de bacterias, o ADN viral (o ARN), ofrece un grado muy alto de precisión para identificar secuencias de ácido nucleico complementarias a la sonda. Las cadenas de ácido nucleico tienden a emparejarse con sus complementos en estructuras bicatenarias. De este modo, una molécula que comprende una nucleobase monocatenaria buscará su complemento en una mezcla compleja de ADN y/o ARN que contiene grandes cantidades de otras moléculas de ácido nucleico. Los métodos de detección de biosondas basados en nucleobases pueden ser muy específicos para secuencias de ácido nucleico. Los factores que afectan la hibridación o reasociación de dos cadenas de ácido nucleico complementarias incluyen la temperatura, el tiempo de contacto, la concentración de sal, el grado de falta de coincidencia entre los pares de bases, y la longitud y concentración de las secuencias diana y sonda.

Los biosensores que comprenden ADN, ARN, ANP, ácido nucleico de morfolino, o ácido nucleico de metilfosfonato descritos aquí pueden usarse por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de fragmentos de ADN o ARN. En una realización, se proporcionan métodos para detectar secuencias particulares de ácido nucleico en una muestra. El método generalmente implica obtener una muestra sospechosa de contener el polinucleótido de interés; poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase aislada sustancialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico de interés; al menos un aminoácido cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; y un detector adecuado, en condiciones eficaces para permitir la hibridación; y detectar la hibridación. En algunas realizaciones, los métodos se usan para detectar cambios en una secuencia nucleotídica, por ejemplo, polimorfismos o mutaciones de un solo nucleótido. Los métodos generalmente comprenden obtener una muestra sospechosa de contener el polinucleótido de interés; poner en contacto la muestra con una biosonda que comprende una secuencia de nucleobase aislada; al menos un aminoácido cargado unido a dicha secuencia de nucleobase; y un detector adecuado, en condiciones eficaces para permitir la hibridación; cuantificar o medir dicha hibridación, y compararla con una muestra de hibridación estándar o de control.

BIOSONDAS QUE COMPRENDEN ÁCIDO NUCLEICO PEPTÍDICO

El ADN y el ARN tienen un esqueleto de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que el esqueleto de ANP está compuesto de unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. No se conoce que el ANP aparezca de forma natural. Las diversas bases de purínicas y pirimidínicas se unen al esqueleto por enlaces de metilencarbonilo. Los ANP se representan como péptidos, con el término N en la primera posición (izquierda) y el término C a la derecha.

Dado que el esqueleto de ANP no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las cadenas de ANP/ADN es más fuerte que entre las cadenas de ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Los primeros experimentos con cadenas de homopirimidina (cadenas que consisten en una sola base pirimidínica repetida) han

demostrado que la T_m (temperatura de "fusión") de una doble hélice de ANP de timina/ADN de adenina de 6 bases era 31 °C en comparación con un dúplex de ADN/ADN de 6 bases equivalente, que se desnaturaliza a una temperatura menor que 10 °C. Las moléculas de ANP de bases mixtas son verdaderas imitaciones de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La unión de ANP/ANP es más fuerte que la unión de ANP/ADN.

Los oligómeros de ácidos nucleicos peptídicos sintéticos se han utilizado en los últimos años en procedimientos de biología molecular, ensayos de diagnóstico y terapias antisentido. Debido a su mayor fuerza de unión, no es necesario diseñar oligómeros de ANP largos para uso en estos roles, que generalmente requieren sondas oligonucleotídicas de 20-25 bases. La principal preocupación de la longitud de los oligómeros de ANP es garantizar la especificidad. Los oligómeros de ANP también muestran una mayor especificidad en la unión a ADN complementarios, siendo un desemparejamiento de bases de ANP/ADN más desestabilizante que un desemparejamiento similar en un dúplex de ADN/ADN. Esta fuerza y especificidad de unión también se aplica a dúplex de ANP/ARN. Los ANP no son fácilmente reconocidos ni por nucleasas ni por proteasas, lo que los hace resistentes a la degradación enzimática. Los ANP también son estables en un amplio intervalo de pH. Aunque un ANP no modificado no puede cruzar fácilmente las membranas celulares para entrar en el citosol, el acoplamiento covalente de un péptido penetrante de células a un ANP puede mejorar el suministro citosólico.

La longitud de las sondas de ANP está optimizada para el uso específico pretendido. La longitud óptima es una función de la distribución de las bases de purina y pirimidina y, en contraste con las sondas de nucleótidos, es menos dependiente de la concentración de sal y el pH como reguladores de la rigurosidad de las condiciones de hibridación.

Las biosondas basadas en ANP pueden comprender uno o más grupos marcadores conectados al nitrógeno de glicina para el marcaje interno de las sondas de ANP, o uno o más grupos marcadores conectados a uno o ambos extremos de la biosonda, siempre que el grupo marcador no destruya el rendimiento de la sonda. Como se usa aquí, la expresión "marcador" o "grupo marcador" significa un sustituyente, que es útil para detectar una biosonda.

En muchos casos, el marcador se une al extremo C-terminal y/o N-terminal de la biosonda de ANP usando enlaces adecuados. En general, todos los métodos químicos para el marcaje N- o C-terminal de péptidos y para el marcaje del extremo 5' o 3' de ADN y/o ARN que se conocen actualmente pueden aplicarse en términos generales también a los ANP. Para una máxima estabilidad, particularmente a pH alcalino, el término N del ANP puede estar bloqueado, por ejemplo, con un aminoácido tal como lisina o glicina.

Alternativamente, el término N puede modificarse mediante un marcador, un grupo acetilo o un grupo alifático saturado o insaturado, un grupo aromático, un grupo heteroaromático, un grupo cíclico saturado o insaturado, y/o un grupo heterocíclico saturado o insaturado que puede opcionalmente estar sustituido con uno o más grupos que contienen heteroátomos, tales como OH, NH₂, SO₂, SH y COOH. Este tipo de modificación evita la reordenación intramolecular gradual del resto N-terminal. El uso de ANP como molécula de sonda ha demostrado previamente que aumenta la sensibilidad de los ensayos de biosensores, y es particularmente ventajoso en los ensayos electroquímicos debido a que produce corrientes de fondo reducidas.

Las sondas de ANP, que no tienen carga molecular a pH neutro, ofrecen muchas ventajas cuando se usan para la biodetección. Una ventaja clave es el aumento de la afinidad de unión por las secuencias de ADN o ARN diana (O. Brandt, J.D. Hoheisel, *Trends Biotech.* 22: 617 (2004)). Además, cuando se utilizan esquemas de detección que se basan en cambios en la carga de superficie tras la unión de un ácido nucleico a un sensor, se pueden obtener señales de fondo reducidas, y en consecuencia límites de detección mejorados, debido a la ausencia de carga en la sonda. Debido a este efecto, nuestro sistema informador electrocatalítico, que se basa en la atracción de iones de rutenio a la superficie del sensor por los ácidos nucleicos capturados por las moléculas de sonda inmovilizadas, ha demostrado una mejor sensibilidad cuando se utilizan sondas de ANP (Z. Fang, S.O. Kelley, *Anal. Chem.* 81: 612 (2009)).

Sin embargo, existen inconvenientes en el uso de sondas de ANP. En el presente estudio, se observó que cuando existen requisitos estrictos sobre la secuencia específica empleada - es decir, la sonda molecular debe apuntar a una secuencia de fusión específica - se descubrió que las biosondas de ANP no participan en la hibridación cuando se inmovilizan en biosensores; además, se observó precipitación fuera de la disolución de la sonda original. A partir de estas observaciones, fue evidente que la secuencia de biosondas era propensa a la agregación. Llegamos a la conclusión de que la secuencia específica ordenada por esta aplicación de biodetección particular no era utilizable cuando se sintetizaba como una molécula neutra.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que escinden especies particulares de ARNm. En ciertas realizaciones, las ribozimas capaces de escindir segmentos de ARN, y la detección resultante de tales ARNm o ribozimas, se pueden usar aquí con los métodos y las sondas a base de ADN, ARN y/o ANP descritas aquí.

Actualmente se conocen seis variedades básicas de ARN enzimáticos naturales. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de ARN (y de este modo puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana.

Dicha unión ocurre a través de la porción de unión diana del ácido nucleico enzimático que se mantiene cerca de una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana a través del emparejamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático ha unido y escindido su diana de ARN, se libera de ese ARN para buscar otra diana, y puede unirse y escindir repetidamente nuevas dianas.

La molécula enzimática de ácido nucleico puede formarse en una cabeza de martillo, una horquilla, un virus de la hepatitis- δ , intrón del grupo I o ARN de ARNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN) o un motivo de ARN de Neurospora VS. Rossi et al. (1992) describen ejemplos de motivos de cabeza de martillo; Hampel et al. (Patente Europea EP 0360257), Hampel y Tritz (1989), Hampel et al. (1990) y Cech et al. (patente estadounidense nº 5.631.359) describen ejemplos de motivos de horquilla, Perrotta y Been (1992) describen un ejemplo del motivo del virus de la hepatitis- δ ; Guerrier-Takada et al. (1983) describen un ejemplo del motivo de ARNasaP; y Cech et al. (patente estadounidense nº 4.987.071) describen un ejemplo del intrón del Grupo I. Se contemplan aquí biosondas que comprenden nucleobases que tienen un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ARN del gen diana, y que tienen secuencias nucleotídicas dentro o alrededor de ese sitio de unión al sustrato que imparten a la molécula actividad de escisión del ARN.

BIOSONDAS QUE COMPRENDEN GRUPOS FUNCIONALES CARGADOS

Las biosondas descritas aquí comprenden al menos un grupo funcional cargado unido a una secuencia de nucleobase capaz de hibridarse con una molécula diana. En algunas realizaciones, el grupo funcional cargado es un grupo funcional catiónico, un grupo funcional aniónico o un aminoácido cargado. En algunas realizaciones, el grupo funcional aniónico es un carboxilato, un sulfato o un sulfonato. En ciertas realizaciones, el grupo funcional catiónico es un grupo amina o guanadino. En algunas realizaciones, el grupo funcional cargado es un aminoácido cargado.

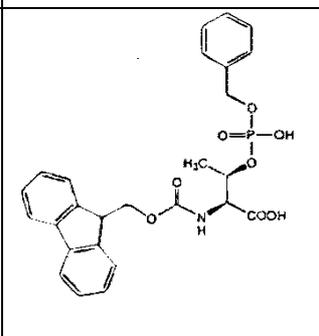
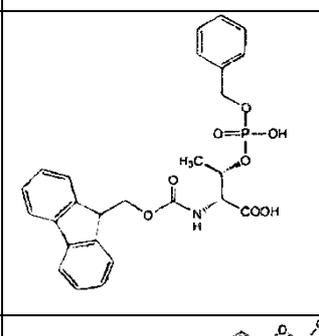
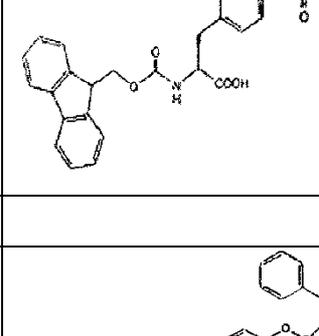
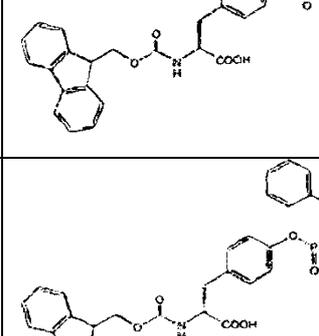
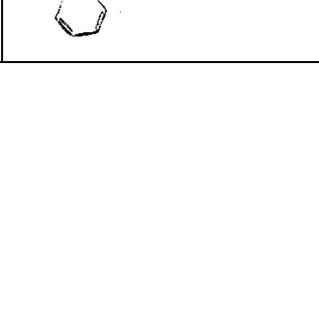
Un aminoácido cargado es un aminoácido que está cargado positivamente (protonado), o cargado negativamente (desprotonado) a pH fisiológico. Los aminoácidos cargados negativamente de origen natural incluyen ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E). Los aminoácidos cargados positivamente de origen natural incluyen lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R). Un aminoácido que a veces se protona a pH fisiológico es la histidina (His, H).

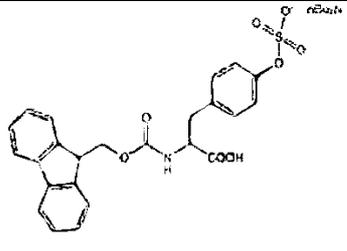
Además de lo anterior, otros aminoácidos cargados incluyen, pero no se restringen a, ornitina (Orn, O), ácido diaminobutírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap), y ácido aminoadípico (Aad). Los aminoácidos cargados adicionales se proporcionan en la tabla 2.

Tabla 2: aminoácidos aniónicos

Aminoácido	Monómero peptídico (Ejemplo)	Nombre completo	Estructura
Ácido L-aspártico	Fmoc-Asp(OBut)-OH	Éster β -t-butílico del ácido Fmoc-L-aspártico	
Ácido D-aspártico	Fmoc-D-Asp(OBut)-OH	Éster β -t-butílico del ácido N- α -Fmoc-D-aspártico	
Ácido L-glutámico	Fmoc-Glu(OBut)-OH	Éster γ -t-butílico del ácido Fmoc-L-glutámico	
Ácido D-glutámico	Fmoc-D-Glu(OBut)-OH	Éster γ -t-butílico del ácido N- α -Fmoc-D-glutámico	
Ácido 5-amino-salicílico	Ácido Boc-5-amino-salicílico		

Aminoácido	Monómero peptídico (Ejemplo)	Nombre completo	Estructura
Ácido D- γ -carboxiglutámico	Fmoc-D-Gla(OBut) ₂ -OH		
Ácido L- γ -carboxiglutámico	Fmoc-Gla(OBut) ₂ -OH	Éster γ,γ -di-t-butílico del ácido Fmoc-L- γ -carboxiglutámico	
4-fosfonometil-D-fenilalanina	Fmoc-D-Pmp-OH	Fmoc-4-fosfonometil-D-fenilalanina	
4-fosfonometil-L-fenilalanina	Fmoc-Pmp-OH	Fmoc-4-fosfonometil-L-fenilalanina	
L-fosfoserina	Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-L-fosfoserina	
D-fosfoserina	Fmoc-D-Ser(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-D-fosfoserina	

Aminoácido	Monómero peptídico (Ejemplo)	Nombre completo	Estructura
L-fosfotreonina	Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-L-fosfotreonina	
D-fosfotreonina	Fmoc-D-Thr(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-D-fosfotreonina	
O-fosfo-L-tirosina	Fmoc-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH	N- α -Fmoc-O-fosfo-L-tirosina	
O-bencil-L-fosfotirosina	Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-L-fosfotirosina	
O-bencil-D-fosfotirosina	Fmoc-D-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH	N- α -Fmoc-O-bencil-D-fosfotirosina	

Aminoácido	Monómero peptídico (Ejemplo)	Nombre completo	Estructura
O-sulfo-L-tirosina	Fmoc-Tyr(SO ₃ NnBu ₄)-OH	Sal de tetrabutilamonio de N- α -Fmoc-O-sulfo-L-tirosina	

Aquí, hemos generado moléculas de biosondas que exhiben solubilidad en agua mejorada y propiedades formadoras de monocapas con poca o ninguna agregación. La estrategia utilizada es la introducción de un grupo funcional cargado en los extremos de la secuencia de nucleobase para alterar beneficiosamente las propiedades de la sonda. La unión de grupos funcionales cargados, incluyendo grupos funcionales catiónicos, grupos funcionales aniónicos, y aminoácidos cargados, a ANP, ADN, ARN, o ácidos nucleicos modificados se logra utilizando una química de acoplamiento similar a la utilizada en la síntesis tradicional de ANP. Esta modificación sutil - la inclusión de suficientes grupos funcionales cargados - mejora el comportamiento de la biosonda que comprende la nucleobase, por cuanto se mejora la solubilidad en disolución acuosa, y exhibe un mejor rendimiento cuando se usa para detectar la biomolécula diana de interés. En algunas realizaciones, la inclusión de al menos un grupo funcional cargado da como resultado una disminución en la agregación, en comparación con la ausencia del al menos un grupo funcional cargado, de al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100%. En algunas realizaciones, la inclusión de al menos un grupo funcional cargado da como resultado una disminución en la agregación, en comparación con la ausencia del al menos un grupo funcional cargado, de al menos entre alrededor de 10% y alrededor de 90%, al menos entre alrededor de 20% y alrededor de 80%, al menos entre alrededor de 30% y alrededor de 70%, al menos entre alrededor de 30% y alrededor de 90%, al menos entre alrededor de 40% y alrededor de 70%, al menos entre alrededor de 50% y alrededor de 80%, al menos entre alrededor de 50% y alrededor de 70% o al menos entre alrededor de 60% y alrededor de 90%. En algunas realizaciones, la inclusión de al menos un grupo funcional cargado da como resultado una disminución en la agregación, en comparación con la ausencia del al menos un grupo funcional cargado, de al menos entre 10% y 90%, al menos entre 20% y 80%, al menos entre 30% y 70%, al menos entre 30% y 90%, al menos entre 40% y 70%, al menos entre 50% y 80%, al menos entre 50% y 70%, o al menos entre 60% y 90%.

Dependiendo de la intensidad de la agregación, se pueden usar en la biosonda varios grupos funcionales cargados. En algunos casos, la colocación de uno o más grupos funcionales cargados, incluyendo los grupos funcionales catiónicos, los grupos funcionales aniónicos, y los aminoácidos cargados, en los extremos de la secuencia de nucleobase es suficiente para lograr una biosonda selectiva robusta. En ciertas realizaciones, el número de grupos funcionales cargados puede ser tanto como el número total de nucleobases en la secuencia de la biosonda. Los grupos funcionales cargados, incluyendo los grupos funcionales catiónicos, los grupos funcionales aniónicos, y los aminoácidos, pueden colocarse en uno o ambos extremos de la secuencia de nucleobase, o los grupos funcionales cargados pueden colocarse intermitentemente a través de la secuencia individualmente, o en grupos de dos, tres o más, como se observa en la Figura 2.

La inmovilización de biosondas en una plataforma de muestreo de múltiples matrices (por ejemplo, las de hasta alrededor de 100 o alrededor de 200, o alrededor de 400, o incluso alrededor de 1000, o más canales) puede realizarse en una superficie de detección transductora para garantizar un contacto óptimo y una detección máxima. Cuando se inmoviliza sobre un sustrato, las biosondas se estabilizan y, por lo tanto, se pueden reutilizar repetidamente. En una realización ilustrativa, la hibridación se realiza en una diana inmovilizada o una molécula de sonda unida en una superficie sólida tal como una nitrocelulosa, una membrana de nailon, una placa de vidrio, o difluoruro de polivinilo ("PVDF"), una placa de múltiples pocillos, u otro sustrato conveniente, tal como la punta de una guía de luz, fibra óptica, material conductor, o dispositivo biosensor, que se presta para este fin. En algunas realizaciones, también se incluye un dispositivo de matriz que comprende múltiples biosondas fijadas a una matriz sólida como se describe aquí, o suspendidas en disolución en un formato lineal o multidimensional. En otro aspecto, las biosondas se fijan a la matriz sólida en un formato de matriz específico, o se colocan dentro de pocillos específicos de una placa de múltiples pocillos. Alternativamente, en algunas realizaciones, las biosondas pueden inmovilizarse en resinas, nanopartículas, nanocristales, o micropartículas.

ELECTRODOS

En algunas realizaciones, se realiza un ensayo de detección de hibridación de ácido nucleico en una superficie de electrodo sólido. Un electrodo sólido, tal como un electrodo de óxido de indio y estaño, se modifica mediante las

biosondas descritas aquí, que se inmovilizan en la superficie del electrodo. La biosonda se hibrida con secuencias de ácido nucleico diana complementaria, y este suceso es detectado por el sistema informador.

Como se usa aquí, el término “electrodo” significa una composición que puede transportar o detectar una corriente o carga eléctrica, y después convertirla en una señal medible. En algunas realizaciones, un electrodo es un sustrato sólido que comprende un material conductor o un material semiconductor.

El material del electrodo se puede seleccionar de acuerdo con el intervalo de potencial redox deseado, la facilidad de unión de la superficie del ácido nucleico a la superficie, y las propiedades ópticas apropiadas o deseadas. Como se indicó anteriormente, una limitación en la selección de un material de electrodo es que no puede ser idéntico al material que comprende la nanopartícula de la sonda de detección. Los materiales del electrodo incluyen, pero no se limitan a, ciertos metales y sus óxidos, tales como oro, platino, paladio, aluminio, óxido de indio y estaño (ITO), óxido de estaño, óxido de estaño dopado con flúor, óxido de cadmio, óxido de iridio, óxido de rutenio, óxido de cinc y estaño, óxido de antimonio y estaño, óxido de platino, óxido de titanio, óxido de paladio, óxido de aluminio, óxido de molibdeno, óxido de wolframio, y otros. En una realización particular, el electrodo comprende óxido de indio y estaño (ITO).

El electrodo puede comprender un solo material conductor o múltiples materiales conductores. El material del electrodo conductor se puede colocar sobre un segundo material, tal como un polímero o de otro modo una superficie no conductora. En algunas realizaciones, el electrodo se forma sobre un sustrato sólido, no conductor. El sustrato puede comprender una amplia variedad de materiales, incluyendo, pero no se limitan a, vidrio, fibra de vidrio, teflón, cerámica, silicio, mica, plástico (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales), polipropileno, polietileno, polibutileno, policarbonato, poliuretanos, TEFLON™, combinaciones de los mismos, y similares. Alternativamente, se puede construir un soporte a partir de un material polimérico tal como polietileno de alta densidad (HDPE), a menudo utilizado en placas de titulación de 96 pocillos. En aún otro ejemplo, se puede emplear un gel de poliacrilamida como soporte sólido para el electrodo (Dubiley et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2259-2265).

Los sustratos sólidos sobre los que se pueden formar electrodos también incluyen materiales de placa de circuito impreso. Los materiales de placa de circuito son aquellos que comprenden un sustrato aislante que está recubierto con una capa conductora y que se procesa utilizando técnicas de litografía, particularmente técnicas de fotolitografía, para formar los patrones de electrodos e interconexiones (a veces denominados en la técnica como interconexiones o cables). El sustrato aislante es generalmente, pero no siempre, un polímero. Como se sabe en la técnica, se puede usar una o una pluralidad de capas, para obtener placas “bidimensionales” (por ejemplo, todos los electrodos e interconexiones en un plano) o “tridimensionales” (en las que los electrodos están en una superficie y las interconexiones pueden atravesar la placa hacia el otro lado). Los sistemas tridimensionales con frecuencia se basan en el uso de perforación o grabado, seguido de galvanoplastia con un metal tal como el cobre, de modo que se obtienen las interconexiones “a través de la placa”. Los materiales de la placa de circuito a menudo se proporcionan con una lámina metálica ya unida al sustrato, tal como una lámina de cobre, con cobre adicional añadido según sea necesario (por ejemplo, para interconexiones), por ejemplo, mediante galvanoplastia. Es posible entonces que la superficie de cobre se haga rugosa, por ejemplo, mediante grabado, para permitir la unión de la capa de adhesión.

En algunas realizaciones, y como se discute en más detalle aquí, el electrodo puede comprender opcionalmente y además un agente de pasivación. Como se usa aquí, el término “pasivación” generalmente significa la alteración de una superficie reactiva a un estado menos reactivo. La pasivación puede referirse, por ejemplo, a la disminución de la reactividad química de una superficie, o a la disminución de la afinidad de una superficie por los ácidos nucleicos. Dicho de otra manera, la pasivación es un método mediante el cual una superficie se recubre con un resto que tiene la capacidad de bloquear la unión posterior a la superficie en los puntos en los que se une el resto.

En algunas realizaciones, un agente de pasivación tiene la forma de una monocapa en la superficie del electrodo. La eficiencia de la hibridación puede aumentar cuando la sonda de detección está a una distancia del electrodo. Una capa de agente de pasivación facilita el mantenimiento de la sonda lejos de la superficie del electrodo. Además, un agente de pasivación puede servir para mantener los portadores de carga alejados de la superficie del electrodo. De este modo, esta capa puede ayudar a prevenir el contacto físico o eléctrico directo entre los electrodos y las nanopartículas de las sondas de detección, o entre el electrodo y las especies cargadas dentro de la disolución de compuesto redox. Tal contacto puede dar como resultado un “cortocircuito” directo o un cortocircuito indirecto a través de especies cargadas que pueden estar presentes en la muestra. Por consiguiente, la monocapa de agentes de pasivación está de forma preferible fuertemente empaquetada en una capa uniforme sobre la superficie del electrodo, de modo que exista un mínimo de “orificios”.

En algunas realizaciones, el electrodo comprende una pluralidad de biosondas unidas a la superficie del electrodo en un formato de matriz. Como se usa aquí, las expresiones “micromatriz de ácido nucleico” y “matriz de hibridación de ácido nucleico” se usan indistintamente, y significan una disposición de una pluralidad de secuencias de nucleobases (por ejemplo, biosondas) unidas a un soporte (por ejemplo, un electrodo). Las expresiones “matriz direccionable” y “matriz” se usan indistintamente, y significan una pluralidad de entidades dispuestas en un soporte de tal manera que cada entidad ocupa una posición única e identificable. En los métodos descritos aquí, las

entidades son biosondas (por ejemplo, oligonucleótidos de captura) inmovilizados en la superficie de un electrodo. Como se usa aquí, los términos “inmovilizar” y “unir” se usan indistintamente para significar una asociación química y/o mecánica de un resto con una o más superficies (por ejemplo, superficies sólidas). La asociación puede ser covalente o no covalente, y puede ser directa o indirecta.

5 En algunas realizaciones, las biosondas unidas a la superficie de un electrodo se ordenan de modo que cada muestra de biosonda tenga una ubicación única e identificable en el soporte. La ubicación física en el electrodo en el que se une o inmoviliza una biosonda se denomina aquí como un “punto de unión”. La identidad de una biosonda unida a un electrodo en una ubicación determinada se puede determinar de varias maneras. Una forma ejemplar de correlacionar una biosonda con su ubicación es unir la biosonda al soporte en una posición conocida (véase, por ejemplo, Pirrung, (1997) *Chem. Rev.* 97: 473-486). Las ubicaciones discretas en el soporte se pueden identificar mediante un sistema de coordenadas tipo cuadrícula. En este enfoque, el área de trabajo de la superficie de soporte se puede dividir en áreas discretas que pueden denominarse indistintamente como “puntos” o “parches”. Posteriormente, se pueden unir diferentes biosondas a la superficie de forma ordenada, por ejemplo, una biosonda, o una muestra de sondas idénticas, a un punto. En esta estrategia, los oligómeros de sonda se pueden aplicar uno o varios a la vez. En un método ejemplar, los sitios en los que podría ser deseable bloquear temporalmente la unión de la sonda se pueden bloquear con un agente de bloqueo. El agente de bloqueo se puede eliminar posteriormente, y el sitio se puede liberar para la unión de la sonda. Este procedimiento puede repetirse cualquier número de veces, lo que facilita así la unión de una sonda conocida en una ubicación conocida en un soporte.

La localización de biosondas en la superficie de un electrodo en ubicaciones conocidas puede implicar el uso de microtransferencia. En este enfoque, la ubicación de las biosondas en una superficie de un electrodo se determina mediante la aplicación ordenada de muestras de sonda en un grupo. Es decir, las biosondas se ordenan en ubicaciones conocidas antes de la aplicación a la superficie del electrodo. De esta manera, la ubicación de cada sonda se conoce a medida que se aplica. Los dispositivos apropiados para llevar a cabo este enfoque están disponibles comercialmente, y se pueden usar con los métodos de detección descritos aquí.

25 Como se expuso anteriormente, en algunas realizaciones se usa una secuencia de ácido nucleico monocatenario como una biosonda. Por ejemplo, una biosonda puede comprender una secuencia de ADNc monocatenario complementaria a un gen diana de interés o a un dominio diana del mismo. La biosonda se puede unir a la superficie del electrodo indirectamente a través de un “enlazador de unión”, como se define aquí. En esta realización, un extremo de un enlazador de unión está unido a una biosonda, mientras que el otro extremo (aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, no necesita ser el término exacto para ninguno) está conectado al electrodo.

El método de unión de la biosonda al enlazador de unión generalmente se puede realizar como se conoce en la técnica, y dependerá de la composición del enlazador de unión y la biosonda. En general, la biosonda se une al enlazador de unión mediante el uso de grupos funcionales en cada resto, que después se pueden usar para la unión. Ejemplos de grupos funcionales para la unión son grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo, y grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, las biosondas se pueden unir usando grupos funcionales en la superficie del electrodo.

En un ejemplo de un enfoque de unión adecuado para la unión de biosondas a la superficie de un electrodo, una o más secuencias de captura de sonda se incuban inicialmente con una disolución de un tioalcohol durante un período de tiempo preseleccionado. En algunas realizaciones, el mercaptohexanol de C6 se emplea como un tioalcohol. Se añaden tioalcohol y biosonda en cantidades para llevar la concentración final de biosonda en la disolución hasta alrededor de 20% o menos. El tiempo de incubación permite la asociación covalente del extremo 3' del oligonucleótido de la biosonda con el grupo hidroxilo del tioalcohol. La disolución se expone después a la superficie de un soporte en condiciones que permiten la asociación del átomo de azufre del grupo tio con la superficie del soporte. El equipo adecuado está disponible comercialmente, y puede usarse para ayudar en la unión de una secuencia diana a una superficie de soporte.

En otro ejemplo específico, se forma una monocapa de ácido 12-fosfonododecanoico en la superficie del electrodo. El ácido carboxílico del ácido 12-fosfonododecanoico se activa después por hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para formar un intermedio de O-acilisourea. Véanse, por ejemplo, S. H. Brewer et al., *Langmuir* (2002) 18, 6857-6865; B. L. Frey y R. M. Corn, *Analytical Chemistry* (1996) 68, 3187-3193; M. Burgener et al., *Bioconjugate Chemistry* (2000) 11, 749-754; K Kerman et al., *Analytica Chimica Acta* (2002) 462, 39-47; E. Huanq et al., *Langmuir* (2000) 16, 3272-3280; y G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (1996) (Academic Press: San Diego). Este grupo de ácido carboxílico activado es atacado por la amina primaria (que actúa como un nucleófilo) de una cadena de ADN monocatenario C3H2 modificado en 5' para formar un enlace amídico entre la monocapa de ácido 12-fosfonododecanoico y el ADNmc de C3H2 modificado en 5'.

Otros grupos funcionales útiles para unir oligonucleótidos a superficies sólidas (es decir, electrodos y nanopartículas) incluyen, por ejemplo, restos que comprenden tioles, carboxilatos, hidroxilos, aminas, hidrazinas, ésteres, amidas, haluros, grupos vinilo, carboxilatos de vinilo, fosfatos, compuestos orgánicos que contienen silicio, y sus derivados. Otros grupos funcionales útiles para la unión incluyen grupos fosfortioato (véase, por ejemplo, patente estadounidense nº 5.472.881 para la unión de oligonucleótidos-fosfortioatos a superficies de oro), aminosilanos (véase, por ejemplo, K. C. Grabar et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1996) 118,1148), y alquilsiloxanos sustituidos (véanse,

por ejemplo, Burwell, *Chemical Technology* 4, 370-377 (1974) and Matteucci and Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 31853191 (1981) para la unión de oligonucleótidos a superficies de sílice y vidrio, y Grabar et al., *Anal. Chem.*, 67,735-743, para la unión de aminoalquilsiloxanos y para la unión similar de mercaptoalquilsiloxanos). Los oligonucleótidos terminados con un 5' tionucleósido o un 3' tionucleósido también pueden usarse para unir oligonucleótidos a superficies de electrodos sólidos. La longitud de estos grupos funcionales de unión se escoge de modo que la conductividad de estas moléculas no impida la transferencia de electrones desde la nanopartícula al electrodo a través de la sonda hibridada y los ácidos nucleicos diana. Dicho de otra manera, se prefiere que estos grupos funcionales tengan conductividades más altas que el ácido nucleico bicatenario.

En algunas realizaciones, se puede emplear una secuencia de ácido nucleico de "etiqueta" o "enlazador" para unir las biosondas a las superficies de los electrodos. Cuando se emplea una secuencia de etiqueta, un electrodo puede comprender un complemento de ácido nucleico de etiqueta. Un complemento de etiqueta es una secuencia que es complementaria a una secuencia de etiqueta asociada con una biosonda. De este modo, cuando una biosonda que comprende una secuencia de etiqueta se pone en contacto con un electrodo que comprende un complemento de etiqueta en condiciones de hibridación adecuadas, se puede formar un dúplex.

Una secuencia de etiqueta puede comprender, por ejemplo, una secuencia que es complementaria a un complemento de etiqueta unido al soporte. Una secuencia de etiqueta puede asociarse con una secuencia diana, que después puede amplificarse por PCR antes de la asociación con una nanopartícula. El amplicón de PCR comprenderá una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de etiqueta y una secuencia diana. El amplicón de PCR comprende entonces una secuencia que es complementaria a un complemento de etiqueta unido al soporte. La inclusión de una secuencia de etiqueta, por ejemplo, como un componente de una secuencia diana, ofrece la ventaja de que un soporte no necesita ser específico para una secuencia diana determinada, sino que puede ser universal en el sentido de que es específico para un complemento de etiqueta, pero no para ninguna secuencia diana particular. De este modo, al emplear un complemento de etiqueta, un electrodo (o nanopartícula, como se describe aquí) puede ser independiente de la fuente de un oligonucleótido de biosonda (en cuanto a especies, etc.) en el sentido de que el electrodo puede ser específico para una secuencia de etiqueta, pero no para ninguna secuencia de biosonda particular. De este modo, al emplear un método que comprende el uso de un enfoque de complemento etiqueta-etiqueta, se mitiga la necesidad de formar diferentes soportes de electrodo para diferentes sondas y/o secuencias diana. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/21820, WO 97/31256, WO 96/41011 y la patente estadounidense nº 5.503.980.

Tras la unión de una biosonda a la superficie del electrodo, las áreas de la superficie del electrodo a las que no se une ninguna sonda pueden pasivarse, como se definió anteriormente. Se puede implementar un procedimiento de pasivación después de que las sondas se unen al soporte, y puede incluir síntesis secuenciales y enfoques de codeposición, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, la pasivación se logra exponiendo la superficie a tialcohol, como se describió anteriormente. Por ejemplo, se puede usar el mismo tialcohol para pasivar la superficie que se usó para unir la sonda a la superficie. En algunas realizaciones, se pueden emplear tialcoholes de longitud más corta o más larga que las usadas para unir biosondas.

En algunas realizaciones, otras moléculas, es decir, "restos de pasivación", se pueden usar para pasivar la superficie de un soporte. Por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), diversos alcoholes y carboxilatos se pueden usar para pasivar la superficie de un soporte, al igual que los restos COO⁻ y CONH₂. En algunas realizaciones, los restos de pasivación también pueden estar unidos de forma no covalente o covalente. De hecho, prácticamente cualquier material puede usarse para pasivar una superficie de soporte, entendiéndose que el material de pasivación debe asociarse con el soporte para formar una capa protectora que cubra el soporte, y que el procedimiento de pasivación, que puede realizarse después de que una sonda ya esté asociada con la superficie del soporte, no dañe ninguna sonda ya unida al soporte. Como se describió anteriormente, también se puede realizar una etapa de pasivación para reducir el potencial de asociación no específica entre un complejo de nanopartículas y un soporte.

Al analizar una muestra líquida utilizando electrodos y equipos y técnicas electrónicas, el tamaño y la separación de los electrodos pueden afectar si la difusión de un analito a través de la muestra a un electrodo se produce por un camino plano o no plano. Las matrices de microelectrodos son de un tamaño y separación tales que, al detectar especies químicas de una disolución, las especies se difundirán hacia un electrodo de la matriz de microelectrodos o se acercarán a ellas de una manera no plana, por ejemplo, en una trayectoria curva o hemisférica de difusión. En contraste, los no microelectrodos, es decir, los "macroelectrodos", provocan la difusión de un analito a través de un soluto de acuerdo con una trayectoria sustancialmente plana. También se entiende que algunas configuraciones de electrodos pueden provocar que la difusión tenga lugar mediante una combinación de trayectorias planas y no planas, en cuyo caso los electrodos pueden considerarse una matriz de microelectrodos, especialmente si la difusión ocurre predominantemente (por ejemplo, superior al 50%) según una trayectoria no plana, o si el tamaño de los electrodos es menor que 100 µm.

Los electrodos de una matriz de microelectrodos se colocan uno cerca del otro en una disposición que dará como resultado una difusión no plana como se describió. La disposición de los electrodos puede ser cualquier disposición que dé como resultado dicha difusión, estando un electrodo de trabajo y un contraelectrodo separados de manera sustancialmente uniforme entre sí. Un electrodo puede estar dispuesto en una forma o figura o contorno que producirá intersticios dentro de los cuales se puede colocar el segundo electrodo. Por ejemplo, un electrodo puede

5 disponerse como un radio creciente, espiral sustancialmente circular, creándose un área intersticial continua, larga y estrecha entre cada revolución sucesivamente más grande del electrodo. El otro electrodo puede colocarse en el área intersticial entre revoluciones, mientras que los electrodos permanecen aislados entre sí. La anchura y la separación de los electrodos se pueden organizar para dar como resultado un comportamiento de matriz de microelectrodos.

10 Según otras formas de tales matrices de microelectrodos, la espiral puede no ser sustancialmente circular, pero podría incluir características lineales, cuadradas, anguladas u oblongas u ovals. O, los electrodos podrían estar dispuestos en cualquier otra forma geométrica mediante la cual los electrodos se coloquen adyacentes entre sí y dentro del área intersticial respectiva del otro, por ejemplo, siguiendo un camino similar separado por un espacio sustancialmente uniforme.

15 En una realización particular, el microelectrodo puede estar dispuesto en una matriz interdigitada, lo que significa que al menos una parte de los elementos de electrodo del electrodo de trabajo se colocan sustancialmente paralelos y en sucesión alterna con al menos una parte de los elementos de electrodo del contraelectrodo, por ejemplo, en un patrón alternativo "similar a un dedo". Tales matrices de microelectrodos interdigitadas incluyen elementos de electrodo (a veces denominados "dedos") y un elemento común ("tira de contacto") que comúnmente conecta los elementos de electrodo.

20 Los electrodos y sus componentes pueden ser de dimensiones, es decir, la anchura de los componentes del electrodo, así como la separación entre los componentes que pueden proporcionar una matriz con propiedades útiles, por ejemplo, capacidades útiles o ventajosas con respecto al contacto de una sustancia o la medida de propiedades eléctricas. Ventajosamente, las matrices interdigitadas se pueden preparar en dimensiones que permiten el contacto y la medida de las propiedades eléctricas de una muestra relativamente pequeña de una sustancia.

25 El grosor de los componentes del electrodo puede ser suficiente para soportar una corriente eléctrica deseada. Los grosores ejemplares pueden estar en el intervalo de alrededor de 20 a 200 nanómetros (nm), siendo un grosor ejemplar alrededor de 10-50 nm.

30 Los electrodos pueden tener independientemente una cantidad de elementos de electrodo interdigitados suficiente para proporcionar utilidad, por ejemplo, permitiendo el contacto con una sustancia para medir su comportamiento eléctrico. Convencionalmente, la matriz puede tener sustancialmente el mismo número (igual, más o menos uno) de elementos de electrodo en el electrodo de trabajo que en el contraelectrodo, permitiendo que los elementos de electrodo se emparejen uno al lado del otro en una secuencia alterna. En algunas realizaciones de la matriz, tal como en algunas de las aplicaciones descritas a continuación para sensores electroquímicos, cada electrodo de una matriz puede tener típicamente de alrededor de 4 a alrededor de 30 elementos de electrodo.

35 Un electrodo ejemplar es un microelectrodo nanoestructurado (NME). Los NME son electrodos, que están nanotexturizados, y de este modo tienen un área superficial aumentada. Los NME de los materiales descritos anteriormente son altamente conductores y forman fuertes enlaces con las biosondas. Los NME ejemplares tienen una altura en el intervalo de alrededor de 0,5 a alrededor de 100 micrómetros (μm), por ejemplo en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 20 micrómetros (por ejemplo, 10 micrómetros); un diámetro en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 10 micrómetros; y tienen morfología de nanoescala (por ejemplo, están nanoestructurados en una escala de longitud de alrededor de 1 a alrededor de 300 nanómetros, y más preferiblemente en el intervalo de alrededor de 10 a alrededor de 20 nanómetros). Los NME pueden tener cualquiera de una variedad de formas, incluyendo hemiesférica, irregular (por ejemplo, puntiaguda), cíclica (similar a un cable) o fractal (por ejemplo, dendrítica). La superficie de un NME puede recubrirse adicionalmente con un material, que mantiene la alta conductividad del electrodo, pero facilita la unión con una sonda. Por ejemplo, los NME que contienen nitrógeno (por ejemplo, TiN, WN o TaN) pueden unirse con un grupo funcional amina de la sonda. De manera similar, la química de silicio/sílice como parte del NME puede unirse con un grupo silano o siloxano en la sonda.

SISTEMAS DE DETECCIÓN INFORMADORES

50 Los sistemas informadores pueden incluir informadores químicos o biológicos. En algunas realizaciones, el sistema informador puede ser un fragmento de enzima, (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente estadounidense nº 2007/0105160), una proteína (por ejemplo, c-myc u otra proteína de etiqueta o fragmento de la misma), una etiqueta de enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta de fluoróforo, una etiqueta de cromóforo, una etiqueta activada por Raman, una etiqueta quimioluminiscente, un marcador de punto cuántico, un anticuerpo, una etiqueta radiactiva, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, la actividad enzimática se monitoriza antes y después del tratamiento para determinar si la actividad enzimática se modula mediante el tratamiento con compuestos o agentes de ensayo. En otros aspectos, la actividad fluorescente se monitoriza antes y después del tratamiento para determinar si los niveles de marcador, por ejemplo, los niveles fluorescentes inducidos por FRET, se modulan mediante el tratamiento con compuestos o agentes de ensayo.

En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente incluye un colorante fluorescente o fluoróforo. Una diversidad de fluoróforos con un intervalo de color distinguible permite la visualización de múltiples dianas en paralelo. Los ejemplos de colorantes fluorescentes desarrollados como marcadores incluyen colorantes de fluoresceína y rodamina (colectivamente denominados colorantes de xanteno). Por ejemplo, los colorantes de tipo fluoresceína, tales como FAM, JOE, HEX y NED, se usan para preparar sondas de PCR en tiempo real, o las denominadas sondas TaqMan® (Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E. U.U.* 88, 7276(1991); Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21, 3761(1993). Asimismo, se han utilizado diversos colorantes de rodamina para preparar sondas de PCR en tiempo real basadas en oligonucleótidos homomarcados doblemente con dos colorantes idénticos (Mao, et al., solicitud de patente estadounidense nº 20050272053). Los anticuerpos marcados fluorescentemente son herramientas importantes en las detecciones basadas en inmunquímica de fluorescencia, y los colorantes de fluoresceína y rodamina se encuentran entre los primeros colorantes utilizados para preparar conjugados de anticuerpos. Sin embargo, muchos de estos colorantes de xantenos sufren problemas de extinción de la fluorescencia y baja solubilidad en agua.

Los colorantes de xanteno que absorben y emiten en una variedad de colores también pueden usarse como un sistema informador. Los colorantes de xanteno con absorción/emisión de longitud de onda corta incluyen, por ejemplo, fluoresceína y rodamina 110 y rodamina 110 sulfonada. Los colorantes de xanteno con perfil de absorción/emisión de longitud de onda más larga incluyen el derivado de fluoresceína JOE, que tiene un sustituyente metoxi en las posiciones 4 y 5, respectivamente, tiene máximos de absorción/emisión a 520/548 nm, en comparación con el colorante original fluoresceína (o FAM), que tiene absorción/emisión a 495/520 nm. El colorante de rodamina ROX tiene absorción/emisión a 575/602 nm, en comparación con el colorante de rodamina original carboxi-rodamina 110, que absorbe y emite a 502/524 nm. Los colorantes adicionales se describen por Sauer, et al. *Journal of Fluorescence* 5(3), 247(1995), David, et al. *Tetrahedron Letters* 49(11), 1860(2008), y Liu, et al. *Tetrahedron Letters* 44, 4355(2003).

GRUPOS INFORMADORES ELECTROCATALÍTICOS

El informador redox puede ser un centro metálico activo redox o una molécula orgánica activa redox. Puede ser un cofactor orgánico natural, tal como NAD, NADP, FAD, o un centro metálico natural tal como Cobre Azul, agrupamientos de hierro-azufre o hemo, o un centro sintético tal como un compuesto organometálico tal como un complejo de rutenio, ligando orgánico tal como una quinona, o un centro metálico diseñado por ingeniería introducido en la proteína, o sitio de unión de cofactor orgánico diseñado por ingeniería. Los sitios de unión de cofactores se pueden diseñar utilizando un diseño racional o técnicas de evolución dirigida. El informador redox puede unirse covalentemente o no covalentemente a la proteína, ya sea por interacciones específicas del sitio o adventicias entre el cofactor y la proteína. Puede ser intrínseco a la proteína, tal como un centro metálico (natural o diseñado por ingeniería) u orgánico natural (NAD, NADP, FAD) o cofactor organometálico (hemo), o extrínseco (tal como un agrupamiento organometálico sintético acoplado covalentemente). El informador redox puede estar, por ejemplo, unido (por ejemplo, covalentemente) a un resto en la superficie de la proteína.

El informador redox puede ser un grupo que contiene metales (por ejemplo, un grupo que contiene metal de transición) que es capaz de transferir reversible o semi-reversiblemente uno o más electrones. Se pueden usar varios posibles grupos informadores que contienen metales de transición. Ventajosamente, el grupo informador tiene un potencial redox en la ventana de potencial más abajo que está sujeto a la interferencia mediante oxígeno molecular, y tiene un grupo funcional adecuado para el acoplamiento covalente a la proteína (por ejemplo, funcionalidades reactivas de tiol tales como maleimidias o yodoacetamida para el acoplamiento a restos de cisteína únicos en la proteína). El metal del grupo informador debe insertarse sustitucionalmente en estados reducidos u oxidados (es decir, ventajosamente, los grupos exógenos no forman enlaces adventicios con el grupo informador). El grupo informador puede ser capaz de experimentar un cambio amperométrico o potenciométrico en respuesta a la unión del ligando. En una realización, el grupo informador es soluble en agua, es capaz de acoplamiento específico del sitio a una proteína (por ejemplo, a través de un grupo funcional reactivo con tiol en el grupo informador que reacciona con una cisteína única en la proteína), y experimenta una respuesta potenciométrica tras la unión del ligando. Los metales de transición adecuados para uso aquí incluyen, pero no se limitan a, cobre (Cu), cobalto (Co), paladio (Pd), 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), volframio (W) e iridio (Ir). Es decir, pueden usarse la primera serie de metales de transición, los metales de platino (Ru, Rh, Pd, Os, Ir y Pt), junto con Fe, Re, W, Mo y Tc. Los metales ejemplares que no cambian el número de sitios de coordinación al cambiar el estado de oxidación incluyen rutenio, osmio, hierro, platino y paladio.

El grupo informador puede estar presente en el biosensor como un conjugado covalente con la proteína, o puede ser un centro metálico que forme parte de la matriz proteica (por ejemplo, un centro redox tal como agrupamientos de hierro-azufre, hemo, Cobre Azul, cuyas propiedades electroquímicas son sensibles a su entorno local). Alternativamente, el grupo informador puede estar presente como una fusión entre la proteína y un dominio de unión a metal (por ejemplo, una pequeña proteína activa redox tal como un citocromo). Preferiblemente, el grupo informador se conjuga covalentemente a la proteína a través de un grupo funcional maleimida unido a una cisteína (tiol) en la proteína. En cualquier caso, el grupo informador está unido a la proteína para que se ubique entre la proteína y el electrodo.

En la realización actual, para transducir la hibridación de ácidos nucleicos en una señal eléctrica, se utiliza un sistema informador electrocatalítico previamente desarrollado por nuestro laboratorio (Lapierre, M. A. et al., *Anal. Chem.* 2003, 75, 6327-6333). Este sistema informador se basa en la acumulación de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en las superficies de los electrodos cuando se unen especies polianiónicas tales como los ácidos nucleicos, y la catálisis de la reducción de Ru(III) vía la inclusión de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, que regenera Ru(III) y permite múltiples reducciones por centro de metal. Cuando los NME modificados con ANP se expusieron a una secuencia complementaria, los cambios de señal detectables se pudieron detectar claramente a través del intervalo de concentración femtomolar. Se observaron cambios insignificantes en la señal con secuencias completamente no complementarias.

DIANAS DE ÁCIDO NUCLEICO

Se puede seleccionar una secuencia diana en función del contexto en el que se emplean los presentes métodos. Las secuencias diana pueden variar ampliamente. Por ejemplo, las secuencias diana deseables incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico características o únicas que se encuentran en diversos microbios, o ADN mutado que puede usarse en el diagnóstico de enfermedades, en la biorremediación ambiental, en la determinación de trastornos genéticos, y en epidemiología genética. También se pueden usar como secuencias diana los equivalentes funcionales de secuencias conocidas.

La secuencia diana puede ser una porción de un gen, una secuencia reguladora, ADN genómico, ADNc, ARN que incluye ARNm y ARNr, u otros. La secuencia diana puede ser una secuencia diana de una muestra biológica, como se discute aquí, o puede ser una diana secundaria, tal como un producto de una reacción de amplificación. La secuencia diana puede tomar muchas formas. Por ejemplo, una diana puede estar contenida dentro de una secuencia de ácido nucleico más grande, es decir, todo o parte de un gen o ARNm, un fragmento de restricción de un ADN plasmídico o genómico, entre otros. Los ácidos nucleicos diana pueden escindirse de una muestra de ácido nucleico más grande usando endonucleasas de restricción, que cortan las secuencias de ácido nucleico en puntos conocidos de una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico escindidas pueden aislarse y purificarse empleando técnicas estándar. Las secuencias diana también se pueden preparar mediante procedimientos de transcripción inversa. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y. (1992)). Una secuencia diana puede comprender uno o más dominios diana diferentes. Un dominio diana es una secuencia contigua, parcial (es decir, una subsecuencia) de toda la secuencia diana, y puede tener cualquier longitud de nucleótidos que sea más corta que la secuencia diana completa. En algunas realizaciones, un primer dominio diana de una secuencia diana hibrida una sonda de captura, mientras que un segundo dominio diana diferente hibrida un componente oligonucleotídico de una sonda de detección. Los dominios diana pueden estar adyacentes o separados, como se indica. Por ejemplo, un primer dominio diana puede estar directamente adyacente (es decir, contiguo) a un segundo dominio diana, o el primer y segundo dominio diana pueden estar separados por un dominio diana intermedio. Suponiendo una orientación de 5' a 3' de una secuencia diana, un primer dominio diana puede ubicarse en 5' con respecto a un segundo dominio diana, o en 3' con respecto a un segundo dominio.

Si se desea, una secuencia diana puede comprender además un resto adicional, tal como una pareja de un par de unión a ligando, para facilitar la unión a una sonda de detección que comprende una nanopartícula unida a la otra pareja del par de unión a ligando. Por ejemplo, la secuencia diana puede comprender un resto de biotina, que facilitará la unión a una sonda de detección que comprende una nanopartícula unida a estreptavidina. El resto de biotina se puede incorporar a la secuencia diana usando métodos de amplificación que son análogos a los métodos conocidos usados para incorporar restos fluorescentes en las moléculas diana, como se expone con más detalle a continuación. Las secuencias de ácido nucleico de cualquier longitud práctica se pueden usar como secuencia diana. Generalmente, una secuencia diana tiene una longitud entre 10 y 50 nucleótidos, y de este modo se pueden emplear secuencias diana de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o más nucleótidos. Sin embargo, las secuencias diana de cualquier longitud pueden emplearse en los métodos descritos aquí, y en algunos casos, pueden ser más cortas que diez nucleótidos y más largas que 50 nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias diana pueden tener alrededor de 60 nucleótidos de largo, alrededor de 75 nucleótidos de largo, alrededor de 85 nucleótidos de largo, alrededor de 100 nucleótidos de largo, alrededor de 200 nucleótidos de largo, alrededor de 300 nucleótidos de largo, alrededor de 400 nucleótidos de largo, alrededor de 500 nucleótidos de largo, o incluso más. En algunos casos, la secuencia diana puede tener entre 60 y 500 nucleótidos de longitud. Si lo desea el experto, una secuencia diana puede fragmentarse antes de las etapas de hibridación mediante el uso de medios enzimáticos, mecánicos u otros medios como se conoce en la técnica.

En algunas realizaciones, las secuencias diana pueden aislarse de muestras biológicas, incluyendo, pero sin limitarse a, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración, semen, etc., de prácticamente cualquier organismo); muestras ambientales (por ejemplo, muestras de aire, plantas, agricultura, agua y suelo); y muestras de investigación (es decir, productos de reacción de amplificación, muestras purificadas tales como ácidos nucleicos genómicos purificados, y muestras no purificadas de bacterias, virus, ADN genómico, etc.).

Si es necesario, el ácido nucleico diana puede aislarse de muestras biológicas utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las muestras se pueden recolectar y concentrar o lisar, según sea necesario. También se puede realizar un ajuste apropiado del pH, el tiempo de tratamiento, las condiciones líticas, y los reactivos modificadores de la

muestra, para optimizar las condiciones de reacción. Dichas técnicas de modificación son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos para el aislamiento y la purificación de ácido nucleico pueden comprender el aislamiento simultáneo de, por ejemplo, ácido nucleico total, o el aislamiento separado y/o secuencial de tipos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ADN de orgánulo, ARN genómico, ARNm, ARN poliA+, ARNr, ARNt) seguido de una combinación opcional de múltiples tipos de ácido nucleico en una sola muestra.

Los métodos para el aislamiento de ácido nucleico pueden optimizarse opcionalmente para promover la recuperación de ácidos nucleicos específicos de patógenos. En algunos organismos, por ejemplo, hongos, protozoos, bacterias grampositivas, y bacterias ácidosresistentes, la lisis celular y la liberación de ácido nucleico pueden ser difíciles de lograr usando procedimientos generales, y por lo tanto se puede escoger un método que cree una pérdida mínima del subconjunto de patógenos de la muestra. Los métodos de extracción semiautomatizados y automatizados también se pueden utilizar para el aislamiento de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana comprende un ácido nucleico bicatenario. Las secuencias de ácido nucleico bicatenario se pueden preparar, por ejemplo, aislando un segmento de ADN bicatenario. Alternativamente, se pueden sintetizar copias múltiples de oligonucleótidos complementarios monocatenarios e hibridarlos entre sí en condiciones apropiadas. Para proporcionar una diana monocatenaria para la hibridación, los ácidos nucleicos bicatenarios se desnaturalizan preferiblemente antes de la hibridación. El término "desnaturalización" se refiere al procedimiento por el cual las cadenas de dúplex de oligonucleótidos ya no se emparejan con bases por enlaces de hidrógeno y se separan en moléculas monocatenarias. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de desnaturalización, e incluyen la desnaturalización térmica y alcalina. Los métodos de aislamiento de ARN son conocidos por un experto en la técnica. Véanse, Albert et al. (1992) *J Virol* 66:5627-2630; Busch et al. (1992) *Transfusion* 32:420-425; Hamel et al. (1995) *J Clin Microbiol* 33:287-291; Herrewegh et al. (1995) *J Clin Microbiol* 33:684-689; Izraeli et al. (1991) *Nuc Acids Res* 19:6051; McCaustland et al. (1991) *J Virol Methods* 35:331342; Nataraiian et al. (1994) *PCR Methods Appl* 3:346-350; Rupp et al. (1988) *BioTechniques* 6:56-60; Tanaka et al. (1994) *J Gen Virol* 75:2691-2698; y Vankerckhoven et al. (1994) *J Clin Microbiol* 30:750-753.

La selección del ARNm como diana es atractiva dado que la mayoría de los ARNm existen como secuencias lineales, y por lo tanto no se requiere la desnaturalización. Las copias múltiples de los ARNm están típicamente presentes dentro de una célula, proporcionando amplificación integrada a nivel celular, mejorando las perspectivas para el análisis directo de pequeñas cantidades de células. Sin embargo, los tamaños grandes de ARNm presentan un reto para la detección basada en chips ya que la difusión lenta de moléculas tan grandes puede impedir un análisis rápido.

Para ayudar en la detección de moléculas grandes, hemos aumentado el alcance del sensor en el volumen de la disolución, proporcionando así una mayor interacción entre las moléculas diana en disolución y las moléculas de biosonda atadas a la superficie del sensor. Utilizando modelos difusionales existentes (P. E. Sheehan et al., *Nano Lett.* 2005, 5, 803; y

P. R. Nair, et al., *Nano Lett.* 2008, 8, 1281), y teniendo en cuenta el número de copias del ARNm diana y su velocidad de difusión, cuando la huella espacial de nuestros sensores se incrementa hasta ~ 100 micrómetros, podemos detectar tan solo 10 células que expresan el ARNm diana en tiempos de análisis que se aproximan a los 30 minutos (se utilizó un volumen de 30 microlitros en este cálculo para producir una concentración de 1,7 fM para el ARNm).

En algunas realizaciones, un aumento de alrededor de 10% a alrededor de 20% en la señal, de alrededor de 10% a alrededor de 40% en la señal, o de alrededor de 1% a alrededor de 20% en la señal, en comparación con una señal de control en ausencia de nucleótido diana, se obtiene cuando la biosonda se hibrida con un nucleótido diana. En ciertas otras realizaciones, el aumento es de alrededor de 30%. En ciertas realizaciones, el aumento en la señal es alrededor de 40% cuando la biosonda se hibrida con un nucleótido diana. En algunas realizaciones, el aumento es alrededor de 50% a alrededor de 60%. En ciertas realizaciones, el aumento en la señal es alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, alrededor de 125%, alrededor de 150%, alrededor de 175%, o alrededor de 200% cuando el ácido nucleico diana se hibrida con las biosondas descritas aquí.

En algunas realizaciones, se obtiene una disminución de alrededor de 10% a alrededor de 20% en la señal cuando la biosonda se hibrida con un nucleótido diana. En ciertas otras realizaciones, la disminución es alrededor de 30%. En ciertas realizaciones, la disminución en la señal es alrededor de 40% cuando la biosonda se hibrida con un nucleótido diana. En algunas realizaciones, la disminución es alrededor de 50% a alrededor de 60%. En ciertas realizaciones, la disminución en la señal es alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, alrededor de 125%, alrededor de 150%, alrededor de 175%, o alrededor de 200% cuando el ácido nucleico diana se hibrida con las biosondas descritas aquí.

Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las realizaciones. Los métodos específicos ejemplificados se pueden practicar con otras especies. Los ejemplos están destinados a ejemplificar procesos genéricos.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Estrategia de diseño general para biosonda:**

5 Aquí, se describen moléculas de biosondas que exhiben propiedades mejoradas de solubilidad en agua y formación de monocapa con una agregación sustancialmente nula o escasa detectada que puede interferir apreciablemente con la unión de las moléculas de biosonda descritas con una secuencia de ácido nucleico diana. La introducción de grupos funcionales cargados en los extremos de la secuencia de nucleobase puede alterar beneficiosamente las propiedades de la sonda, incluyendo los perfiles de solubilidad. Una realización ejemplar es la unión de aminoácidos cargados a ANP, ADN y ARN usando una química de acoplamiento similar a la utilizada en la síntesis de ANP tradicional. Por ejemplo, la inclusión de suficientes unidades de aminoácidos cargados puede mejorar el comportamiento de la biosonda que comprende la nucleobase, por cuanto la solubilidad puede mejorarse en disolución acuosa, y puede exhibir un mejor comportamiento cuando se usa para detectar la biomolécula diana de interés. En caso de problemas persistentes de solubilidad o agregación, se puede usar una multitud de aminoácidos cargados. Los aminoácidos se pueden colocar en los extremos como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Secuencias de biosondas de muestra

Sonda nº	Secuencia	SEQ ID NO
1	Cys-Gly-NB-Xaa	1
2	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa	2
3	Cys-Gly-Xaa-Xaa-NB	3
4	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa	4
5	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa-Xaa	5
6	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa-Xaa-Xaa	6
7	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-NB	7
8	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-NB-Xaa-NB-	8
9	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-Xaa-NB-Xaa-	9
10	Cys-Gly-Xaa-Xaa-NB-Xaa-NB-Xaa-Xaa	10

15 en la que Xaa es un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Aad, Lys, Orn, Dab, Dap, Arg, o un aminoácido seleccionado de la Tabla 2, y NB es una secuencia de oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN. Los aminoácidos cargados pueden reemplazarse con los grupos funcionales cargados descritos aquí, que incluyen grupos funcionales aniónicos tales como carboxilato, sulfato o sulfonato, y grupos funcionales catiónicos tales como amina o guanadino. En algunas realizaciones, los grupos funcionales cargados se colocan intermitentemente a lo largo de la secuencia de nucleobase sin afectar negativamente la capacidad de la secuencia de nucleobase para hibridarse con la diana. La Figura 2D muestra diferentes estrategias para la colocación de aminoácidos cargados en conjugación con una secuencia de biosonda de 20 nucleobases.

Ejemplo 2: Gen diana

25 La fusión génica *bcr-abl* es específica de la leucemia mieloide crónica (CML) como un sistema modelo interesante para perfeccionar las capacidades de nuestros sensores basados en chips de manera que se pudieran analizar pequeñas cantidades de células cancerosas. El transcrito de ARNm de *bcr-abl* es una molécula de ARN que tiene una longitud de 8500 nucleótidos (F. vanRhee, et al., *Blood* 1996, 87, 5213-5217).

30 Como se describe más arriba, utilizando modelos difusionales existentes, y teniendo en cuenta el número de copias del ARNm de fusión *bcr-abl* (~3000 copias por célula) (M. Wilda, et al., *Oncogene* 2002, 21, 5716) y su velocidad de difusión, se determinó que aumentar la huella espacial de nuestros sensores hasta ~ 100 micrómetros, daría como resultado la detección de tan solo 10 células CML en tiempos de análisis que se aproximan a los 30 minutos (se utilizó un volumen de 30 microlitros en este cálculo para producir una concentración de 1,7 fM para el ARNm).

Ejemplo 3: Diseño de biosensores

35 El trabajo anterior sobre microsensores basados en chips se centró en sensores de paladio que tenían un diámetro de 5-10 micrómetros (L. Soleymani, et al., *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 844). Para extender el alcance de estos sensores en la disolución, era necesario usar oro como material de electrodo. El paladio electrochapado no produjo

tamaños de grano que permitieron el crecimiento del sensor en disolución, y en su lugar los sensores crecieron a lo largo de la superficie del chip. En contraste, la galvanoplastia de oro produjo estructuras puntiagudas con grandes subestructuras que se extienden muchos micrómetros en disolución cuando se utilizaron bajos potenciales de recubrimiento (Figura 5). Después de una amplia variación de las condiciones de recubrimiento (incluyendo el potencial de recubrimiento, el electrolito de soporte y el tiempo de recubrimiento), se obtuvieron biosensores con la huella deseada de 100 micrómetros (Figura 1B).

A fin de ensayar estos biosensores frente a la diana de ARNm de *bcr-abl*, se requirieron biosondas que se unirían específicamente a la región de unión entre los dos genes fusionados. Los esfuerzos iniciales para producir una sonda funcional para esta región (Figura 2) incluyeron la síntesis de biosondas de ADN y ANP. Cuando se expusieron a ARNm de la línea celular K562, que contiene la forma más común de la fusión génica *bcr-abl*, la hibridación no se detectó ni con biosondas de ADN ni con biosondas de ANP. El análisis de hibridación se realizó monitorizando las corrientes reductoras en una disolución que contiene un sistema informador electrocatalítico Ru(III)/Fe(III). La disolución utilizada en estos ensayos contenía 1 ng/μl de ARNm total, que contenía > 10.000.000 copias de la diana por microlitro, o > 20 pM - una concentración que debería haber sido fácilmente detectable en base a nuestros cálculos. Los biosensores modificados con biosonda de ADN exhibieron altas señales de fondo y pequeñas disminuciones en la corriente tras la introducción de la disolución de ARNm. El biosensor modificado con ANP exhibió una corriente de fondo mucho más baja, pero aquí también, solo se observaron pequeñas disminuciones en la corriente tras la hibridación con ARNm en lugar del aumento esperado.

Ejemplo 4: Diseño de biosondas

Puesto que las biosondas basadas en ANP y ADN no funcionaron como se desea, aquí se desarrolla una nueva clase de moléculas de sonda: quimeras de aminoácidos/ácidos nucleicos (ANA) que fueron necesarias para detectar un biomarcador de cáncer específico. Las ANA superan tres limitaciones fundamentales que descubrimos que surgen cuando se usan moléculas de sonda neutras: baja solubilidad, agregación y baja calidad de monocapa. El sistema sensor resultante dado a conocer aquí muestra una excelente sensibilidad y especificidad. Sorprendentemente, logra este excelente comportamiento, que requiere una única etapa de lisis celular simple antes del análisis, incluso cuando se analizan muestras no purificadas.

La introducción de aminoácidos cargados en los extremos de la secuencia de ANP descrita más arriba alteró beneficiosamente las propiedades de la sonda de ANP. La unión de aminoácidos a los ANP se logró utilizando una química de acoplamiento idéntica a la utilizada en la síntesis tradicional de ANP.

La inclusión de 2 unidades de ácido aspártico rectificó el comportamiento de nuestra sonda ya que ahora era altamente soluble en disolución acuosa, y exhibió un rendimiento mucho mejor cuando se usó para detectar el ARNm de *bcr-abl*. Se observaron bajas corrientes de fondo en los sensores modificados por sonda, y se produjeron aumentos significativos tras la hibridación del ARNm K562 que contiene la fusión (Figura 2C).

Ejemplo 5: Materiales y métodos experimentales:

Sustancias químicas y materiales. Cloruro de oro (III) (99,9%), cloruro de hexaaminarrutenio (III), ferricianuro de potasio, cloruro de magnesio y 6-mercapto-1-hexanol (97%), amortiguador TBE 10X, agarosa UltraPure™, dimetilformamida, piperidina, TFA, m-cresol, TIPS, éter dietílico, acetonitrilo, DTT se adquirieron de Sigma-Aldrich Canada Ltd.; ácido perclórico al 70%, ácido sulfúrico, acetona de grado ACS, y alcohol isopropílico se obtuvieron EMD; el ácido clorhídrico 6N se adquirió VWR. Los monómeros de ANP se adquirieron de Link Technologies, la resina Knorr se adquirió de NovaBiochem; HATU y N-metilmorfolina se adquirieron de Protein Technologies, Inc., y RedSafe™ de FroggaBio; la línea celular K562 se obtuvo de la ATCC, los matraces de suspensión de 25 ml se adquirieron de Sarstedt, el medio de cultivo de Dulbecco modificado de Iscove y el suero bovino fetal se obtuvieron de Invitrogen; las muestras de pacientes con LMC fueron proporcionadas por el Dr. Minden del Princess Margaret Hospital, la sangre completa se obtuvo en el laboratorio de sangre del Princess Margaret Hospital.

Preparación y purificación de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos ANA y ANP se sintetizaron utilizando el enfoque de síntesis en fase sólida en un sintetizador de péptidos automatizado Prelude (Protein Technologies, Inc.). Sonda de ANA que corresponde a e13a2: NH₂-Cys-Gly-Asp-TGAAGGGCTTCTCCTTATT-Asp-CONH₂ (SEQ ID NO: 11), y sonda de ANA que corresponde a e14a2: NH₂-Cys-Gly-Asp-TGAAGGGCTTTTGAAGGGCTT-Asp-CONH₂ (SEQ ID NO: 12). Las sondas de ANP contenían la misma secuencia, pero carecían de los restos de Asp. La sonda de ADN se adquirió comercialmente, y se añadió en nuestro laboratorio un enlazador que contiene tiol: TGAAGGGCTTTTGAAGGGCTT-enlazador-SH (SEQ ID NO: 13). La sonda de control negativo fue: NH₂-Cys-Gly-Asp-ATCTGCTCTGTGGTGTAGTT-Asp-CONH₂ (SEQ ID NO: 14). Todas las moléculas de la sonda se purificaron rigurosamente usando una HPLC Agilent serie 1100. La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Fabricación de chips. Los chips se produjeron en el Canadian Photonics Fabrication Center. Las obleas de silicio se pasivaron usando una capa gruesa de dióxido de silicio de 2 micrómetros que se hizo crecer térmicamente. Se depositó una capa de oro de 350 nm en el chip usando evaporación de oro asistida por haz de electrones. La película de oro fue modelada usando fotolitografía estándar y un procedimiento de despegue. Usando deposición

química de vapor se depositó una capa de dióxido de silicio aislante de 500 nm. Se expusieron cinco (5) micrómetros de aberturas circulares y almohadillas adhesivas de 2 × 2 mm en los electrodos a través de la capa superior utilizando fotolitografía estándar.

5 Fabricación de microelectrodos. Los chips se lavaron en acetona, se enjuagaron con alcohol isopropílico y después con agua desionizada, y se secaron brevemente con un flujo de nitrógeno. Toda la electrodeposición se realizó a temperatura ambiente con un potenciostato Bioanalytical Systems Epsilon con un sistema de tres electrodos que contiene un electrodo de referencia Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Las aberturas de 5 micrómetros en los chips se usaron como electrodo de trabajo y se pusieron en contacto usando las almohadillas de unión expuestas. La electrodeposición de microelectrodos de oro se realizó sumergiendo el chip en la disolución de recubrimiento (H_2AuCl_4 20 mM en ácido clorhídrico 0,5 M) y aplicando una constante de 0 mV durante 175 segundos.

15 Modificación de microelectrodos. Se añadió una disolución que contenía una sonda de ANP tiolada 5 μM en cloruro de sodio 50 mM a los sensores, y se dejó en una cámara de humedad oscura durante la noche a temperatura ambiente para el autoensamblaje de una monocapa. Después se añadió una disolución de MCH 10 μM a cada chip durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear la superficie desnuda del NME. El chip se lavó entonces dos veces con NaCl 50 mM.

20 Medidas electroquímicas. Las señales electroquímicas se midieron en una disolución que contenía $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 10 μM y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 2mM en 1X PBS. Se recogieron señales de voltamperometría de pulso diferencial antes y después de la hibridación, con una velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹, y se barrieron desde 0 mV hasta -350 mV. Los resultados se cuantificaron restando las corrientes máximas en barridos DPV de la siguiente manera, $\Delta I = I_{\text{después de la hibridación}} - I_{\text{antes de la hibridación}}$.

25 Cultivo celular. Células K562 se cultivaron en matraces de células en suspensión de 25 ml con tapas de ventilación en medio de Dulbecco modificado de Iscove/10% de suero fetal bovino. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada (70-95%) a 37,0°C con CO₂ (5%). Los cultivos se mantuvieron mediante el reemplazo por medio fresco cada 2 a 3 días. El subcultivo se realizó cuando la población celular alcanzó 500.000 células/ml. Preparación de células K562 y de muestras de pacientes. Células K562 se recogieron y se centrifugaron a 600 rcf durante 5 minutos a 4 °C. Después se retiraron los medios, y las células se lavaron con un volumen igual de 1X PBS. El pelete celular se resuspendió después en 1X PBS y se usó para lisis. Los lotes congelados de muestras de pacientes con CML se descongelaron rápidamente a 37 °C en un baño de agua. Inmediatamente, las células se añadieron a 10 ml de medio reciente suplementado con FBS al 10% y se centrifugaron a 400 rcf durante 5 minutos a 4 °C. El pelete se lavó con medio reciente, y el pelete se resuspendió en 1X PBS para uso posterior. Las muestras primarias se recolectaron después de autorización escrita de acuerdo con un protocolo aprobado por REB.

30 Aislamiento de ARNm. El ARNm total se aisló de las células usando Dynabeads® (Invitrogen). La calidad de la muestra de ARNm se evaluó utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1%.

35 Lisis celular. La lisis de las células (K562, muestras de pacientes, sangre completa) se logró usando una cámara de lisis eléctrica. Los cables de Pt utilizados para producir el campo eléctrico se insertaron en la membrana de PDMS (polidimetilsiloxano). Los canales para que fluya la disolución celular se hicieron con aguja de punta opaca y se ventilaron con N₂ durante 1 hora antes del uso. Las células resuspendidas se tomaron en una jeringa de 5 ml y se cargaron en una bomba de jeringa. En caso de sangre completa, se diluyó 100 veces en 1X PBS, y se cargó 1 ml en una jeringa de 5 ml. La lisis se logró a un caudal de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, 400 V y corriente de 1 mA.

40 Protocolo de hibridación. Las disoluciones de hibridación contenían ARNm total o lisado celular no purificado en NaCl 50 mM. Los electrodos se incubaron con las secuencias diana a 37 °C en una cámara de humedad en la oscuridad durante 30 minutos y se lavaron ampliamente dos veces con NaCl 50 mM antes del análisis electroquímico. El volumen de hibridación fue típicamente 30 μl .

45 **Ejemplo 6: Uso de biosensores en la detección de CML**

50 Con biosensores optimizados y sondas quiméricas de aminoácidos/ácido nucleico (ANA) a mano, el límite de detección y el intervalo dinámico se determinaron cuando el sistema se expuso a ARNm celular purificado. Se monitorizó una sonda de control con una secuencia no relacionada junto con la sonda bcr-abl, y no mostró ningún cambio de señal incluso a la concentración más alta ensayada, lo que indica que el ensayo tenía una especificidad excelente. Se observó una señal detectable tan baja como 1 $\text{pg}/\mu\text{l}$ de ARNm total (Figura 3), y la señal aumentó linealmente en cuatro logaritmos de concentración diana. Este resultado es comparable con un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comercialmente disponible diseñado para detectar específicamente CML; el ensayo tiene un límite de detección similar (Z. Jobbagy, et al., *Mol. Diagnostics*, 2007, 9, 220). Este sistema basado en chip es el primero en exhibir una sensibilidad similar a la PCR.

55 Si bien la PCR es una técnica altamente sensible para la detección de secuencias, a menudo requiere un amplio procesamiento de muestras y purificación de ácido nucleico para eliminar interferentes que inhiben las enzimas

utilizadas para la amplificación. Dado que nuestro sistema de detección no depende de ninguna reacción enzimática, es mucho más tolerante con las muestras no purificadas.

5 Para demostrar la detección de ARNm de fusión de una muestra no purificada, las células K562 se lisaron usando un campo eléctrico. La lisis rápida se logró (menos de 5 minutos) sin el uso de reactivos añadidos. Se generaron lisados que contenían 10 a 1000 células; los resultados de su incubación con sensores modificados con la sonda de bcr-abl se ilustran en la Figura 4A. El control negativo fue una sonda semi-complementaria (una sonda para la fusión génica e13a2), y se encontró que no mostraba aumento de señal, lo que confirma la especificidad del ensayo. La detección de 10 células - presentes como un lisado no purificado - indica que estos biosensores son altamente sensibles y robustos. Los leucocitos de pacientes con CML se analizaron después utilizando el mismo procedimiento de preparación de muestras solo de lisis y el sensor y el ensayo descritos anteriormente. El control negativo fue una sonda solo la mitad complementaria a la fusión génica bcr-abl. La ausencia de una señal positiva con el control negativo confirmó nuevamente la especificidad de la hibridación. Aquí, el límite de detección se acercó a 100 células, debido al hecho de que la muestra contenía tanto células CML como leucocitos normales.

Ejemplo 7: Detección de CML en muestras de sangre:

15 Se analizaron muestras de CML en sangre completa. El análisis de muestras complejas es desafiante debido a su heterogeneidad: en particular, el análisis directo en sangre puede verse obstaculizado por la rápida degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas, y por el ensuciamiento de las superficies por los componentes de la sangre. Se usó sangre enriquecida con células CML para determinar si el análisis de muestras de sangre completa sería factible. Se observó un desplazamiento de la señal de fondo cuando solo se usó sangre. El uso de una sonda de control se introdujo para seguir este cambio, que permaneció constante cuando se analizaron muestras con números variables de células K562. Al hacer referencia a las medidas para el caso de la sonda diana con el caso de la sonda de control, se detectaron tan solo 10 células K562 incluso en presencia de un exceso de células sanguíneas de 5.000.000 de veces (Figura 3E).

25 Este estudio representa el primer informe de una biosonda altamente sensible y específica para el análisis de biomarcadores de ácido nucleico en muestras relevantes. Se basa en la lisis directa de las células bajo estudio dentro de un medio – sangre - que comprende un gran exceso de moléculas no complementarias. Específicamente, los biosensores descritos aquí lograron la detección de ARNm derivado de 10 células presentes como un lisado no purificado, no procesado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Governing Counsel of the University of Toronto

Kelley, Shana O.

Fang, Zhichao

Vasilyeva, Elizaveta

<120> BIOSONDAS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> 39607-705.601

<140> A asignar

<141> 2012-02-03

<150> 61/440,336

<151> 2011-02-07

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

ES 2 818 586 T3

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<400> 1

Cys Gly Xaa Xaa
1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

Cys Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<400> 3

Cys Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 818 586 T3

<400> 5

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 818 586 T3

<400> 6

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<400> 7

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<400> 8

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 9

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Biosonda

<220>

<221> característica diversa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier oligonucleobase tal como un ADN, ANP o ARN

<220>

<221> característica diversa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica diversa

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 10

Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 11

tgaaggctt ctccttatt 20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 12

tgaaggctt ttgaactctg 20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 13

tgaaggcctt ttgaactctg 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 14

atctgctctg tgggtagtt 20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 15

cagagtcaa aagccctca 20

REIVINDICACIONES

1. Una primera biosonda inmovilizada sobre una superficie, comprendiendo la primera biosonda:

una secuencia de ANP capaz de hibridarse con un nucleótido diana;

al menos un grupo funcional cargado dispuesto en uno o ambos extremos o intermitentemente a lo largo de la secuencia de ANP de la primera biosonda, en la que el grupo funcional cargado comprende un aminoácido cargado; y

en la que la unión del grupo funcional cargado da como resultado una agregación menor de una pluralidad de biosondas inmovilizadas en la superficie, en comparación con las biosondas inmovilizadas que no comprenden un grupo funcional cargado.

2. La biosonda de la reivindicación 1, en la que los grupos funcionales cargados están dispuestos como se muestra a continuación:

Sonda nº	Secuencia	SEQ ID No.
2	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa	2
3	Cys-Gly-Xaa-Xaa-NB	3
4	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa	4
5	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa-Xaa	5
6	Cys-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-NB-Xaa-Xaa-Xaa	6
7	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-NB	7
8	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-NB-Xaa-NB	8
9	Cys-Gly-Xaa-NB-Xaa-Xaa-NB-Xaa	9
10	Cys-Gly-Xaa-Xaa-NB-Xaa-NB-Xaa-Xaa	10

en la que Xaa representa el grupo funcional de aminoácidos cargados y NB representa la secuencia de ANP.

3. La primera biosonda de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la superficie es un microelectrodo.

4. La primera biosonda de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un marcador redox.

5. La primera biosonda de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la primera biosonda es capaz de unirse a un informador redox cuando se hibrida con una secuencia de ácido nucleico.

6. Un método para detectar un biomarcador de interés en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con una primera biosonda inmovilizada en una superficie, en el que la primera biosonda comprende una secuencia de ANP capaz de hibridarse con el biomarcador de interés y al menos un grupo funcional cargado dispuesto en uno o ambos extremos o intermitentemente a lo largo de la secuencia de ANP de la primera biosonda, en la que el grupo funcional cargado comprende un aminoácido cargado, y en la que el grupo funcional cargado conduce a una menor agregación de una pluralidad de biosondas inmovilizadas en la superficie, en comparación con las biosondas inmovilizadas que no comprenden un grupo funcional cargado;

hibridar la primera biosonda al biomarcador; y

detectar la hibridación como indicativa de la presencia del biomarcador de interés en la muestra.

7. El método de la reivindicación 6, en el que la superficie es un microelectrodo.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la detección se realiza mediante la observación de una señal de informador, y en el que un cambio en la señal de informador en la hibridación de la primera biosonda con el biomarcador, en comparación con dicha señal de informador en ausencia de la hibridación de dicha biosonda, es indicativo de la presencia de dicho biomarcador en la muestra.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la señal de informador disminuye con la hibridación de la primera biosonda con el biomarcador.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la detección no implica el uso de reactivos de reticulación o enzimas antes de la hibridación.
- 5 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que el método comprende además añadir al menos una sonda de bloqueo para reducir o eliminar cualquier hibridación de los ANP de la primera biosonda a una secuencia no diana.
12. Un biosensor, que comprende:
- una placa de circuito impreso que tiene una pluralidad de electrodos; y
- 10 una primera biosonda de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 inmovilizada a uno de la pluralidad de electrodos, en el que dicho uno de la pluralidad de electrodos tiene al menos una segunda biosonda inmovilizada sobre el mismo.

FIG. 1A

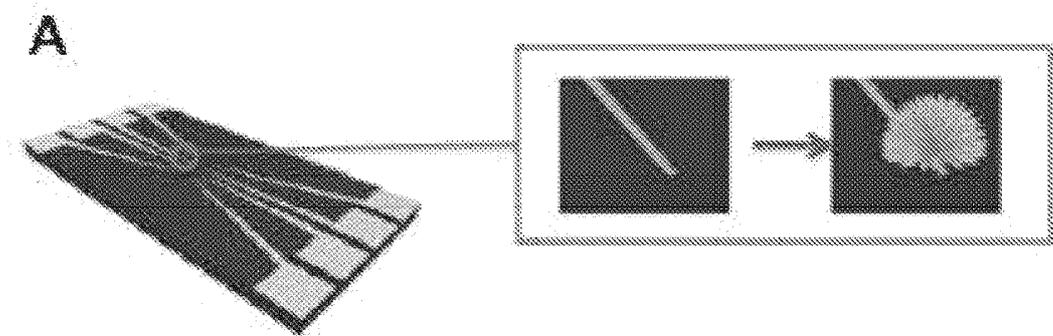


FIG. 1B

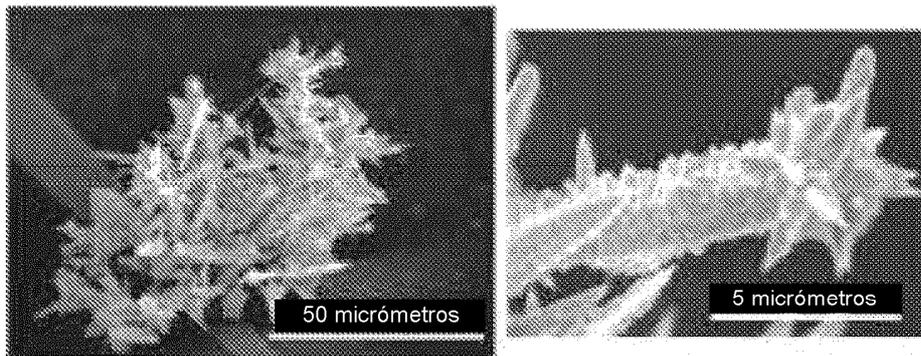


FIG. 1C

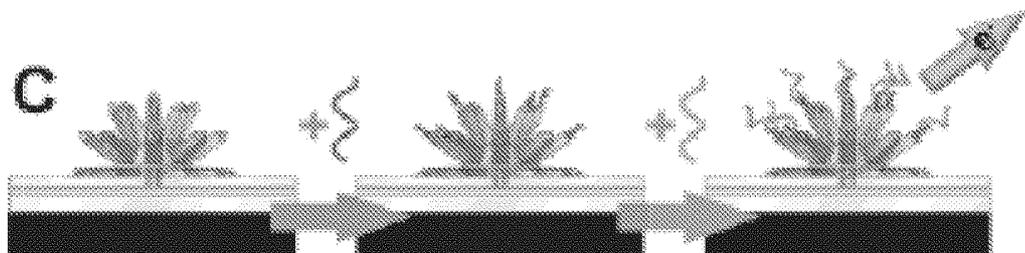


FIG. 1D

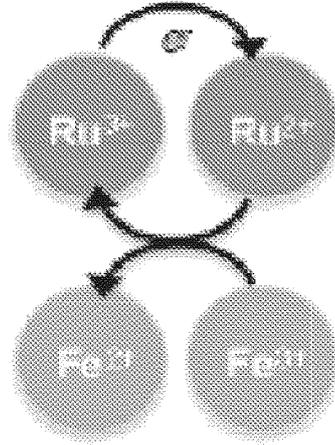


FIG. 1E

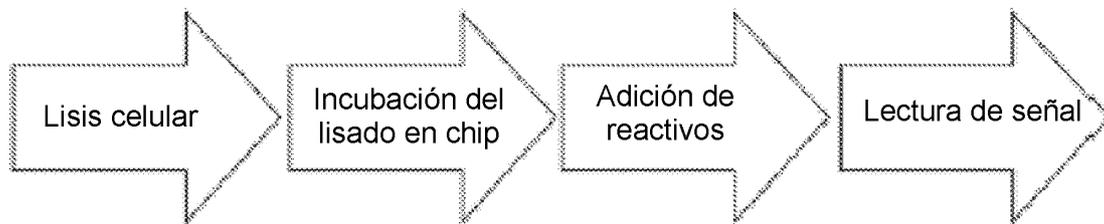


FIG. 2A

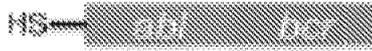
bcr | *abl*
CAGAGTTCAA | AAGCCCTTCA
 (SEQ ID NO: 15)

Figura 2B

Sonda de ADN



Sonda de ANP



Sonda de ANA

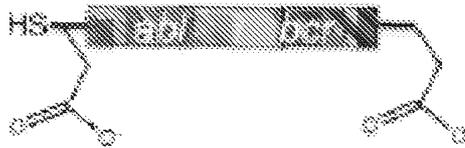


FIG. 2C

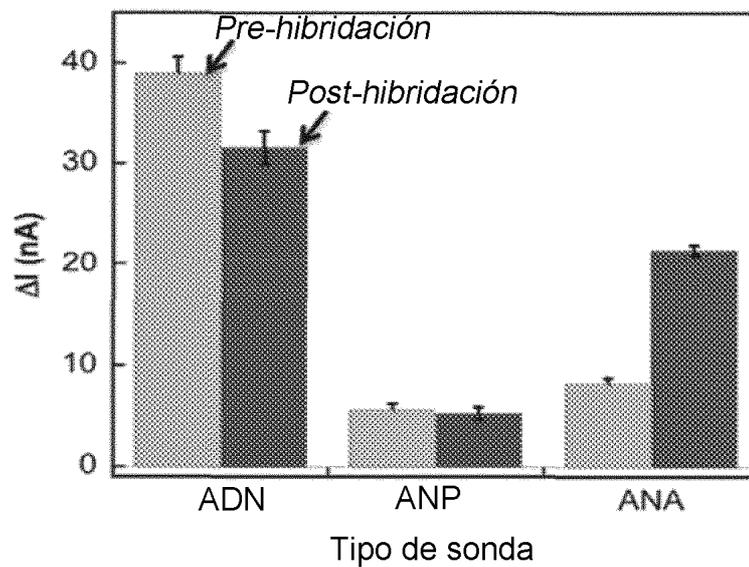


FIG. 2D

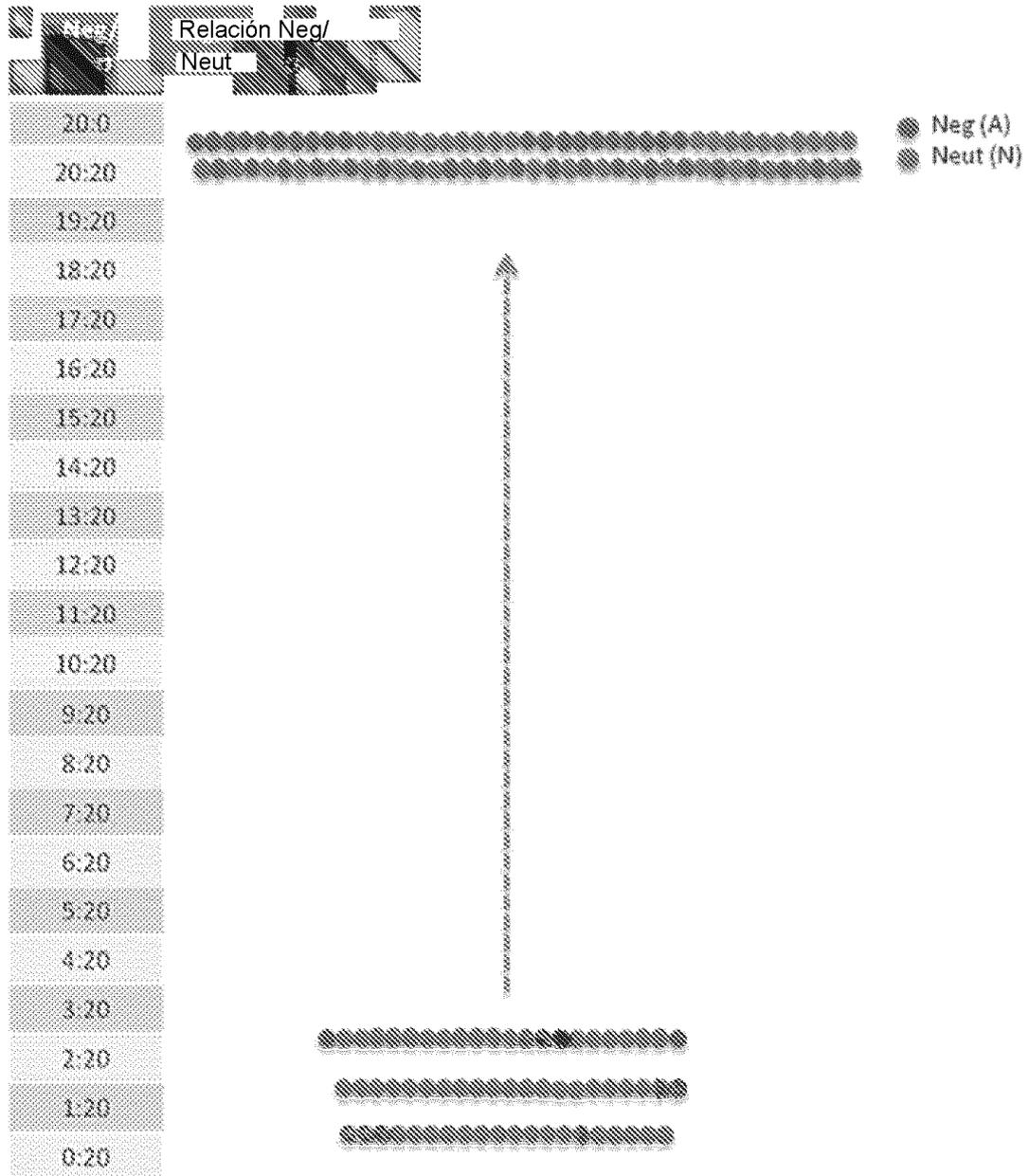


FIG. 3

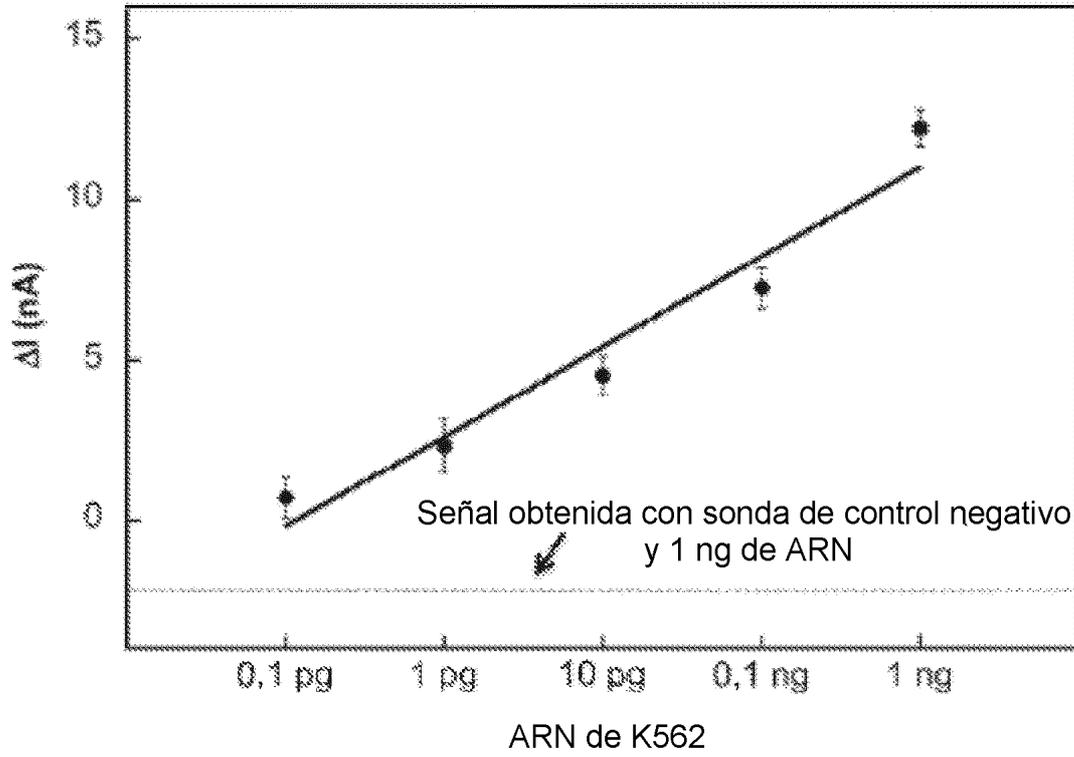


FIG. 4A-4E

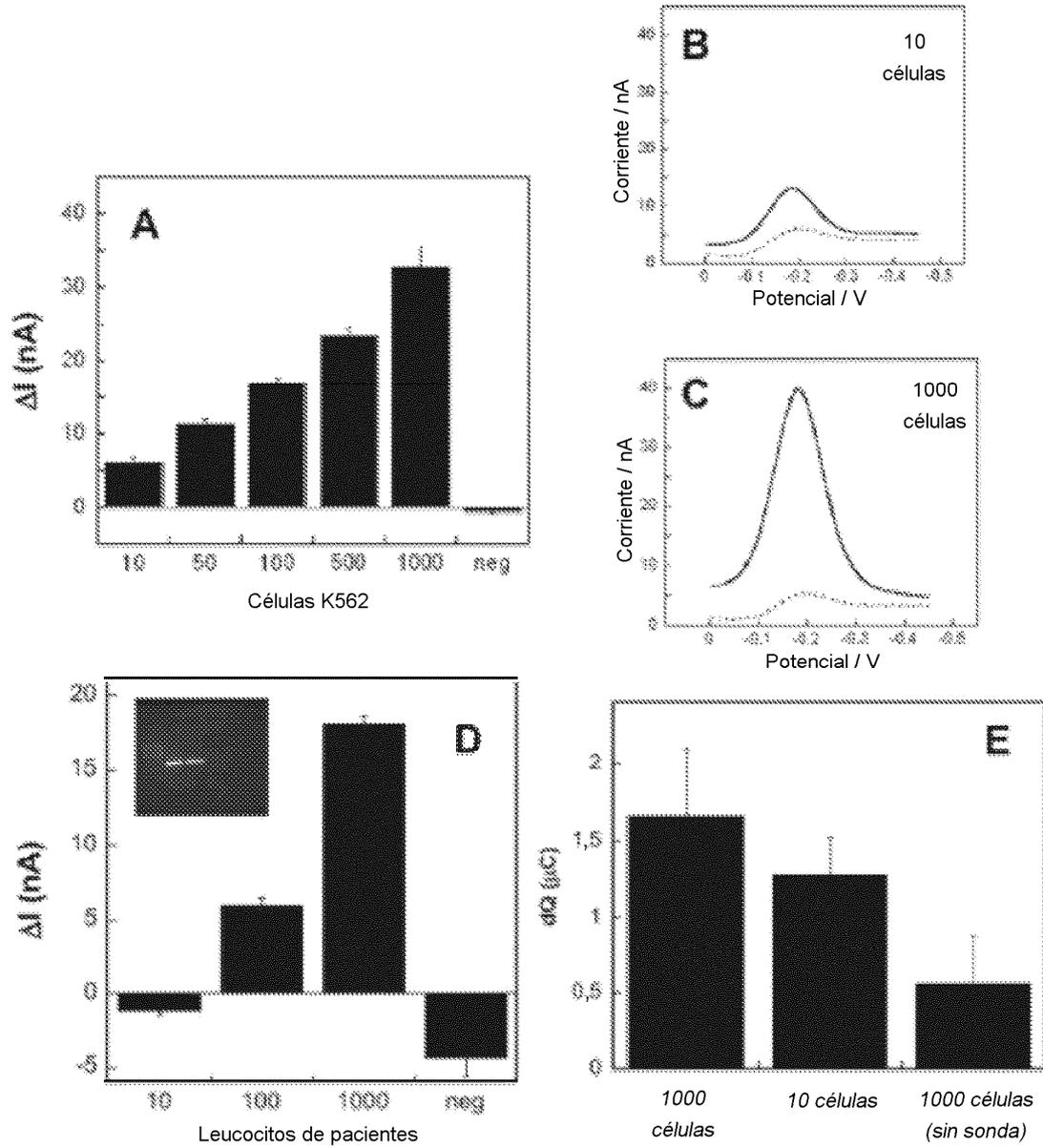


FIG. 5

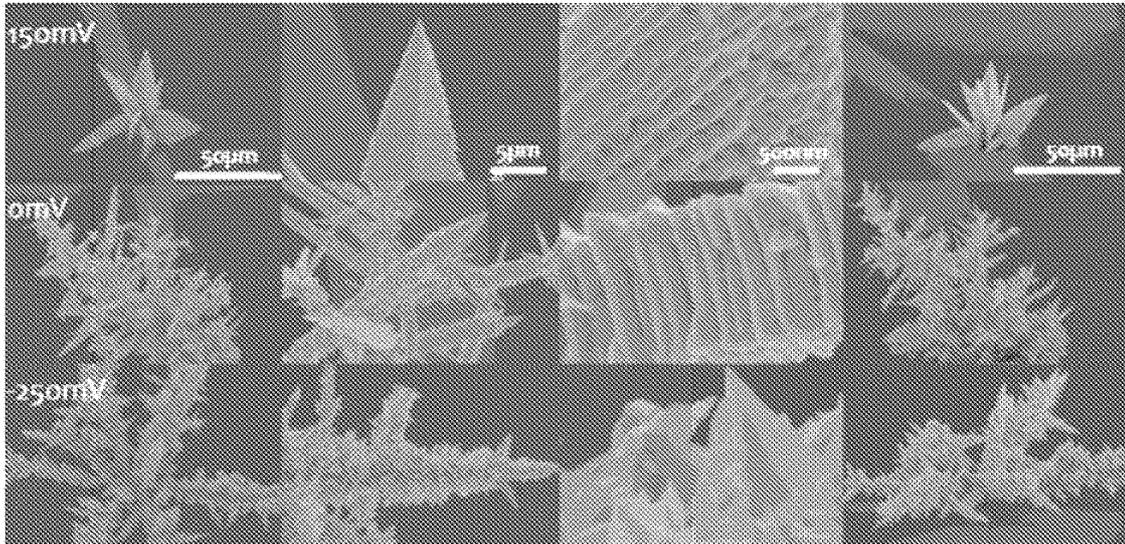


FIG. 6

