



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 307 430**

② Número de solicitud: 200701253

⑤ Int. Cl.:

G01N 27/02 (2006.01)

G01R 27/16 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **09.05.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2008**

Fecha de la concesión: **01.10.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **20.10.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
20.10.2009

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Bratov, Andrei;
Domínguez Horna, Carlos;
Abramova, Natalia;
Merlos Domingo, Ángel;
Ramón Azcón, Javier;
Sánchez Baeza, Francisco José y
Marco Colas, María Pilar**

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Biosensor y sus aplicaciones.**

㉓ Resumen:

Biosensor y sus aplicaciones.

La presente invención se refiere a un biosensor útil para la determinación directa de la presencia de analitos de una muestra que comprende:

i) al menos un sustrato (8) aislante o cubierto con al menos una capa aislante,

ii) al menos, un par de electrodos interdigitados ((9) y (10)) químicamente inertes y formados con un material altamente conductor eléctrico, dispuestos sobre el sustrato y separados, cada par de electrodos interdigitados, por iii) una barrera (11) de al menos un material aislante, cuya altura está comprendida entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, en el que se abren los puntos de soldadura (13 y 14), y

iv) moléculas receptoras (12) químicamente inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante o sobre la superficie de los electrodos interdigitados.

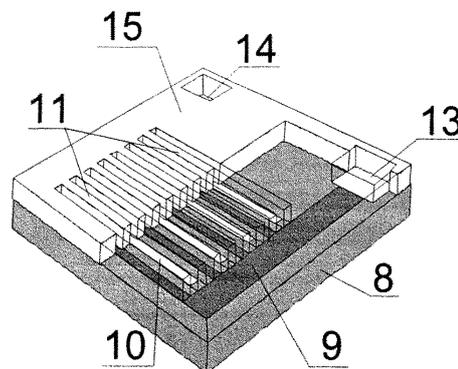


Fig. 4A

ES 2 307 430 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Biosensor y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de los biosensores aptos para la monitorización directa de reacciones bioquímicas que involucran moléculas receptoras químicamente unidas a la superficie del sensor, y, en particular, a la superficie de una barrera aislante que separa dos electrodos altamente conductivos.

10 **Estado de la técnica**

Es conocido que las medidas de impedancia se utilizan para registrar las reacciones bioquímicas que tienen lugar sobre la superficie de electrodos modificados químicamente, en el caso de reacciones inmunológicas (Bataillard, P. *et al.*, *Analytical Chemistry*, 1988, 60, 2374-2379; C. Berggren, B. Bjarnanson, G. Johansson, *Electroanalysis* 2001, 13, 173); así como para la medida directa de la hibridación del ADN (Patent WO2004065624; Li XH, Lee JS, Kraatz HB *Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches using an electrode microarray ANALYTICAL CHEMISTRY* 78 (17): 6096-6101 SEP 1 2006). Con el fin de aumentar la sensibilidad de las medidas y miniaturizar el elemento sensor, se desarrolló un transductor impedimétrico formado por dos electrodos planos con geometría interdigitada, denominados Matriz de Electrodos Interdigitados (P. Van Gerwen, *et al.*, *Sens. Actuat. B* 1998, 49, 73; W. Laureyn, *et al.*, *Sens. Actuat. B* 2000, 68, 360) (Interdigitated Electrode Array, IDEA). En la Figura 1 se representa una proyección ortogonal del transductor, que comprende un sustrato aislante (1), dos barras colectoras (2) y (3) que unen los electrodos digitados a los contactos de soldadura (4) y (5).

La idea central de la medida impedimétrica ha sido tratada en varias patentes con anterioridad (WO2004044570, EP 0543550, EP 0241771, GB 2,137,361). En esencia, en un sensor impedimétrico, como el representado en la Figura 2, se inmovilizan ciertas moléculas bien sobre la superficie del electrodo, entre cada par de electrodos interdigitados o bien sobre la superficie como entre el par de dígitos. Estas moléculas "reconocen" a un analito específico cuando se exponen en una solución de muestra. El proceso de reconocimiento generalmente termina en una variación de la conductividad y/o permitividad del medio que rodea a los electrodos interdigitados. Estas variaciones se registran como cambios del espectro de impedancia, medido en un amplio rango de frecuencias. Finalmente, midiendo la impedancia entre los dos electrodos se puede establecer la magnitud del proceso de reconocimiento mediante el ajuste de los parámetros de un circuito eléctrico equivalente, que es extraído a partir de la forma del espectro y viene esquematizado en la Figura 2.

El significado físico de los elementos que forman el circuito equivalente es el siguiente: R_C - resistencia de contacto de los hilos de conexión, contactos y barras colectoras; C_G - capacidad geométrica establecida entre dos electrodos y el medio en contacto (típicamente una solución acuosa); R_S - resistencia eléctrica de la solución acuosa entre dos electrodos; C_{DL} - capacidad de doble capa en la interfase electrodo/solución; R_{CT} - resistencia a la transferencia de carga debida a los procesos de Faraday sobre la superficie del electrodo; W - polarización adicional producida por la polarización en la concentración (impedancia de Warburg), rugosidad de la superficie de los electrodos y/o presencia de una capa adicional sobre la superficie de los electrodos.

El problema que presentan los sensores con moléculas inmovilizadas sobre los electrodos, tal y como se ha descrito anteriormente, es que para obtener una medida con una buena resolución y sensibilidad es necesario que la capa inmovilizada sobre los electrodos conductores (6, en Figura 2B) ha de ser perfectamente homogénea y continua, lo que es difícil de conseguir.

Los parámetros del sensor impedimétrico, descritos anteriormente, dependen de la geometría de los electrodos interdigitados; esto es, de la anchura de cada dígito y de la separación entre dígitos (parámetros a y b de la Figura 2A). La mayor parte de la señal se debe a una región sobre los electrodos cuya penetración en el medio es igual a la distancia entre los centros de dos electrodos interdigitados adyacentes, como se describe en la Figura 2A donde se muestran esquemáticamente las líneas de campo (7). La longitud típica de las biomoléculas está en el rango entre 10 - 100 nm, ello implica que para el caso en que las moléculas se inmovilicen en el espacio entre cada par de electrodos interdigitados se necesitan unos tamaños de dígitos y de separación entre ellos muy pequeños, difícilmente alcanzables con la tecnología microelectrónica convencional.

Debido a las dificultades expuestas, estos sensores, cuando se intentan utilizar en medidas directas, poseen una menor sensibilidad que otros métodos convencionales.

Como se describe en: WO2005026178, US2005176067, para aumentar la sensibilidad de las matrices de electrodos interdigitados se han utilizado métodos de análisis indirecto para inmuno-(Shi MH, Peng YY, Zhou J, *et al.* *Immunoassays based on microelectrodes arrayed on a silicon chip for high throughput screening of liver fibrosis markers in human serum BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 21 (12): 2210-2216 JUN 15 2006), AND (V. Dharuman, *et al.*, *Label-free impedance detection of oligonucleotide hybridisation on interdigitated ultramicroelectrodes using electrochemical redox probes, Biosensors & Bioelectronics* 21 (2005) pp. 645-654) o ARN (Elsholz B, Worl R, Blohm L, *et al.* *Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays ANALYTICAL CHEMISTRY* 78 (14): 4794-4802 JUL 15 2006), basados en la producción o registro de especies redox. Para aumentar la sensibilidad electroquímica de estos sensores, se ha propuesto el uso de electrodos interdigitados tridimensionales,

que contienen electrodos metálicos de 30 μm de espesor (Honda N, Inaba M, Katagiri T, *et al.* High efficiency electrochemical immuno sensors using 3D comb electrodes *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 20 (11): 2306-2309 MAY 15 2005).

5 Otra vía para mejorar la sensibilidad de la detección impedimétrica consiste en utilizar partículas metálicas o poliméricas unidas a la molécula que se va a detectar (Wang JB, Profitt JA, Pugia MJ, *et al.* Au nanoparticle conjugation for impedance and capacitance signal amplification in biosensors *ANALYTICAL CHEMISTRY* 78 (6): 1769-1773 MAR 15 2006), tal y como se describe en US-2002150886, WO-2005001479. La interacción entre las moléculas
10 marcadas y los receptores inmovilizados sobre el sensor lleva a que se produzca una mayor interferencia con el campo eléctrico y, como consecuencia, una mayor sensibilidad.

En la patente US6440662 se presenta un sensor IDEA tridimensional, formado a partir de canales parcialmente cubiertos con una lámina metálica y que, junto a una capa metálica superficial, conforman los electrodos del sensor. Esta geometría permite una redistribución del campo eléctrico analizado y un aumento de la sensibilidad del sensor.
15

La presente invención describe un sensor de alta sensibilidad en el que los electrodos altamente conductivos están separados por una barrera de un material aislante, útil para la determinación directa de la presencia de analitos de una muestra biológica de origen humano, veterinario o medioambiental.

20 Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un biosensor útil para la determinación directa de la presencia de analitos de una muestra, en adelante biosensor de la invención, que comprende (Figura 4):
25

i) al menos un sustrato (8) aislante o cubierto con al menos una capa aislante,

ii) al menos, un par de electrodos interdigitados ((9) y (10)) químicamente inertes y formados con un material altamente conductor eléctrico, dispuestos sobre el sustrato y separados, cada par de dígitos, por
30

iii) una barrera (11) de al menos un material aislante, cuya altura está comprendida entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, en el que se abren los puntos de soldadura (13 y 14), y
35

iv) moléculas receptoras (12) químicamente inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante o sobre la superficie de los electrodos.

Un objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que el sustrato aislante de i) es de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: un polímero, un vidrio o un óxido inorgánico.
40

Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que el sustrato de i) no es de material aislante pero que comprende una capa aislante o dieléctrica de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: dióxido de silicio o un polímero.
45

Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que los electrodos de ii) altamente conductores e inertes son de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: metales, preferentemente Pt, Pd y Au, óxidos, Si, silicio policristalino, siliciuro de tántalo o, incluso, polímeros conductores.
50

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que los electrodos poseen dígitos con una anchura y una separación entre ellos dentro del rango de 0.5 a 10.0 μm .
55

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que la barrera aislante de iii) es de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: óxidos inorgánicos, polímeros y materiales sensibles a la exposición con luz W.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que la barrera aislante de iii) presenta un espesor de la capa aislante, que define la altura de la barrera que separa dos dígitos adyacentes, que supone entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, o más preferentemente cercano al 100%.
60

Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención que comprende además un dispositivo o aparato de detección de las propiedades eléctricas conectado a los electrodos de ii) a los que aplica un voltaje AC, y que percibe la variación en el campo eléctrico próximo a la superficie de las barreras, y un dispositivo o aparato para aplicar dicho voltaje.
65

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del biosensor de la invención, en adelante uso del biosensor de la invención, en un procedimiento de identificación de analitos o moléculas que se encuentran en una muestra biológica.

Descripción detallada

5

Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un nuevo biosensor electroquímico y un método capaz de determinar la presencia o ausencia de estructuras moleculares o analitos en una muestra problema.

10

La presente invención se basa en que los inventores han observado que puede construirse un nuevo sensor electroquímico de alta sensibilidad cuyo principio de funcionamiento se basa en la interferencia que se produce entre un campo eléctrico generado entre dos electrodos y las estructuras moleculares que pueden formarse debido a la interacción de analitos de una muestra en solución con las moléculas receptoras o sensoras inmovilizadas sobre la superficie del sensor, y en el que los electrodos altamente conductivos están separados por una barrera de al menos un material aislante (ver Ejemplos 1 a 3).

15

Las reacciones bioquímicas que tienen lugar en dicha interacción molecular afectan la distribución de cargas fónicas y, por tanto, las propiedades eléctricas de las capas próximas a la superficie de la barrera. A los electrodos se les aplica un voltaje AC, a través de un dispositivo de detección al que están conectados, percibiendo los cambios de impedancia que se produzcan entre ellos. Debido a la presencia de la barrera aislante, la mayor parte de la corriente que fluye entre los electrodos pasa por una fina capa muy próxima a la superficie de la barrera, lo que permite aumentar la sensibilidad a los cambios de la impedancia derivados de los procesos bioquímicos.

20

Más concretamente, si se aplica una señal eléctrica, bien sea una diferencia de voltaje o una corriente, en los puntos de soldadura (13) y (14) del sensor de la invención (Figura 4A) aparece un campo eléctrico que da lugar a una serie de líneas de campo (7) (Figura 4B). Si las moléculas o analitos que se han de detectar se encuentran en la solución de la muestra, entonces se unirán a las moléculas receptoras o sensoras (12) produciendo una fuerte variación en el campo eléctrico próximo a la superficie de las barreras, variación que en la disposición de la Figura 2C es mucho menor. Esta variación puede ser cuantificada midiendo la impedancia a una frecuencia y/o una polarización de adecuadas (ver Ejemplos 2 y 3).

25

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un biosensor útil para la determinación directa de la presencia de analitos de una muestra, en adelante biosensor de la invención, que comprende (Figura 4):

30

i) al menos un sustrato (8) aislante o cubierto con una capa aislante,

35

ii) al menos, un par de electrodos interdigitados ((9) y (10)) químicamente inertes y formados con un material altamente conductor eléctrico, dispuestos sobre el sustrato y separados, cada par de dígitos, por

40

iii) una barrera (11) de al menos un material aislante, cuya altura está comprendida entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, en el que se abren los puntos de soldadura (13 y 14), y

45

iv) moléculas receptoras (12) químicamente inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante o sobre la superficie de los electrodos.

50

Se entiende por moléculas receptoras en la presente invención a aquellas moléculas funcionalmente definidas que son capaces de reaccionar o unirse con otras moléculas o analitos de una muestra para formar un complejo y/o inducir una reacción secundaria. Como ejemplo, las moléculas receptoras pueden ser enzimas, anticuerpos, antígenos, péptidos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN o oligonucleótidos.

55

Los analitos, o moléculas a determinar en una solución o en una muestra, pueden ser cualquier molécula presente en la muestra que se enlace o reaccione con las moléculas receptoras. Los analitos a determinar pueden ser, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, enzimas, anticuerpos, antígenos, péptidos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN, oligonucleótidos o, incluso, células completas de distinto tipo como eucariotas o procariotas.

60

La unión entre una molécula receptora y un analito tiene lugar, por ejemplo, en hibridaciones de monocadenas de ADN y/o ARN, reacciones antígeno/anticuerpo y enzima/sustrato, dentro de procedimientos de identificación de analitos problemas dentro de una muestra, preferentemente biológica, de origen clínico o veterinario, alimentario o medioambiental, entre otros.

65

El sustrato de i), denominado capa base, puede ser de distintos tipos de materiales, por ejemplo, una oblea cristalina (cuarzo, silicio, zafiro), un material amorfo (vidrio), un polímero (PMMA, PC, PEEK, PVE, PEI) o una capa gruesa de material cerámico, como Al_2O_3 . En caso de que el sustrato no sea aislante, se deberá formar sobre la superficie del mismo una capa dieléctrica aislante. Esta capa aislante puede ser una capa polimérica, tal como una poliimida o un BCB, o un material inorgánico, por ejemplo Si_3N_4 depositado por técnicas de LPCVD o PECVD, o una capa de SiO_2 depositada o crecida térmicamente sobre una oblea de silicio.

ES 2 307 430 B1

Un objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que el sustrato aislante de i) es de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: un polímero, un vidrio o un óxido inorgánico.

- 5 Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que el sustrato de i) no es de material aislante pero que comprende una capa aislante o dieléctrica de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: dióxido de silicio o un polímero.

10 Los electrodos interdigitados de ii) están formados por una capa de un material buen conductor eléctrico, depositada sobre la capa dieléctrica, preferentemente utilizando técnicas de evaporación. La geometría de los electrodos interdigitados se define mediante técnicas litográficas, seguidas de procesos de grabado directo o por lift-off. La anchura y separación entre cada par de electrodos interdigitados (parámetros a y b en la Figura 1A) deben tener tamaños preferiblemente en el rango micrométrico; sin embargo, también pueden estar en el rango sub-micrométrico. Cualquier material que sea un buen conductor eléctrico y no reaccione con la solución puede ser utilizado para formar los
15 electrodos interdigitados. A título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, se pueden utilizar: Pt, Pd, Au o materiales como Si, silicio policristalino, siliciuro de tántalo o, incluso, polímeros conductores, siempre y cuando no tengan lugar reacciones que alteren la integridad de los electrodos. El espesor de la capa conductora puede ser muy amplio, pero para la aplicación como sensor bioquímico se recomienda un espesor de alrededor 150 nm. La deposición de la capa puede conseguirse mediante evaporación térmica, pulverización catódica, cañón de electrones o cualquier
20 técnica conocida que permita la obtención de capas de materiales eléctricamente conductores, y está al alcance de un experto en la materia.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención en el que los electrodos interdigitados de ii) altamente conductores e inertes son de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el
25 alcance de la invención, al siguiente grupo: metales, preferentemente Pt, Pd y Au, óxidos, Si, silicio policristalino, siliciuro de tántalo o, incluso, polímeros conductores.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que los electrodos poseen dígitos con una anchura y una separación entre ellos dentro del rango de 0.5 a 10.0 μm .

30 Para obtener una conexión fiable entre un sensor según la invención, como un sensor impedimétrico, y el circuito de medida externo, por ejemplo un medidor de impedancias, es necesario realizar unos puntos de soldadura (13) y (14), continuando con el proceso de fabricación tal como se comenta a continuación. Sobre la superficie del sensor de deposita una capa metálica cuyo patrón estructural es definido, seguidamente, utilizando máscaras de contraste y procesos fotolitográficos y de grabado convencionales. El metal del punto de soldadura puede ser cualquier metal que
35 garantice una buena soldadura con hilo y una baja resistencia de contacto con el material subyacente, que conforma los electrodos conductores. Este metal, a título de ejemplo, puede ser aluminio.

Las barreras dieléctricas entre cada par de electrodos adyacentes de la estructura interdigitada se crean mediante
40 deposición de una capa de material aislante (15) que se elimina de encima de los electrodos interdigitados (denominados también "dígitos") metálicos y de los puntos de soldadura mediante el uso de procesos de fotolitografía de W y grabado, principalmente grabado fónico reactivo profundo (Deep Reactive Ion Etching, DRIE). El espesor de la capa aislante, que define la altura de la barrera que separa dos dígitos adyacentes, se supone igual al 100% de la distancia que separa los centros de dicho par de electrodos interdigitados contiguos. Asimismo, son posibles barreras con alturas que varían entre el 50% y el 150% de la distancia intercentros de dos dígitos consecutivos, o con espesores por encima o por debajo de este rango. Salvo en las barras colectoras (2, en la Figura 1), donde es imprescindible evitar el contacto de las mismas con la solución a analizar; dentro del alcance de esta invención, no es crítico el mantener la capa aislante en otras partes de la superficie del sensor. El material dieléctrico utilizado para la formación de las barreras puede ser cualquier tipo de material aislante, aunque por razones tecnológicas sea preferible utilizar como tal
45 el dióxido de silicio obtenido por LPCVD, ya que puede ser eliminado fácilmente. No es tampoco crítica la forma de las barreras obtenidas tras el proceso de grabado, pudiendo ser éstas rectangulares, con paredes inclinadas o verticales, y planas o redondeadas en la parte superior.

Además, del descrito y de acuerdo al estado de la técnica, otros métodos pueden ser utilizados dentro del alcance
55 de la presente invención para obtener las barreras que separan los diferentes electrodos interdigitados por un experto en la materia. Así, se podrían utilizar materiales sensibles a la exposición con luz UV para definir las barreras; también se pueden utilizar técnicas de micromoldeado, como MicroMoldeado en capilares, Moldeado por Replica, MicroMoldeado asistido por solventes, etc.

60 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que la barrera aislante de iii) es de un material perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: óxidos inorgánicos, polímeros y materiales sensibles a la exposición con luz UV.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que la barrera aislante de iii) presenta un espesor de la capa aislante, que define la altura de la barrera que separa dos dígitos adyacentes, que supone entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, o más preferentemente cercano al 100%.

ES 2 307 430 B1

Las moléculas receptoras de iv) (12, Figura 4) pueden ser inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante conforme a los métodos de inmovilización de moléculas conocidos por el estado de la técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: unión por epóxido, carbo-di-imida, afinación reductora, bromuro de cianógeno, sucinimida, carbo-di-imidazol, cloruro de tresilo y tosilo, cloruro de di-vinilo, maleimida, hidracida, iso(tio)cianatos y, preferentemente, por silanización con amino silanos, silanos de epóxido, silanos de tio-cianato e iso-tio-cianato, silanos de anhídrido succínico, silanos de sulhidrilo y silanos de caprolactama.

Las moléculas receptoras consisten en moléculas biológicas que son capaces de unirse a su correspondiente analito presente en la muestra biológica a analizar. Otra forma alternativa del sensor de la invención es aquella en la que las moléculas receptoras de iv) están inmovilizadas en la superficie de los electrodos.

El proceso tecnológico descrito permite, mediante el uso de la tecnología microelectrónica convencional, una elevada miniaturización de los sensores y, también, la construcción de matrices de estos sensores integrados sobre un mismo sustrato. Las matrices de sensores integrados fabricadas siguiendo la metodología descrita, permiten obtener dispositivos para micro-diagnóstico. Estos dispositivos integrados son capaces de realizar la detección simultánea de multitud de parámetros, esto es análisis multi-paramétrico. Ello reviste particular importancia en situaciones donde la muestra es escasa y cuando se quieren realizar ensayos múltiples (screening assays).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el biosensor de la invención en el que los electrodos están organizados según una matriz interdigitada.

La variación del campo eléctrico que tiene lugar entre los electrodos interdigitados del biosensor al producirse la unión entre la molécula receptora y el analito puede ser cuantificada midiendo la impedancia a una frecuencia y/o una polarización dc adecuadas. El análisis de impedancia es la medida eléctrica preferida, ya que este análisis puede devenir en la medida de la resistencia, capacidad, pérdida dieléctrica y/o reactancia, sobre un rango de frecuencias, incluyendo o no la polarización dc, o una combinación de ambas técnicas.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el biosensor de la invención que comprende además un dispositivo o aparato de detección de las propiedades eléctricas conectado a los electrodos interdigitados de ii) a los que aplica un voltaje AC, y que percibe la variación en el campo eléctrico próximo a la superficie de las barreras, y un dispositivo o aparato para aplicar dicho voltaje.

Otra realización particular lo constituye el biosensor de la invención en el que el dispositivo de detección es un impedímetro que mide la impedancia entre los electrodos interdigitados del sensor.

Otra realización particular lo constituye el biosensor de la invención que comprende varias biomoléculas sensoras, ya sea, porque son de distinto tipo de biomolécula, por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, una sonda o un oligonucleótido), antígenos, anticuerpos, enzimas, proteínas o péptidos, o porque siendo del mismo tipo de molécula se dirige a una o más distintas moléculas diana.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del biosensor de la invención, en adelante uso del biosensor de la invención, en un procedimiento de identificación de analitos o moléculas que se encuentran en una muestra biológica.

Como se ha comentado anteriormente los analitos a determinar pueden ser, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, enzimas, anticuerpos, antígenos, péptidos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN, oligonucleótidos o, incluso, células completas de distinto tipo como eucariotas o procariotas y pueden ser de interés su identificación por ejemplo en campo del diagnóstico de enfermedades humanas o veterinarias, análisis medioambientales, análisis forenses, etc. porque comprende distintas biomoléculas sensoras.

El biosensor de la invención puede comprender distintas biomoléculas sensoras. Dichas biomoléculas distintas pueden ser de distinta naturaleza dentro de un tipo de biomolécula, tal como un ácido nucleico o una molécula proteica. Es decir, cada una de dichas distintas biomoléculas sensoras puede estar seleccionada entre uno o más ácidos nucleicos y una o más moléculas proteicas.

Es decir, que además, dichas moléculas biosensoras pueden ser distintas dentro de la misma categoría: según una realización, un biosensor puede contener un único tipo de ácido nucleico; según una realización adicional, un biosensor puede contener un único tipo de molécula proteica; según una realización adicional, un biosensor puede contener distintos tipos de ácidos nucleicos; según una realización adicional, un biosensor puede contener distintos tipos de moléculas proteicas; según una realización adicional, un biosensor puede contener uno o más tipos de ácidos nucleicos y uno o más tipos de moléculas proteicas.

Dichas moléculas proteicas pueden estar seleccionadas entre antígeno, anticuerpo, péptido, proteína y combinaciones de ellos.

65 Descripción de las figuras

Figura 1.- *Transductor impedimétrico tradicional con dos electrodos interdigitados coplanares, denominado Matriz de Electrodos Interdigitados (Interdigitated Electrode Array, IDEA)*. Este transductor está constituido por un

sustrato aislante (1), dos barras colectoras (2) y (3) que unen los electrodos interdigitados, “dígitos” (2’ y 3’) y los puntos de soldadura (4) y (5).

Figura 2.- *Sección transversal del transductor esquematizado en la Figura 1.* (A) Se muestran los electrodos interdigitados (2’) y (3’), con una anchura igual a “b” y una distancia entre electrodos igual a “a”, y las líneas de campo eléctrico (7). La mayor densidad de campo eléctrico está encerrada en una región dentro de una distancia igual a la distancia entre centros de dos electrodos (a+b) adyacentes dispuestos sobre la superficie del dispositivo. (B) Ejemplo mostrando moléculas receptoras (6) inmovilizadas sobre los electrodos interdigitados. (C) Ejemplo mostrando moléculas (6) inmovilizadas entre los electrodos interdigitados.

Figura 3.- *Circuito eléctrico equivalente de una matriz de electrodos interdigitados.* El significado físico de los elementos que forman el circuito equivalente es el siguiente: R_C - resistencia de contacto de los hilos de conexión, contactos y barras colectoras; C_G - capacidad geométrica establecida entre dos electrodos y el medio en contacto (típicamente una solución acuosa); R_S - resistencia eléctrica de la solución acuosa entre dos electrodos; C_{DL} - capacidad de doble capa en la interfase electrodo/solución; R_{CT} - resistencia a la transferencia de carga debida a los procesos de Faraday sobre la superficie del electrodo; W - polarización adicional producida por la polarización en la concentración (impedancia de Warburg), rugosidad de la superficie de los electrodos y/o presencia de una capa adicional sobre la superficie de los electrodos.

Figura 4.- *Esquema de un sensor impedimétrico según la invención.* (A) Según esta realización particular, el sensor impedimétrico comprende: un sustrato (8) recubierto por una capa aislante sobre la que se encuentran los pares de electrodos interdigitados (9) y (10), hechos de un material muy buen conductor eléctrico, y separados por una barrera dieléctrica (11), cuya altura es igual a la distancia entre los centros de dos electrodos interdigitados. El material que forma las barreras entre electrodos interdigitados es un buen aislante (15) en el que se abren los puntos de soldadura (13 y 14). (B) Vista transversal del dispositivo presentado en la Figura 4A, donde se muestran el sustrato (8), los electrodos (9 y 10), la barrera que los separa (11) y las líneas de campo eléctrico (7). (C) Vista en sección del dispositivo mostrado en la Figura 4A que incluye la capa de moléculas receptoras (12) inmovilizadas sobre la superficie de las barreras.

Figura 5.- *Curva de calibración para el inmunoensayo ELISA (línea discontinua) y el inmunosensor de la invención (línea continua roja) frente a la solución de sulfapiridina.*

Figura 6.- *Parámetros R_S y R_{CT} obtenidos del circuito equivalente mostrado en la Figura 3, mediante ajuste del espectro de impedancias medido en diferentes momentos del experimento.*

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Fabricación de un sensor impedimétrico según la invención

El material de partida para esta realización particular de la invención fue una oblea de silicio. Dado que sólo va a utilizarse como sustrato, no importan ni el tipo y la dosis del dopaje, ni el valor de conductividad, ni la orientación cristalina. La oblea de silicio fue oxidada térmicamente, a 950°C en un proceso de oxidación húmeda, formándose una capa de 2500 nm de dióxido de silicio de buena calidad dieléctrica. El siguiente paso consistió en depositar una capa de siliciuro de tántalo, altamente conductora, de 230 nm de espesor mediante pulverización catódica por magnetrón.

El primer nivel fotolitográfico definió las barras colectoras y los dígitos de los dos electrodos. La definición de los motivos se realizó con la técnica de grabado iónico reactivo. Como resultado se obtuvo una matriz de 216 electrodos interdigitados, cada uno con 3.0 μm de anchura y otros 3.0 μm de distancia entre electrodos interdigitados adyacentes. La apertura entre los electrodos fue de 1.4 μm , y su longitud total fue de 301.0 μm para cada electrodo.

Los puntos de soldadura se formaron depositando una capa de 1.0 μm de aluminio, y se dispusieron, mediante el uso de técnicas convencionales de fotolitografía y grabado, en los extremos de las barras colectoras.

El último paso fue la obtención de las barreras aislantes. Para ello, se recubrió la superficie de la oblea con una capa de, en este caso, 4.0 μm de óxido de silicio depositado por LPCVD. De nuevo se utilizó la fotolitografía y el grabado para generar el patrón que permitió dejar el material entre los dígitos y recubrir las barras colectoras, excepto en los puntos de soldadura. La eliminación de esta capa se realizó con la técnica de grabado fónico reactivo profundo (DRIE), que proporciona barreras con paredes casi verticales. La altura de la barrera fue en este caso particular casi un 67% de la distancia entre dos dígitos adyacentes.

Una vez la oblea estaba cortada, los dispositivos individuales se pegaron a un sustrato de PCB y se soldaron los hilos para el conexionado eléctrico con un impedímetro.

Ejemplo 2

Uso del sensor de la invención como inmunosensor

5 Antes de proceder a la funcionalización, los electrodos se limpiaron en una solución al 70% de etanol absoluto y 30% de agua Milli-Q. Después, los dispositivos se sumergieron 10 minutos en una solución de NaOH al 2.5% en agua Milli-Q, seguido de un enjuague en 100 mL de agua Milli-Q, con objeto de neutralizar la acción del NaOH. Finalmente, los electrodos se lavaron en etanol y se secaron en corriente de nitrógeno.

10 Los electrodos se introdujeron durante tres horas en una solución de GPTS (3-Glicidoxipropil-trimetoxisilano) al 2.5% en etanol anhidro, a temperatura ambiente y con agitación orbital. Transcurrido este tiempo los dispositivos se lavaron en etanol y se secaron en corriente de nitrógeno.

15 La inmovilización covalente del antígeno sobre los dígitos de los electrodos se llevó a cabo utilizando una solución de antígeno 2d-BSA (0.8 $\mu\text{g/ml}$, 300 μL) en tampón de carbonato (pH = 9.6). La reacción se mantuvo durante 24 horas a 25°C y con agitación orbital. El exceso de líquido se eliminó lavando los dispositivos con un tampón de PBST (cuatro veces, 1000 μL /electrodo) y secándolos en corriente de nitrógeno seco.

20 Se diseñaron y produjeron receptores moleculares biológicos (anticuerpos) para el análisis de antibióticos de la familia de las sulfamidas. La preparación de los receptores biológicos se abordó mediante el diseño de haptenos de inmunización empleando estrategias de modelización molecular. Como consecuencia de estos estudios se propuso la síntesis de 2 haptenos o antígenos. Uno de ellos (hapteno 1) mantenía la mayor parte de la estructura de las sulfamidas, mientras que el segundo (hapteno 2) era tan solo un fragmento que conservaba la parte común a la mayoría de los compuestos de esta familia de antibióticos. Los dos haptenos se conjugaron a la proteína HCH (horseshoe crab hemocyanin) y a la BSA (bovine serum albumin) empleando métodos descritos en la literatura. La unión covalente de los haptenos o antígenos y la cuantificación del número de restos de antígenos unidos a la proteína se realizó mediante espectrometría de masas. A continuación, se procedió a inmunizar conejos de la variedad New Zealand con estos antígenos aplicando un protocolo de inmunización de seis meses de duración, durante el cual se fue controlando la evolución respuesta inmunitaria mediante la extracción de pequeñas muestras de sangre.

30 Con el fin de evaluar la avidez de los antisueros obtenidos por los antibióticos de tipo sulfonamida, fue necesario establecer un ensayo inmunoquímico de tipo competitivo. Para ello, se propuso la preparación de 8 haptenos de competición (SA 3-10). Estos son estructuras químicas similares a los haptenos o antígenos empleados para producir los anticuerpos, pero con algunas modificaciones estructurales o con el brazo espaciador situado en un punto diferente de la molécula. Inicialmente, estos haptenos se han utilizado para la preparación de trazadores enzimáticos con el enzima HRP (horseradish peroxidase). Estudios preliminares con estos trazadores en formato de ELISA directo indicaron que algunos antibióticos como la sulfapirazina podrían ser reconocidos con una IC₅₀ cercana a 9 $\mu\text{g L}^{-1}$.

40 Soluciones patrón de sulfapiridina preparadas en PEST (0.64 nM - 50000 nM, en PBST) se añadieron a los electrodos interdigitados (150 μL /electrodo), seguido de una solución con el antisuero (#155) específico de sulfamidas obtenido (1/2000 en PEST, 150 μL /electrodo). Tras incubarse durante 30 minutos, a temperatura ambiente, los dispositivos se lavaron con PBST (tres veces, 1000 μL /electrodo), y una vez con agua Milli-Q (1000 μL /electrodo). La reacción fue medida en una solución con baja conductividad. Las curvas de calibración se ajustaron a una ecuación con cuatro parámetros, según la fórmula: $Y = \{ (A-B) / [1 + (x/C)^D] \} + B$, donde A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce una absorbancia igual al 50% de la máxima y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea.

TABLA 1

Características de la calibración con sulfapiridina^a

Ensayo	[Ab]	[AT, $\mu\text{g/ml}$]	Max.	Min	Max/min	IC ₅₀ nM	Pendiente	R ²
Sensor	1/2000	0.8	19488	1038	18.8	14.01	-0.82	0.99
ELISA	1/8000	0.625	0.79	0.06	13.2	9.29	-0.82	0.99

^a Estos valores se obtuvieron de la ecuación, con cuatro parámetros, utilizada para ajustar la curva de calibración.

65 Los datos que se muestran en la Tabla 1 representan los parámetros característicos del ensayo inmunoenzimático ELISA y del inmunosensor impedimétrico. La IC₅₀ indicó la sensibilidad, cuando más pequeño es el valor más sensible es el ensayo. Al comparar los valores de la IC₅₀ del inmunosensor y del ELISA se pudo comprobar que

ES 2 307 430 B1

son del mismo orden de magnitud, por lo tanto el inmunosensor de la invención se comportó de una forma similar al ensayo ELISA en lo que se refiere a sensibilidad. Otro parámetro importante fue la relación entre la señal máxima y la mínima, cuando más elevado es el valor mejor respuesta tiene el dispositivo de la invención. Al volver a comparar el inmunosensor de la invención con el ensayo ELISA se pudo comprobar que había una mejor repuesta del inmunosensor respecto al ELISA. Finalmente, como dato importante se presenta la R2 que indica el grado de ajuste de los datos experimentales a la curva sigmoideal expuesta anteriormente, que resultaron ser idénticas.

Ejemplo 3

Uso del sensor de la invención como biosensor de ADN

Antes de proceder a la funcionalización, los electrodos se limpiaron en una solución al 70W de etanol absoluto y 30% de agua Milli-Q. Después, para proceder a la funcionalización los dispositivos se sumergieron 10 minutos en una solución de NaOH al 2.5% en agua Milli-Q, seguido de un enjuague en 100 mL de agua Milli-Q, con objeto de neutralizar la acción del NaOH. Finalmente, los electrodos se lavaron en etanol y se secaron en corriente de nitrógeno.

Los electrodos se introdujeron durante tres horas en una solución de GPTS (3-Glicidoxipropil-trimetoxisilano) al 2.5% en etanol anhidro, a temperatura ambiente y con agitación orbital. Transcurrido este tiempo los dispositivos se lavaron en etanol y se secaron en corriente de nitrógeno.

A la superficie de los electrodos se inmovilizó un oligonucleótido monocadena de 20 pares de bases, con grupos amino en la posición 5'. Los dispositivos fueron sumergidos en una solución conteniendo un oligonucleótido de 20 pares de bases (10 µg/ml, 300 µL) en un tampón de carbonato (pH = 9.6). Transcurridas 24 horas de reacción, los electrodos se lavaron con un tampón de PBST (cuatro veces, 1000 pL/electrodo) y se secaron en una corriente de nitrógeno seco. Los oligos fueron 20 abajo: 5'-aminohexyl-CGA GTC ATT GAG TCA TCG AG-3'; y 20 arriba: 5'-fluoresceinahexyl-CTC GAT GAC TCA ATG ACT CG-3'.

La hibridación del oligonucleótido se realizó, en una solución tampón, con el oligonucleótido complementario de 20 pares de bases, marcado con fluoresceína en la posición 5'. Los electrodos se introdujeron en una solución conteniendo el oligonucleótido complementario (10 µg/ml, 300 µL) y se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, los dispositivos se lavaron con un tampón de PBST (1000 µL/electrodo) y se secaron en corriente de nitrógeno seco. La determinación del proceso de hibridación se midió en una solución de baja conductividad.

TABLA 2

Parámetros de los oligonucleótidos

Oligo	20 inicial	20 complementario
Longitud	20	20
GC (contenido, %)	50	50
Tm (50 mNa, °C)	52.6	52.6
Peso Molecular	6157	6157
Coefficiente de Ext.	198800	188400
mmol/OD 260	5.03	5.31
µg/ml	30.97	32.26

ES 2 307 430 B1

TABLA 3

Valores obtenidos para los elementos del circuito equivalente de la Figura 3, ajustados mediante el programa comercial: Zplot/Zview (Scibner Associates Inc.)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Dispositivo	Rs	Rct
Libre	118000	3541
Funcionalizado	29645	2645
Con Oligonucleótido	50538	1889
Hibridado	43528	10014

En esta tabla 3 se muestran los valores de dos parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales de medida de impedancia mediante el programa comercial: Zplot/Zview (Scribner Associates Inc). Como se puede observar en los valores representados, Rs y Rct, existió un cambio significativo entre el dispositivo sensor de la invención con la cadena inicial de oligonucleótido inmovilizada sobre la superficie y el mismo dispositivo con la cadena de oligonucleótido hibridada con su complementario. Esta diferencia observada indico que el sensor de la invención puede ser utilizado para distinguir la hibridación de cadenas de oligonucleótidos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biosensor útil para la determinación directa de la presencia de analitos de una muestra **caracterizado** porque comprende:
- i) al menos un sustrato (8) aislante o cubierto con al menos una capa aislante,
 - 10 ii) al menos, un par de electrodos interdigitados ((9) y (10)) químicamente inertes y formados con un material altamente conductor eléctrico, dispuestos sobre el sustrato y separados, cada par de electrodos interdigitados, por
 - 15 iii) una barrera (11) de al menos un material aislante, cuya altura está comprendida entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, en el que se abren los puntos de soldadura (13 y 14), y
 - iv) moléculas receptoras (12) químicamente inmovilizadas en la superficie de la barrera aislante o sobre la superficie de los electrodos interdigitados.
- 20 2. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la molécula receptora pertenece al siguiente grupo: enzimas, anticuerpos, antígenos, péptidos, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN u oligonucleótidos.
3. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el sustrato de i) es de un material perteneciente, al siguiente grupo: un polímero, un vidrio o un óxido inorgánico.
- 25 4. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el sustrato de i) no es de material aislante pero comprende al menos una capa aislante o dieléctrica de un material seleccionado entre dióxido de silicio o un polímero.
- 30 5. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los electrodos interdigitados de ii) altamente conductores e inertes son de un material perteneciente al siguiente grupo: metales, preferentemente Pt, Pd y Au, óxidos, Si, silicio policristalino, siliciuro de tántalo y polímeros conductores.
6. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los electrodos poseen dígitos con una anchura y una separación entre ellos dentro del rango de 0.5 a 10.0 μm .
- 35 7. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la barrera aislante de iii) es de un material perteneciente al siguiente grupo: óxidos inorgánicos, polímeros y materiales sensibles a la exposición con luz UV.
- 40 8. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la barrera aislante de iii) presenta un espesor de la capa aislante, que define la altura de la barrera que separa dos electrodos interdigitados adyacentes, que supone entre el 50% y el 150% de la distancia que separa los centros de un par de electrodos interdigitados consecutivos, o más preferentemente cercano al 100%.
- 45 9. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las moléculas receptoras de iv) están inmovilizadas en la superficie de los electrodos.
10. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque los electrodos están organizados según una matriz interdigitada.
- 50 11. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende además un dispositivo o aparato de detección de las propiedades eléctricas conectado a los electrodos interdigitados de ii) a los que aplica un voltaje AC, y que percibe la variación en el campo eléctrico próximo a la superficie de las barreras, y un dispositivo o aparato para aplicar dicho voltaje.
- 55 12. Biosensor según la reivindicación 11 **caracterizado** porque el dispositivo de detección es un impedímetro que mide la impedancia entre los electrodos del sensor.
13. Biosensor según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende distintas biomoléculas sensoras.
- 60 14. Biosensor según la reivindicación 13, **caracterizado** porque cada una de dichas distintas biomoléculas sensoras está seleccionada entre uno o más ácidos nucleicos y una o más moléculas proteicas.
15. Biosensor según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha molécula proteica está seleccionada entre antígeno, anticuerpo, péptido, proteína y combinaciones de ellos.
- 65 16. Uso del biosensor definido en una de las reivindicaciones 1 a la 15 en un procedimiento de identificación de analitos o moléculas que se encuentran en una muestra biológica.

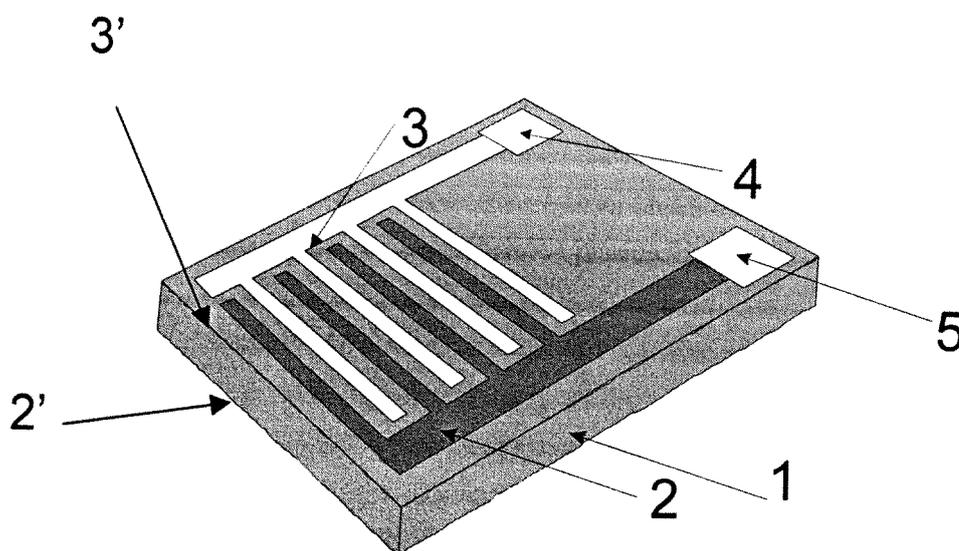


Figura 1

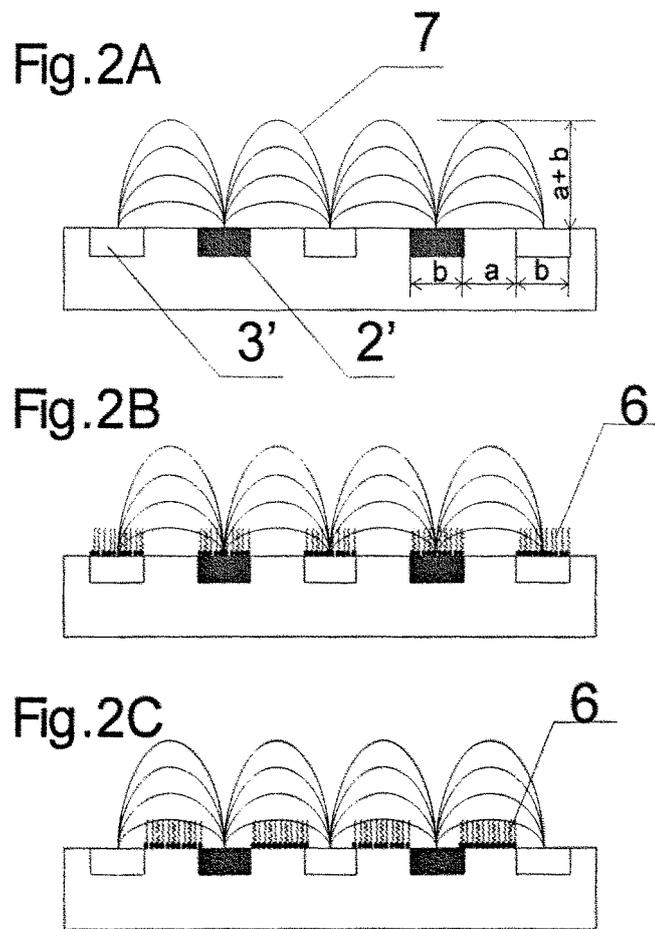


Figura 2

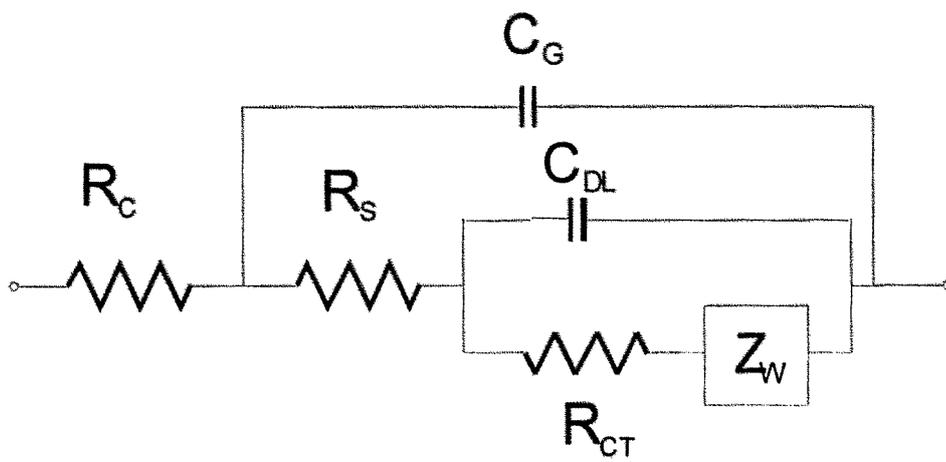


Figura 3

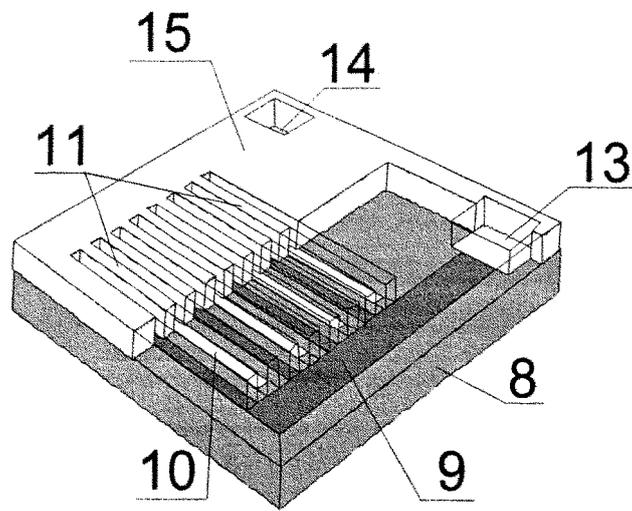


Fig. 4A

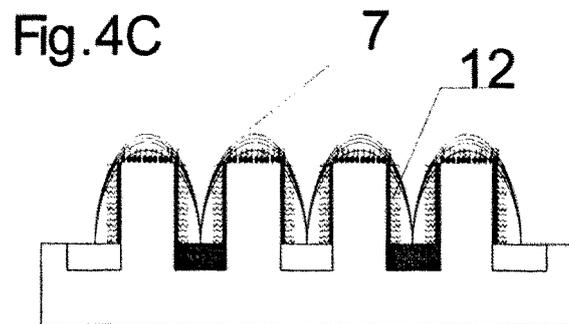
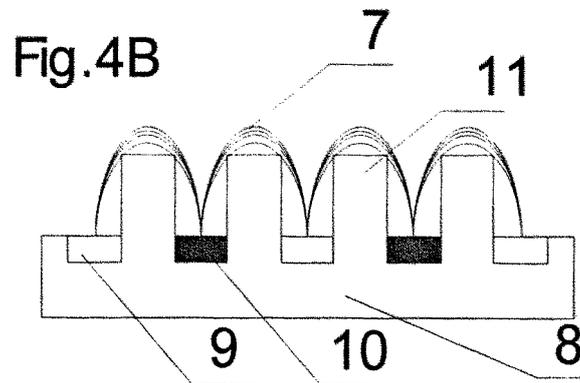


Figura 4

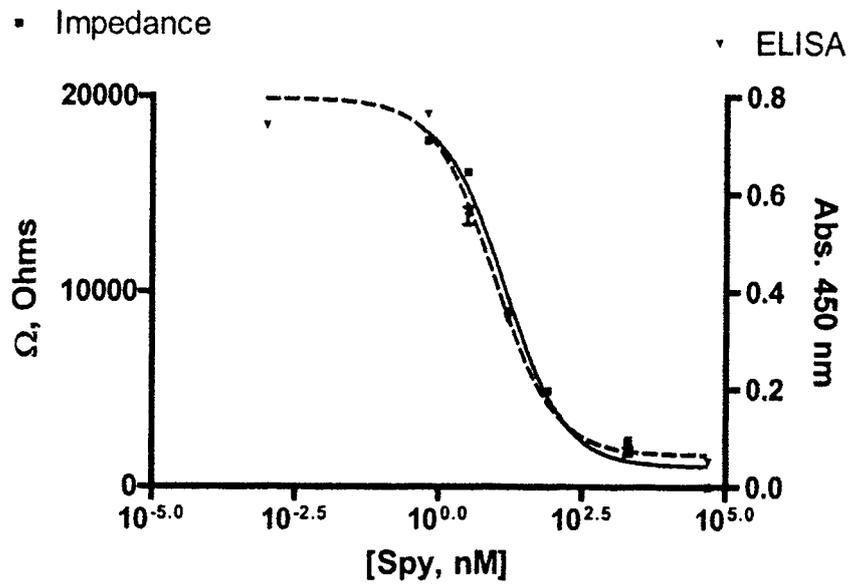


Figura 5

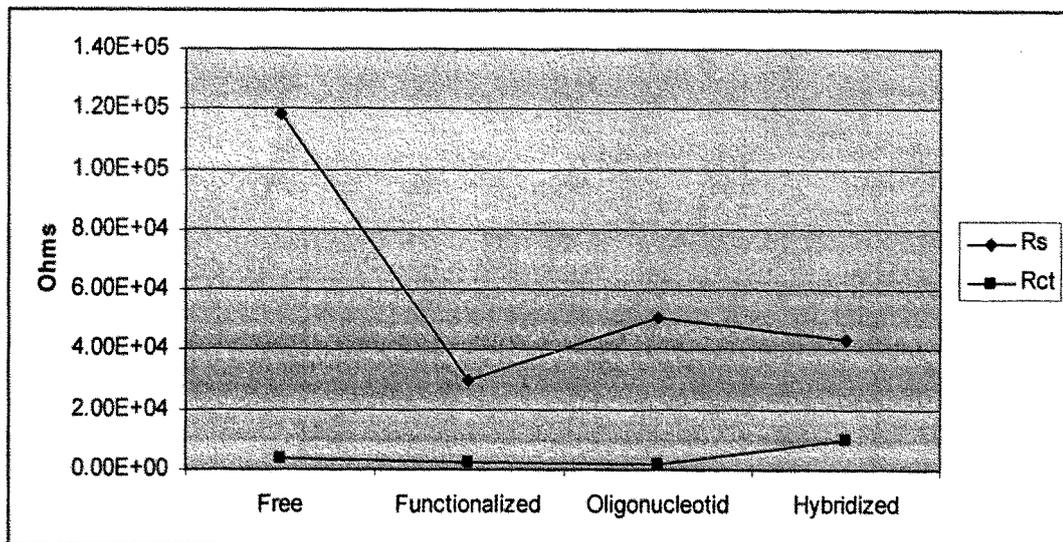


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 307 430

② Nº de solicitud: 200701253

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.05.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007042356 A1 (INTERUNIVERSITAIR MICROELEKTRONICA CENTRUM VZW & INNOGENETICS) 19.04.2007, página 6, línea 6 - página 7, línea 29; página 21, líneas 16-24; figura 2.	1-16
A	US 6440662 B1 (VAN GERWEN, P. et al.) 27.08.2002, reivindicación 1; columna 3, líneas 55-63.	1-16
A	SCHÖNING, M.J. & POGHOSSIAN, A. "Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs)". The Analyst, 2002, Volumen 127, páginas 1137-1151. Ver apartado 3, páginas 1140-1141; figuras 4 y 5.	1-16
A	EP 1607739 A1 (EIDGENÖSSICHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZÜRICH) 21.12.2005, página 6, párrafos [0029]-[0030]; figuras 2a-2c; reivindicaciones 1,2.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.08.2008

Examinador

G. Esteban García

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/02 (2006.01)

G01R 27/16 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)