



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 745**

② Número de solicitud: 200802068

⑤ Int. Cl.:
G01N 27/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.07.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.03.2010

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Baldi Coll, Antonio;**
Fernández Sánchez, César;
Rica Quesada, Roberto de la y
Bonilla Aguilar, Diana Lissette

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Dispositivo de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable.**

⑤ Resumen:

Dispositivo de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable.

El objeto principal de la presente invención es un dispositivo de lectura eléctrica de microarrays que se puede limpiar y volver a utilizar más de una vez. El dispositivo (1, 1', 1'') de lectura de microarrays (6) tiene las siguientes partes: una base (2, 2', 2''), que tiene unos medios de apoyo (3, 3', 3'') para situar la superficie de test (7) del microarray (6) en paralelo a una superficie de lectura (4) de la base (2, 2', 2''); una matriz de transductores (5, 5', 5''), dispuestos sobre la superficie de lectura (4) de la base (2, 2', 2''), que traducen una variación de una magnitud eléctrica o química en una variación de una magnitud eléctrica; y unos medios de lectura (10), conectados a los transductores (5, 5', 5''), que interpretan las señales eléctricas de los transductores (5, 5', 5'').

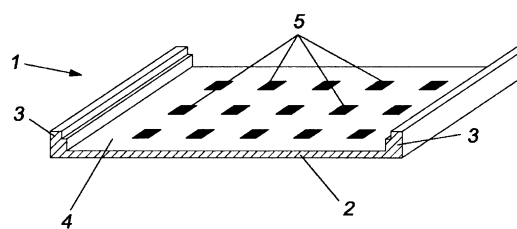


FIG. 2

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable.

5 Objeto de la invención

El objeto principal de la presente invención es un dispositivo de lectura eléctrica de microarrays que se puede limpiar y volver a utilizar más de una vez.

10 Antecedentes de la invención

Desde su aparición a finales de la década de 1980, los biochips o microarrays han permitido llevar a cabo interpretaciones cuantitativas de muchos e importantes fenómenos biológicos. Un microarray es un conjunto de spots o puntos de ensayo de pequeñas dimensiones (desde pocos nm a pocos mm) sobre un soporte plano que permite realizar muchos ensayos en paralelo, aumentando enormemente la velocidad y la capacidad de análisis respecto a sistemas de análisis en serie.

Estos elementos están diseñados para analizar el contenido proteico, las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-ligando, la presencia de mutaciones del ADN, patrones de expresión de genes, etc., de muestras biológicas complejas. Los microarrays que utilizan anticuerpos como elemento de reconocimiento se basan en diferentes tipos de ensayo:

- Tipo sándwich, cuando el analito es capturado por un anticuerpo inmovilizado en el soporte y cuantificado mediante un segundo anticuerpo marcado.
- Tipo competitivo cuando copias del analito se inmovilizan en los spots de la superficie del soporte y la cuantificación de dicho analito se realiza indirectamente a partir de los anticuerpos marcados que se unen a dichos spots en presencia de la muestra que se desea analizar.
- Tipo fase inversa cuando la muestra se adsorbe directamente en la superficie del soporte y el analito es reconocido por anticuerpos marcados.

En todos ellos la cuantificación se realiza por medio de la detección de una marca, que está unida a un anticuerpo. En el caso de chips de ADN la marca se une a los fragmentos de ADN o ARN a analizar. Las marcas pueden ser de tipo óptico (molécula fluorescente, punto cuántico, enzima cuyo producto precipita), radioactivo (radioisótopos), o electroquímico (enzima cuyo producto es electroactivo o nanopartículas electroactivas). Este último tipo de marcas tienen la ventaja de que permiten una instrumentación de lectura puramente eléctrica, y por lo tanto más compacta, robusta y barata que la de las más ampliamente utilizadas marcas fluorescentes. Existen productos en el mercado que utilizan este tipo de lectura, como por ejemplo el lector Electrasense de COMBIMATRIX (WO2008051196). La empresa Nanoident Technologies, anuncia también sistemas compactos con lectura eléctrica de microarrays basados en una matriz de fotodiodos orgánicos impresos en el mismo soporte donde se realiza el ensayo (WO2006026796).

Sin embargo, para que el uso de microarrays se extienda de forma más amplia y se pueda utilizar en los lugares en que se necesita (junto a la cama del paciente en un hospital o en los centro de atención primaria), los equipos deben mejorar en términos de coste, robustez, sencillez y tamaño. Estos equipos analíticos constan básicamente de dos partes diferenciadas: los microarrays sobre los que se realiza el ensayo y el dispositivo con que se realiza la lectura del resultado de dicho ensayo. En algunos casos también se incluyen otros complementos en el sistema, como un brazo robótico para la deposición de componentes de reconocimiento o muestras sobre los spots o puntos de medida del microarray (spoter), o un equipo con componentes fluidicos y reactivos para realizar el ensayo automáticamente.

Los dispositivos de lectura de tipo eléctrico son los más robustos, sencillos y de menor tamaño. Sin embargo, presentan el inconveniente de requerir una matriz de dispositivos (electrodos o fotodiodos) formados sobre el propio soporte, lo cual obliga a utilizar un soporte nuevo y desechar el usado cada vez que se realiza el ensayo. El soporte, además, es un elemento complejo y costoso, ya que debe incluir transductores eléctricos, etc., en lugar de los soportes habitualmente utilizados en los sistemas ópticos, que consisten simplemente en un trozo de vidrio o plástico funcionalizado.

Descripción de la invención

La presente invención describe un dispositivo de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable que está basado en la medida electroquímica (amperométrica, potenciométrica o impedimétrica) de la acumulación de productos de una reacción enzimática al entrar en contacto una superficie marcada por marcas enzimáticas y un sustrato químico. La novedad de este dispositivo reside en que los transductores encargados de realizar la medida se encuentran en una base diferente al soporte del microarray, de manera que el dispositivo de lectura se puede reutilizar para tantos análisis como se desee. Además el dispositivo de lectura puede funcionar con los soportes de bajo coste utilizados por los conocidos sistemas ópticos. El único requerimiento para el uso de este dispositivo de lectura es que la marca enzimática utilizada, al reaccionar con su sustrato químico correspondiente, genere un producto que pueda ser detectado por los

transductores, es decir, un producto que modifique alguna propiedad eléctrica o química del medio en que se produce la reacción. Los transductores de la invención, por tanto, transforman magnitudes eléctricas o químicas de un medio en magnitudes eléctricas.

5 En el caso de transductores impedimétricos, será necesario que el sustrato químico sea una especie química con carga neta diferente a la de la suma de las cargas netas de los productos, de manera que al producirse la reacción enzimática cambie la concentración de especies cargadas, y por lo tanto cambie la conductividad del medio. Un ejemplo de ello es el enzima Ureasa, que al reaccionar con la urea (especie neutra) produce amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco se protona rápidamente dando lugar al ion amonio (cargado positivamente), mientras que el dióxido de carbono se convertirá parcialmente en bicarbonato (cargado negativamente).

15 En el caso de transductores amperométricos, la reacción enzimática debe producir especies electroactivas. Un ejemplo es el enzima fosfatasa alcalina, que en presencia de p-aminofenilfosfato produce p-aminofenol. El p-aminofenol se oxida a un potencial menor de 200 mV dando lugar a p-quinonaimina. Este sistema de enzima/sustrato permite utilizar el redox cycling ya que la p-quinonaimina puede ser reducida a su vez a un potencial menor de -200 mV dando lugar nuevamente a p-aminofenol.

20 En el caso de transductores potenciométricos, la reacción enzimática debe producir iones que sean detectables en el transductor. El caso más simple sería una enzima que produzca un cambio de pH.

25 En el presente documento, diremos que un microarray está formado por un soporte plano, en una de cuyas superficies, que denominaremos "superficie de test", hay una matriz de spots con una marca enzimática. El soporte plano puede ser cualquiera de los soportes habitualmente utilizados con otros tipos de equipos de lectura, por ejemplo ópticos, y puede ser de materiales como vidrio o plástico, entre otros.

30 Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se describe un dispositivo de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable que comprende los siguientes elementos:

1) Una base, que comprende unos medios de apoyo para situar la superficie de test del microarray en paralelo a una superficie de lectura de la base.

35 Los medios de apoyo de la base deben ser tales que la superficie de test del microarray quede enfrentada en paralelo a la superficie de lectura de la base. Además, la distancia entre ambas superficies debe ser tal que permita que una gota de un medio acuoso toque simultáneamente ambas superficies, poniendo así en contacto el sustrato químico presente en el medio acuoso y la marca enzimática de los spots del microarray, y produciéndose así una reacción química que resulta en unos productos que afectan a propiedades eléctricas o químicas del medio acuoso.

40 2) Una matriz de transductores, dispuestos sobre la superficie de lectura de la base, que traducen una variación de una magnitud eléctrica o química en una variación de una magnitud eléctrica.

Los transductores están fijados a la superficie de lectura de la base formando una matriz, de tal modo que, cuando el microarray se dispone sobre los medios de apoyo, cada transductor queda enfrentado a un spot.

45 Para poder efectuar la lectura, se debe aplicar una gota de medio acuoso que contenga el sustrato químico correspondiente entre cada transductor y el respectivo spot enfrentado al mismo. Las gotas de medio acuoso pueden formarse de cualquier modo, siempre que todas sean del mismo tamaño, y que no se toquen unas con otras. Por ejemplo, se podría utilizar una micropipeta o un equipo tipo "spotter", aunque en una realización preferida de la invención, el dispositivo de lectura de microarrays de la invención comprende un medio de aplicación de gotas de medio acuoso.

50 Preferentemente, el medio de aplicación de gotas de medio acuoso está integrado en el propio dispositivo de lectura de microarrays, y comprende un depósito de medio acuoso acoplado a la superficie de la base opuesta a la superficie de lectura, y una matriz de microcanales practicados en la propia base del dispositivo. Cada microcanal conecta el depósito de medio acuoso con el punto en el que está situado cada transductor, de modo que modificando la presión en el depósito se consigue una inyección controlada de medio acuoso, formándose así gotas de volumen uniforme encima de cada transductor. Además, el depósito de medio acuoso comprende una entrada y una salida de medio acuoso, de manera que se pueden inyectar con él diferentes líquidos.

60 En otra realización preferida, el medio de aplicación de gotas de medio acuoso es un aplicador que comprende un depósito de medio acuoso y una matriz de microcanales practicados en una de sus paredes. Al igual que el medio de aplicación de gotas de medio acuoso descrito en el párrafo anterior, situando correctamente el aplicador sobre la superficie de lectura de la base y modificando la presión en el depósito, se produce la inyección de fluido sobre cada transductor hasta que se forma una gota del volumen deseado. Esto se puede hacer formando directamente una gota única o depositando una multitud de pequeñas gotas expulsadas desde la boquilla del microcanal por algún mecanismo similar al utilizado por las impresoras de inyección de tinta, y que al irse uniendo sobre el transductor van formando la gota. Al tratarse de un aplicador que no está integrado en la base, es necesario posicionarlo de modo que cada microcanal quede enfrentado a un transductor. Para ello, se pueden utilizar los mismos medios de apoyo utilizados para colocar el microarray.

ES 2 334 745 A1

3) Unos medios de lectura, conectados a los transductores, que interpretan las señales eléctricas de los transductores.

Una vez las gotas están en contacto con los spots del microarray marcados enzimáticamente, la reacción enzimática empieza a tener lugar. En los spots donde exista mayor concentración de la marca enzimática, el transductor medirá un cambio mayor en la concentración de productos. Las gotas están separadas entre si y por lo tanto los productos se acumulan en el volumen de las mismas sin que se produzca interferencia entre diferentes puntos de la matriz. Por tanto, la matriz de transductores está conectada a unos circuitos electrónicos de medida capaces de adquirir y procesar la señal generada por cada uno de dichos transductores. La medida se puede realizar al final de un tiempo determinado o durante todo el tiempo que las gotas están en contacto con los spots. El segundo caso permite medir la dinámica de la reacción enzimática, lo cual puede dar mayor información analítica. Por ejemplo, puede permitir un mayor rango dinámico, ya que se puede detectar la evolución de las concentraciones de producto antes de que se llegue a un valor de saturación.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se describe un procedimiento de lectura eléctrica de un microarray utilizando el dispositivo de lectura descrito anteriormente, que comprende las siguientes operaciones:

a) Poner en contacto los spots del microarray con las gotas de medio acuoso, produciéndose en cada gota una reacción química que modifica una propiedad eléctrica o química del medio acuoso que forma la gota.

Esta operación se puede realizar de dos modos diferentes. De acuerdo con una realización particular, se pueden crear en primer lugar gotas de medio acuoso sobre los transductores, y a continuación colocar el microarray, con ayuda de unos medios de apoyo, en paralelo a la superficie de lectura de la base, y a una distancia tal que cada spot quede enfrentado a un transductor y la gota de medio acuoso los toque a ambos.

En otra realización particular, es posible disponer en primer lugar el microarray sobre los medios de apoyo y, a continuación, inyectar el medio acuoso sobre los transductores hasta formar gotas de un tamaño suficiente como para que cada una de ellas esté en contacto simultáneamente con el transductor y con el spot enfrentado al mismo.

b) Leer, mediante unos medios de lectura, la señal eléctrica generada por cada uno de los transductores en respuesta a la modificación de una propiedad eléctrica o química del medio acuoso que forma la gota.

Una vez una gota de medio acuoso entra en contacto con un spot marcado enzimáticamente, comienza la reacción química entre el sustrato químico incluido en el medio acuoso y la marca enzimática del spot, formándose como resultado de la reacción unos productos que modifican alguna propiedad eléctrica o química del medio acuoso que forma la gota. La subsiguiente operación de lectura se puede realizar, bien simultáneamente sobre todos los transductores de la matriz, o bien secuencialmente por filas, columnas o individualmente.

c) Lavar la superficie de lectura del dispositivo y reutilizarlo para nuevas pruebas.

Es importante que, una vez realizada la lectura y antes de realizar una nueva lectura, se limpien los transductores y la superficie de lectura de la base del dispositivo para que no queden restos de los productos de la reacción enzimática ni de enzimas que se puedan haber desprendido del microarray. En este sentido, la solución o soluciones de limpieza deben tener la capacidad de disolver los productos de la reacción enzimática y desnaturalizar los enzimas para que pierdan por completo su actividad. La limpieza puede acabar con un enjuagado en agua desionizada.

Esta limpieza se puede hacer de modo tradicional o bien, de acuerdo con una realización particular de la invención, succionando las gotas de medio acuoso generadas e inyectando a continuación una solución de limpieza, mediante el medio de aplicación de gotas de medio acuoso. Para llevar a cabo esta operación del procedimiento, el medio de aplicación de gotas de medio acuoso debe ser capaz de crear presiones negativas en el depósito al que están conectados los microcanales y de sustituir el medio acuoso del depósito por una solución de limpieza adecuada.

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra un esquema de un microarray de soporte plano, con las diferentes partes que lo componen.

Figuras 2.- Muestra un esquema de un dispositivo de lectura eléctrica de microarrays de acuerdo con la invención.

Figuras 3 y 4.- Muestran dos realizaciones particulares de medios de aplicación de gotas de medio acuoso.

Figuras 5 y 6.- Muestra las primeras operaciones del procedimiento de lectura eléctrica de microarrays de acuerdo con una realización particular de la invención.

Figura 7.- Muestra una realización particular de los medios de lectura de acuerdo con la presente invención.

Realización preferente de la invención

5 La Figura 1 muestra un microarray (6) formado por un soporte plano (9), sobre cuya superficie de test (7) se dispone una matriz de puntos de medida o spots (8), que son marcados con una marca enzimática.

La Figura 2 muestra de forma esquemática el dispositivo (1) de lectura de microarrays de acuerdo con la presente invención. Se observa que está formado por una base (2), sobre cuya superficie de lectura (4) hay una matriz de transductores (5) que reaccionan ante un cambio en una propiedad eléctrica o química del medio acuoso.

El dispositivo (1) de lectura de microarrays de tipo eléctrico y reutilizable del ejemplo comprende además, en los laterales de la base (2), unos medios de apoyo (3), que sirven para apoyar el microarray (6) de forma que cada spot (8) de la matriz quede enfrentado a un transductor (5). En este ejemplo, los medios de apoyo (3) comprenden básicamente un reborde que sirve de apoyo al microarray (6) durante el proceso de lectura. Aunque no se observa en las figuras, en la superficie opuesta a la superficie de lectura (4) se encuentran los medios de lectura (10), que se han representado en la Fig. 7.

La fabricación de la base (2) y la matriz de transductores (5) se realiza a partir de obleas de vidrio tipo pyrex de 100 mm de diámetro. El proceso empieza con la deposición de una tricapa metálica de titanio, níquel y oro (el titanio se deposita sobre el pyrex con un grosor de 20 nm, el níquel sobre el titanio con un grosor de 50 nm y el oro sobre el níquel con un grosor de 50 nm). Los tres metales se despositan por pulverización catódica. A continuación se realiza un proceso de fotolitografía estándar con una máscara que contiene los motivos para definir una matriz de pares de electrodos interdigitados. Cada par de electrodos interdigitados tiene 14 dedos (siete en cada electrodo) de 20 pm de ancho, separados 20 pm y con una longitud de la zona interdigitada de 500 pm. Con la misma máscara se definen las pistas de conexión que van desde cada electrodo hasta el borde del chip, donde se define una área para su conexión a un circuito impreso mediante soldadura de hilo. Los transductores forman una matriz rectangular de 4x9 elementos y están separados 6 mm entre ellos. En una oblea de 100 mm caben dos matrices de transductores (5) como la descrita. El ataque de los metales posterior a la fotolitografía se realiza en diferentes soluciones de ataque. Para el oro se utiliza una mezcla de 5700 ml de H₂O, 435 g de KI y 250 g de I₂. Para el níquel se utiliza una mezcla 1:4 de HNO₃ al 70% : H₂O. Para el titanio se utiliza una mezcla 1:10:33 de HF 49% : H₂O : 1,2-Propanodiol.

Una vez definidos los electrodos la oblea se pasa por una sierra mecánica para separar las dos matrices de transductores (5). Las matrices se unen a un circuito impreso en el que se han definido las áreas necesarias para la conexión mediante soldadura por hilo y que tiene un conector para conectar eléctricamente los electrodos a la instrumentación. Tras realizar la soldadura con hilo de todos los electrodos se protegen los hilos mediante un polímero termocurable (Epotek H77). El medio de apoyo (3) se fabrica con Polidimetilsiloxano a partir de un molde, y se suelda a la matriz de transductores mediante activación con plasma de oxígeno.

Las Figuras 3 y 4, por su parte, muestran respectivamente dos realizaciones preferidas de medios de aplicación de medio acuoso. En la figura 3, éstos están integrados en la base (2'), de modo que un depósito (11') de medio acuoso formado en la superficie opuesta a la superficie de lectura (4) inyecta el medio acuoso a través de una matriz de microcanales (12') que atraviesan la base (2') hasta el lugar en el que está situado cada transductor (5'). En este ejemplo, los transductores (5') tienen un orificio central donde está la boquilla de cada microcanal.

En la Figura 4, los medios de aplicación de medio acuoso constituyen un aplicador formado por un depósito (11'') de medio acuoso en una de cuyas paredes hay unos microcanales (12''), a través de los cuales se inyecta el medio acuoso sobre los transductores (5''). Para que cada microcanal quede enfrentado a un transductor (5''), los medios de apoyo (3'') comprenden además un segundo reborde sobre el que se apoya el aplicador de medio acuoso.

Las Figuras 5 y 6 muestran algunas operaciones de una realización preferida del procedimiento de la invención. En particular, la Figura 5 muestra el microarray (6) y el dispositivo de lectura (1), donde previamente se ha llevado a cabo la operación de inyectar una gota de medio acuoso sobre cada transductor (5). El microarray (6) está ya preparado para ser apoyado en los medios de apoyo (3), momento que se recoge en la Figura 6, en la que cada gota de medio acuoso ya están en contacto con un spot (8), y por lo tanto ha comenzado ya la reacción química entre la marca enzimática y el sustrato.

Finalmente, la Figura 7 muestra la instrumentación de medida en el caso de que el producto de la reacción química entre la marca enzimática y el sustrato provoque cambios en la impedancia del medio acuoso de la gota. La instrumentación comprende fuentes de excitación de tensión alterna (15) y circuitos de medida (16) de corriente alterna, que combinados son capaces de medir la impedancia vista en terminales de los electrodos (17) interdigitados. En la figura se observa conexión de dichas fuentes (15) y circuitos medidores (16) con los electrodos (17). Como se puede apreciar, los transductores impedimétricos permiten un conexionado tipo fila-columna. Esto hace que sea práctica la realización de matrices de gran número de elementos. Por ejemplo, para una matriz de 1024 elementos bastaría con 32 fuentes de excitación alterna (15) y 32 circuitos de medida (16) de la corriente. De hecho, con una multiplexación adecuada es suficiente una sola fuente de excitación (15) y un solo circuito de medida (16) de la corriente. En el caso de que el número de elementos de la matriz sea muy elevado, el número de soldaduras por hilo que se necesitarían también lo sería. Para solventar este problema se puede utilizar una tecnología de fabricación con dos

ES 2 334 745 A1

niveles de metal y conectar los electrodos (17) a nivel de oblea por filas y columnas como se muestra en la Figura 7. De esta manera, el número de soldaduras por hilo que se necesitan para encapsular una matriz de transductores de $(n \times m)$ es tan solo de $(n + m)$. En el ejemplo que aquí se describe, las fuentes de excitación son las salidas analógicas de una tarjeta NI USB-6259 de National Instruments. Los circuitos de medida (16) de corriente se han implementado en el ejemplo con amplificadores operacionales AD8674, con una resistencia de realimentación de precisión de 100 k Ω . El registro de los valores de tensión a la salida de los amplificadores operacionales se ha realizado mediante las entradas analógicas de la misma tarjeta. Un programa en LabView sirve para controlar el proceso de adquisición, procesar las señales adquiridas y obtener los valores de impedancia que presentan los transductores (5) a lo largo del tiempo de lectura. El proceso de adquisición se desarrolla según la siguiente secuencia: Primero se excita una fila de transductores (5) con una tensión alterna de 50 mV de amplitud y 2 kHz de frecuencia durante 25 ms. El resto de fuentes (15) de excitación se mantiene a 0V. Durante este tiempo se adquiere la señal con las entradas analógicas conectadas a cada una de las columnas de transductores (5). A continuación se procedería de igual forma con la siguiente fila y así hasta que todas las filas de transductores hubieran sido leídas.

Se describe a continuación un ejemplo de uso de un dispositivo (1) de lectura de microarrays (6) de tipo eléctrico y reutilizable basado en transductores (5) impedimétricos para medir los resultados en un microarray (6) que utiliza la ureasa como marca enzimática.

La Ureasa, en presencia de urea (neutra) produce amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco se protona rápidamente dando lugar al ion amonio (cargado positivamente), mientras que el dióxido de carbono se convertirá parcialmente en bicarbonato (cargado negativamente). Por lo tanto, la reacción enzimática hace aumentar la conductividad del tampón original. El tampón original está formado por una solución acuosa de urea 0.1 M y glicina 0.25 M, con una conductividad aproximada de 16 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En este ejemplo, las gotas de tampón, de 1 μl de volumen se depositaron sobre los transductores (5) manualmente utilizando una micropipeta. En la preparación del microarray, se empleó como analito modelo a detectar una inmunoglobulina G de conejo y se aplicó un ensayo de tipo fase inversa. Este consistió en realizar diluciones sucesivas de una solución madre de dicho analito modelo. Se depositaron microgotas de 1 μL de volumen, de cada una de las diluciones preparadas en el soporte (9) del microarray (6) (portaobjetos de vidrio previamente silanizado). Una vez inmovilizado el analito, el microarray (6) se incubó con una disolución de un anticuerpo de cabra, anti-inmunoglobulina G de conejo marcado con ureasa durante una hora, tiempo durante el cual tuvo lugar la interacción específica entre el analito y el anticuerpo marcado. Tras lavar el microarray (6) con agua desionizada y secar en corriente de nitrógeno, se procedió a la lectura del mismo con la matriz de transductores (5) impedimétricos.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1, 1', 1'') de lectura de microarrays (6) de tipo eléctrico y reutilizable, **caracterizado** porque comprende:
5 una base (2, 2', 2''), sobre cuya superficie de lectura (4) están dispuestos en una matriz unos transductores (5, 5', 5''), que traducen una variación de una magnitud eléctrica o química en una variación de una magnitud eléctrica;
- unos medios de apoyo (3, 3', 3'') comprendidos en la base (2, 2', 2'') que sirven para situar la superficie de test (7) de un microarray (6) que comprende una matriz de spots (8) con una marca enzimática en paralelo a la superficie de lectura (4) de la base (2, 2', 2'') a una distancia tal que permite que una gota de un medio acuoso ponga en contacto un spot (8) de la superficie de test (7) con un transductor (5, 5', 5'') de la superficie de lectura (4); y
- 15 unos medios de lectura (10), conectados a los transductores (5, 5', 5''), que interpretan las señales eléctricas de los transductores (5, 5', 5'').
2. Dispositivo (1, 1', 1'') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la base (2, 2', 2'') y la matriz de transductores (5, 5', 5'') están fabricados a partir de una oblea de vidrio tipo pirex.
3. Dispositivo (1, 1', 1'') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, **caracterizado** porque los transductores (5, 5', 5'') se eligen de la siguiente lista: transductores impedimétricos, transductores amperométricos y transductores potenciométricos.
- 25 4. Dispositivo (1, 1', 1'') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque los medios de lectura (10) comprenden circuitos electrónicos que adquieren y procesan las señales eléctricas generadas por los transductores (5, 5', 5'').
- 30 5. Dispositivo (1, 1', 1'') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque además comprende un medio de aplicación de gotas de medio acuoso para formar una gota de medio acuoso sobre cada transductor (5, 5', 5'').
6. Dispositivo (1'') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el medio de aplicación de gotas de medio acuoso es un aplicador que comprende un depósito (11'') de medio acuoso y una matriz de microcanales (12'') practicados en una de sus paredes.
- 35 7. Dispositivo (1') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el medio de aplicación de gotas de medio acuoso comprende un depósito (11') de medio acuoso situado junto a la superficie de la base (2') opuesta a la superficie de lectura (4), y una matriz de microcanales (12') practicados en la base (2').
- 40 8. Dispositivo (1') de lectura eléctrica de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** porque los microcanales (12') comprenden una boquilla situada en un orificio central de los transductores (5').
- 45 9. Procedimiento de lectura de un microarray (6), donde el microarray (6) comprende un soporte (9) plano en cuya superficie de test (7) hay una matriz de spots (8) con una marca enzimática y donde el dispositivo (1, 1', 1'') de lectura comprende una base (2, 2', 2'') sobre cuya superficie de lectura (4) se dispone una matriz de transductores (5, 5', 5'') que transforman una modificación de una propiedad eléctrica o química en una modificación de una propiedad eléctrica, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones:
- 50 disponer en paralelo la superficie de lectura (4) de la base (2, 2', 2'') y la superficie de test (8) del microarray (6), de modo que cada spot (8) está enfrentado a un transductor (5, 5', 5'') con una gota de un medio acuoso en contacto con ambos;
- 55 leer, mediante unos medios de lectura (10), la señal eléctrica generada por cada uno de los transductores (5, 5', 5'') en respuesta a la modificación de una propiedad eléctrica o química del medio acuoso que forma la gota;
- 60 lavar la superficie de lectura (4) del dispositivo (1) y reutilizarlo para nuevas lecturas.
10. Procedimiento de lectura de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque la gota de medio acuoso se añade antes de acercar los spots (8) del microarray (6) a los transductores (5, 5', 5'').
- 65 11. Procedimiento de lectura de un microarray (6) de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque la gota de medio acuoso se añade después de acercar los spots (8) del microarray (6) a los transductores (5, 5', 5'').

ES 2 334 745 A1

12. Procedimiento de lectura de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, **caracterizado** porque la operación de lectura se realiza durante todo el tiempo que cada gota de medio acuoso permanece en contacto con los spots (8) y transductores (5, 5', 5'').

5 13. Procedimiento de lectura de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, **caracterizado** porque la operación de lectura se realiza solamente una vez un tiempo predeterminado después de entrar las gotas de medio acuoso en contacto con los spots..

10 14. Procedimiento de lectura de un microarray (6) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, **caracterizado** porque la operación de lavar el dispositivo (1, 1', 1'') de lectura se efectúa inyectando una solución de limpieza mediante un medio de aplicación de gotas de medio acuoso.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

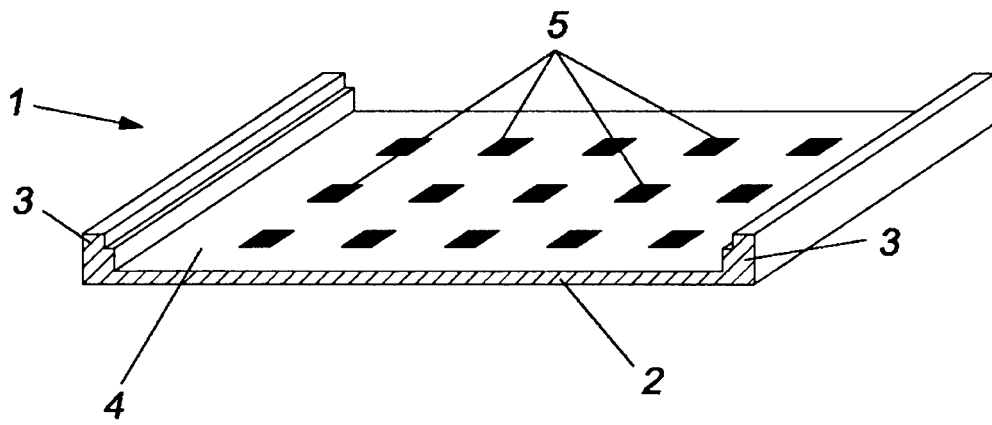
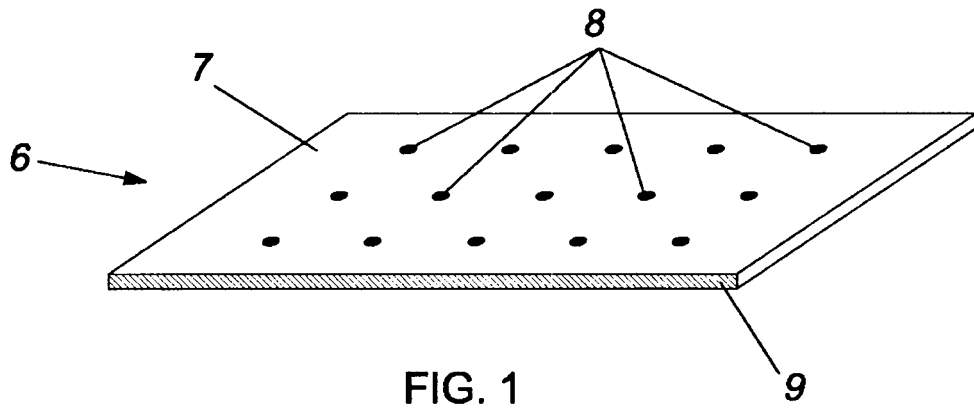


FIG. 2

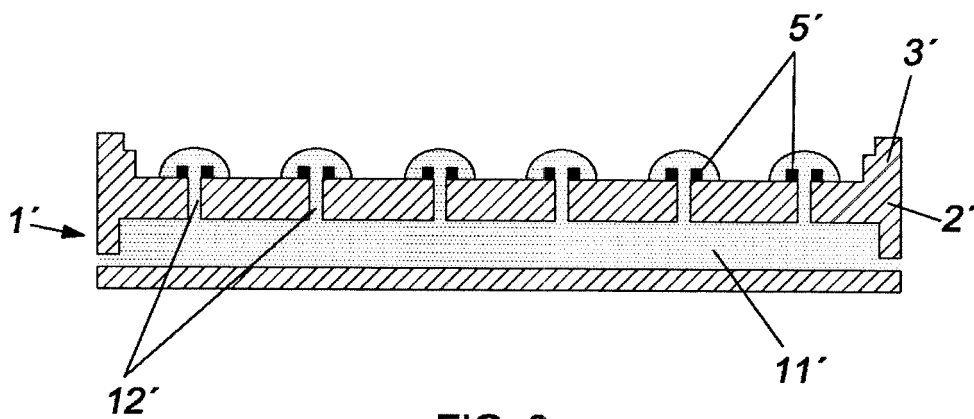


FIG. 3

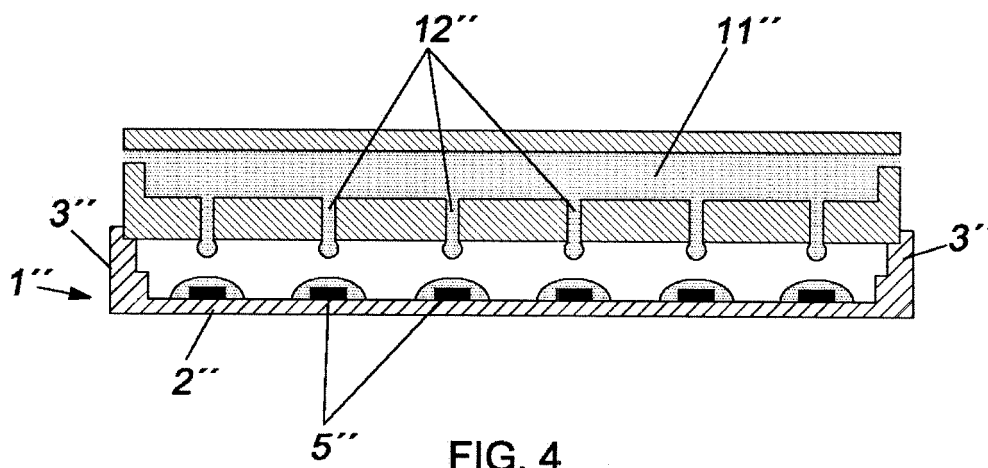


FIG. 4

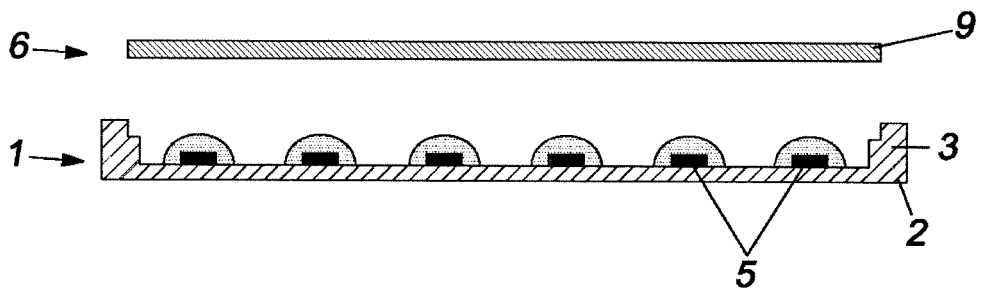


FIG. 5

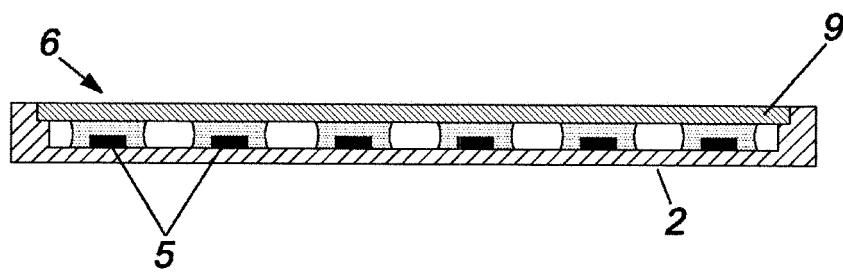


FIG. 6

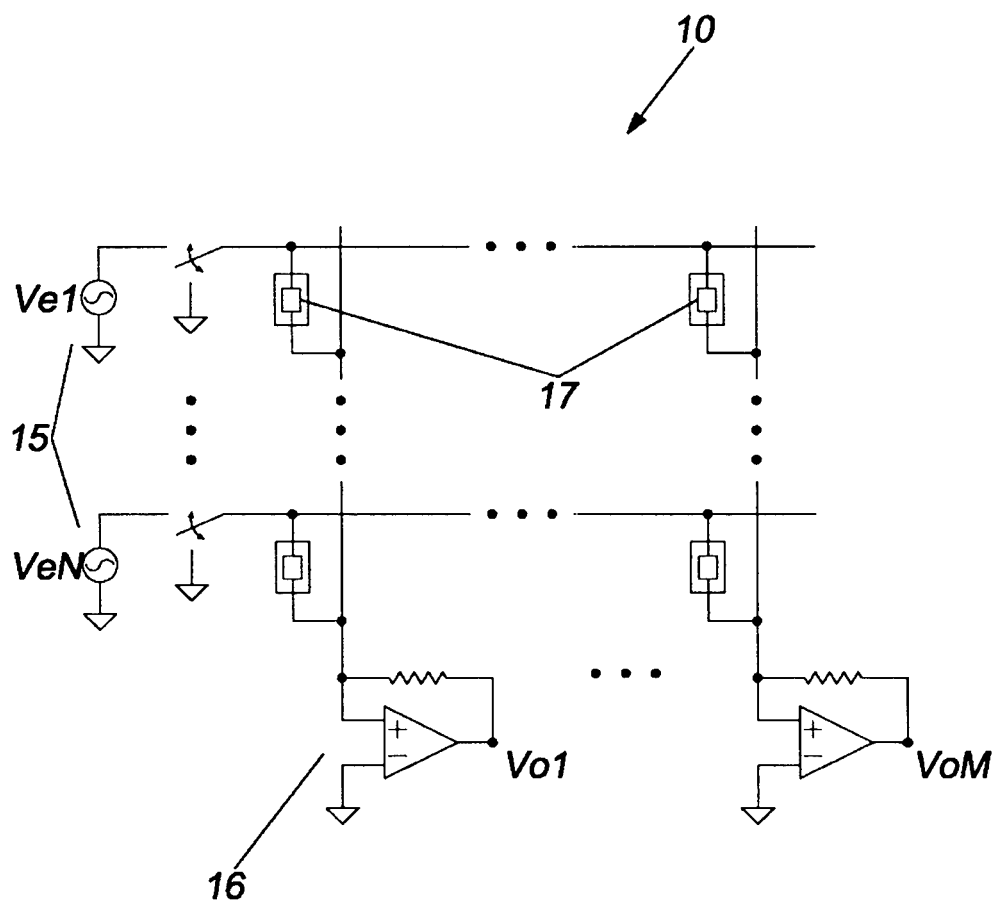


FIG. 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 745

② Nº de solicitud: 200802068

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 27/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	De the RICA, R et al. Local detection of enzymatic ion generation with polycrystalline silicon interdigitated electrodes and its application to biosensing. Applied Physics Letters. 2007, Vol. 90, 074102, <DOI:10.1063/1.2472718>.	1,9
A	US 2005106742 A (WAHL) 19.05.2005, resumen; párrafos [11-17],[32],[48],[59-61]; figuras 1-3.	1,9

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

01.03.2010

Examinador

A. Figuera González

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP, internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	De la RICA, R et al. Local detection of enzymatic ion generation with polycrystalline silicon interdigitated electrodes and its application to biosensing. Applied Physics Letters. 2007, Vol. 90, 074102, <DOI:10.1063/1.2472718>	2007
D02	US 2005106742 A (WAHL)	19-05-2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Se considera que el documento de la técnica más próximo a la invención objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 9 es el documento D01 en el que se describen chips que contienen electrodos interdigitados modificado con una enzima, la ureasa. Los sensores son capaces de detectar cambios en la resistencia de la solución cerca de la superficie del chip al producirse allí una reacción enzimática que genera especies cargadas. Véase documento D01, resumen y figura 1.

La diferencia principal entre el documento D01 y la invención objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 9, es que en el dispositivo de las reivindicaciones 1 y 9 la marca enzimática no se encuentra en la misma superficie que los transductores.

El problema técnico que se plantea es poder conservar los sensores para usos posteriores superando la dificultad que supone el que hayan sido modificados con una enzima.

El documento D02 se refiere a un método y un dispositivo para determinar analitos en un líquido. En el documento D02 se plantea el problema que supone limpiar para poder volver a utilizarlos dispositivos en los que los sensores coinciden con determinadas áreas funcionalizadas en la superficie de un chip. Véase documento D02, párrafos [11] y [12]. La solución que proponen es colocar en diferentes planos los elementos de transporte y los elementos de detección. Véase documento D02, párrafo [16], párrafos [59] a [61] y figuras 1 a 3.

Así se puede usar el plano de transporte múltiples veces mientras que el plano de detección, en los casos en que los elementos sensores alterados por reacciones irreversibles, se usa una única vez. Véase documento D02, párrafo [48].

La solución propuesta en el documento D02, se basa en la misma filosofía que la solución aplicada en la invención: enviar a un plano desechable los elementos que quedan contaminados conservando en un plano limpio los elementos que se quieren reutilizar.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que ilustre la posibilidad de tener los spots separados de los transductores de magnitudes eléctricas o químicas. Así pues para el experto en la materia no hubiera resultado evidente separar en dos superficies diferentes algo que hasta ese momento se consideraba que formaba un único elemento.

Por ello se considera que las reivindicaciones independientes 1 y 9 tienen novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de acuerdo con el artículo 4 de la Ley de Patentes.

Las reivindicaciones 2 a 8 y 10 a 14, dependientes de las reivindicaciones 1 y 9 que tiene novedad y actividad inventiva, tiene a su vez novedad y actividad inventiva.