



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 339 096**

⑫ Número de solicitud: 200902108

⑤① Int. Cl.:
G01N 33/552 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫② Fecha de presentación: **04.11.2009**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2010**

Fecha de la concesión: **03.02.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
17.11.2010

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **15.02.2011**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
15.02.2011

⑦③ Titular/es: **Universidad Politécnica de Valencia**
CTT-Edf. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES

⑦② Inventor/es: **Puchades Pla, Rosa;**
González Pedro, María Victoria;
Maquieira Catalá, Ángel y
Bañuls Polo, María José

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Procedimiento de modificación química de superficies de pentóxido de tántalo.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento de modificación química de superficies de pentóxido de tántalo.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la modificación de al menos una superficie de pentóxido de tántalo, caracterizado porque comprende, al menos, las siguientes etapas:

a) la preparación de una disolución de al menos un organosilano que comprende en su estructura al menos un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino primario o secundario y un grupo isocianato o isotiocianato;

b) la introducción en dicha disolución de la superficie de pentóxido de tántalo hasta obtenerse la superficie de pentóxido de tántalo modificada.

Asimismo, será objeto de esta invención la aplicación de dichas superficies de pentóxido de tántalo modificadas, preferentemente, en dispositivos ópticos de detección basados en guías de onda y anclaje covalente de biomoléculas.

ES 2 339 096 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de modificación química de superficies de pentóxido de tántalo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento de modificación química de superficies a base de pentóxido de tántalo (Ta_2O_5). La modificación es aplicable a cualquier tipo de superficie de óxido de tántalo como, por ejemplo, soportes sólidos para inmovilizar sustancias, tales como ácidos nucleicos o proteínas, con aplicación en el desarrollo de técnicas de detección basadas en guías de onda ópticas.

Antecedentes de la invención

La detección de ADN y ARN, así como de interacciones antígeno-anticuerpo con elevada sensibilidad es cada vez más interesante para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico precoz como por ejemplo, en genómica, proteómica, detección de enfermedades, etc.

La tecnología de micromatrices (del inglés, *microarrays*), basada en la interacción receptor-analito, está reemplazando a los ensayos tradicionales que utilizan geles, filtros y columnas, por chips de diferentes materiales capaces de almacenar decenas de miles de sondas (secuencias de ácidos nucleicos, proteínas, etc.), que proporcionan información sobre los niveles de expresión génica, síntesis de proteínas, polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms* o *SNPs*), fármacos, etc.

Las superficies empleadas para microarrays deben ser, preferentemente, planas y uniformes, de modo que permitan el anclaje de un elevado número, del orden de hasta centenares o miles, de sustancias dispuestas espacialmente. La detección y cuantificación de resultados se efectúa mediante fluorescencia o colorimetría y, en menor medida, por espectroscopia de masas, utilizando para ello sustancias funcionalizadas con un marcador adecuado. Los marcadores más frecuentes son fluoróforos con longitudes de onda de excitación en el UV/visible y emisiones entre 500 y 800 nm.

En este sentido, las tecnologías que emplean guías de onda planas se basan en la excitación del marcador fluorescente a través de un campo evanescente, con lo que la excitación y detección del fluoróforo se restringe a la superficie sensora, mientras que la señal debida a sustancias no ancladas o en disolución, no es detectada. Esto se traduce en un incremento significativo de la relación señal/ruido en comparación con los métodos de detección óptica convencionales. En definitiva, esta tecnología aprovecha la alta intensidad del campo y su confinamiento en la proximidad de las guías de onda, para proporcionar una detección altamente sensible y selectiva.

Las guías de onda planas consisten en una fina capa de un material con elevado Índice de refracción como pentóxido de tántalo u óxido de titanio, depositado en un soporte sólido, preferentemente transparente y con bajo índice de refracción (como vidrio o determinados polímeros).

Adaptar esta tecnología para aplicaciones analíticas, requiere inmovilizar sondas receptoras del analito de interés sobre la superficie de la guía de onda. Así, para mantener una alta sensibilidad y selectividad en los ensayos, es necesario desarrollar modificaciones químicas de la superficie de pentóxido de tántalo que permitan:

- una inmovilización estable de los elementos de reconocimiento biológico (ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, receptores de membrana, etc.);
- el mantenimiento de una capacidad bioreceptora similar a la presentada en disolución;
- maximizar el número posible de sitios activos; y
- minimizar las adsorciones inespecíficas.

Hasta el momento, la mayor parte de las modificaciones químicas de óxidos metálicos que se han llevado a cabo se han centrado en la formación de SAMs (del inglés, *Self Assembled Monolayers*) sobre óxido de silicio (en adelante, SiO) mediante silanización con clorosilanos (Wang, Y., Lieberman, M., *Langmuir*, **2003**, 19, 1159), y organosilanos (Rozlosnik, N., *et al.*, *Langmuir*, **2003**, 19, 1182).

La formación de SAMs sobre SiO con alquiltriclorosilanos fue introducida por primera vez por Bigelow en el año 1946 (Bigelow, W. C., *et al.*, *J. Colloid Sci.*, **1946**, 1, 513) y posteriormente fue desarrollada por Maoz y Sagiv (Maoz, R., Sagiv, J. *J. Colloid Sci.*, **1984**, 100, 465). Desde entonces, la bibliografía recoge muchos trabajos acerca de la modificación química superficial de SiO principalmente mediante silanos, organometálicos y alcoholes (Böcking, T., *et al.*, *Langmuir*, **2005**, 21, 10522-10529).

En la última década, el empleo de esta química para la fabricación de biosensores ha sido muy desarrollada (Lee L. M., *et al.*, *Nanotechnology*, **2006**, 17, S29-S33).

Existen también técnicas alternativas para recubrir superficies de óxidos, entre las que cabe citar: ácidos hidro-
xámicos sobre óxidos de cobre, plata, titanio, aluminio, zirconio y hierro (Folkers, J.P., *et al.*, *Langmuir*, **1995**, *11*,
813-824); ácidos carboxílicos sobre óxidos de aluminio (Aronoff, Y. G., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 259);
ácidos fosfónicos sobre mica (Woodward, J. T., *et al.*, *Langmuir*, **1996**, *12*, 3626), óxidos de circonio, titanio o silicio
5 circonizado (Gao, W., *et al.*, *Langmuir*, **1996**, *12*, 6429) y óxido de silicio (Midwood, K. S., *et al.*, *Langmuir*, **2004**,
20, 5501-5505).

En el caso del pentóxido de tántalo, sin embargo, se conocen pocas modificaciones superficiales dirigidas a la
inmovilización de sondas. La más conocida se basa en el empleo de alean-fosfatos y alcan-fosfonatos ω -sustituídos,
10 que han demostrado ser compuestos muy efectivos para la formación de SAMs sobre superficies de óxidos de metales
de transición como óxido de titanio (Tosatti, S. *et al.*, *Langmuir*, **2002**), óxido de niobio y pentóxido de tántalo (Textor,
M. *et al.*, *Langmuir*, **2000**, *16*, 3257-3271).

Los grupos funcionales situados en el otro extremo de la cadena permiten la modificación de las propiedades de la
15 superficie (hidrofobicidad, carga eléctrica, etc.), así como la adsorción o unión covalente de proteínas.

Otra alternativa interesante consiste en la adsorción de polímeros multifuncionales (polilisina, polietilenglicol) que
permitan inmovilizar los elementos de captura requeridos para los ensayos.

El empleo de la alternativa de los fosfonatos está bien establecida para la fabricación de dispositivos basados
en guías de onda planas. Sin embargo, para aplicaciones bioanalíticas, la búsqueda de nuevas alternativas para la
superficie de Ta₂O₅ que mejoren las prestaciones de las hasta ahora empleadas basadas en fosfonatos, sigue teniendo
una gran demanda.

Por tanto, es objeto de esta invención presentar un nuevo procedimiento de modificación de la superficie de pentó-
xido de tántalo con organosilanos, que permita la inmovilización de receptores para la realización de distintos tipos de
ensayos como, por ejemplo, los basados en micromatrices (*microarraying*) de alta densidad (Rebecca L. *et al.*, *Chem.*
Biol., **2007**, *2* (1), 24-30).

Gracias a este procedimiento, es posible obtener superficies con baja fluorescencia de fondo y alta capacidad de
carga de muestra y al mismo tiempo, se consiguen mejorar otros procedimientos ya conocidos respecto a la sencillez
del procedimiento, así como al número de etapas necesarias para conseguir la inmovilización del receptor.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la modificación de al menos una superficie de
pentóxido de tántalo, caracterizado porque comprende, al menos, las siguientes etapas:

- a) la preparación de una disolución de al menos un organosilano que comprende en su estructura al menos
un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino primario o secundario y un grupo isocianato o
isotiocianato;
- b) la introducción en dicha disolución de la superficie de pentóxido de tántalo hasta obtenerse la superficie de
pentóxido de tántalo modificada.

De manera particular, la superficie de pentóxido de tántalo se encontrará depositada sobre al menos una de las
caras de un soporte sólido, el cual consistirá, de manera preferente, en un soporte transparente con bajo índice de
refracción, preferentemente vidrio o un compuesto polimérico, y más preferentemente sustratos de vidrio (chips). En
una realización preferida de la invención, dicha superficie de pentóxido de tántalo se encontrará depositada sobre al
menos una de las caras de un soporte sólido, formando una capa de pocos nanómetros de espesor, preferentemente
entre 100 y 200 nm, y más preferentemente entre 130 y 170 nm.

Gracias a este procedimiento es posible la obtención de al menos una superficie de pentóxido de tántalo modificada
caracterizada por comprender al menos un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino, un grupo aldehído
y un grupo isocianato o isotiocianato.

Introducción de grupos tiol

De manera particular, en el caso de que se tenga interés en la introducción de grupos tiol en la superficie del pen-
tóxido de tántalo, el organosilano consistirá, preferentemente, en 3-mercaptopropil trietoxisilano. En una realización
preferida del procedimiento, la disolución comprenderá de 1 a un 4% de 3-mercaptopropil trietoxisilano y de un 2 a
un 5% de agua en una mezcla 0,05 a 0,25M de ácido acético en metanol.

De manera aún más preferida, la disolución comprenderá de 2 a un 3% de 3-mercaptopropil trietoxisilano y de un
3 a un 4% de agua en una mezcla 0,1 a 0,2M de ácido acético en metanol.

Una vez las superficies de pentóxido de tántalo hayan sido sumergidas en esta disolución durante un cierto tiempo,
preferentemente de 1 a 3 h, y más preferentemente 1,5 h, serán lavadas con metanol y se secarán, preferentemente con

aire a presión o mediante centrifugación. Las superficies de pentóxido de tántalo así tratadas estarán preparadas para la inmovilización de los receptores que comprendan grupos tiol en su estructura, mediante la formación de puentes disulfuro.

5 *Introducción de grupos amino, aldehído e isotiocianato*

A su vez, en una realización particular en la que interese introducir grupos amino y aldehído en las superficies de pentóxido de tántalo, se preparará una disolución en la que el organosilano consistirá, preferentemente, en trimetoxisililpropil etilendiamina.

En una realización preferida del procedimiento, la disolución comprenderá de 1 a un 4% de trimetoxisililpropil etilendiamina y de un 2 a un 5% de agua en una mezcla 0,05 a 0,25M de ácido acético en metanol.

De manera aún más preferida, la disolución comprenderá de 2 a un 3% de 3-mercaptopropil trietoxisilano y de un 3 a un 4% de agua en una mezcla 0,1 a 0,2M de ácido acético en metanol.

Una vez las superficies de pentóxido de tántalo hayan sido sumergidas en esta durante un cierto tiempo, preferentemente de 1 a 3 h, y más preferentemente 1,5 h, serán lavadas con metanol y se secarán, preferentemente mediante aire a presión.

En este caso, el procedimiento podrá comprender, asimismo una etapa adicional, posterior al secado, de tratamiento de las superficies de pentóxido de tántalo con una disolución que comprenda al menos un compuesto con al menos dos grupos aldehído, preferentemente glutaraldehído, o al menos dos grupos isotiocianato, preferentemente, p-fenilendiisotiocianato. En una realización especialmente preferida de la invención, esta disolución comprenderá de un 0,05 a un 1%, y más preferentemente de un 0,1 a un 0,5% de glutaraldehído en, preferentemente, una solución reguladora de fosfato salino, más preferentemente, PBS1x, aunque también podrá tratarse de una disolución de agua sin sales; o de un 0.5 a un 1% de p-fenilendiisotiocianato en un disolvente aprótico, preferentemente, en tolueno.

Asimismo, de manera preferente, este tratamiento se llevará a cabo durante un tiempo de 1,5 a 5 h, más preferentemente, durante 2 h. Finalmente, las superficies de pentóxido de tántalo así tratadas se lavarán con agua y se secarán, preferentemente, mediante aire a presión.

Introducción de grupos isocianato

Finalmente, en el caso de que se tenga interés en introducir grupos isocianato en las superficies de pentóxido de tántalo, se preparará una disolución en la que el organosilano consistirá, preferentemente, en 3-isocianatopropil trietoxisilano.

En una realización preferida del procedimiento, la disolución comprenderá de 1 a un 4% de 3-isocianatopropil trietoxisilano y de un 0,01 a un 0,1% de agua en un disolvente aprótico y preferentemente no polar, preferentemente seleccionado de un grupo que consiste en hexano, ciclohexano, tolueno y xileno.

De manera aún más preferida, la disolución comprenderá de 2 a un 3% de 3-isocianato propil trietoxisilano y un 0,01% de agua en hexano o ciclohexano.

Una vez las superficies de pentóxido de tántalo hayan sido sumergidas en esta disolución durante un tiempo de 1 a 3 h, preferentemente 1,5 h, serán lavadas con hexano o ciclohexano y se secarán, preferentemente, con aire a presión. Las superficies de pentóxido de tántalo así tratadas estarán listas para la inmovilización de receptores conteniendo grupos amino, mediante la formación de enlaces urea, caracterizados por ser enlaces muy estables y de larga duración.

De esta manera, gracias al procedimiento de la presente invención, es posible desarrollar protocolos de derivatización sencillos y rápidos, proporcionando superficies homogéneas que mantienen las propiedades ópticas y mecánicas del soporte o superficie derivatizada. Estas características son clave para su posterior aplicación, preferentemente, en dispositivos ópticos de detección basados en guías de onda y anclaje covalente de biomoléculas, de manera preferente, en el desarrollo de ensayos genómicos o proteómicos.

En una realización particular de la invención, dichas biomoléculas podrán tratarse de ácidos nucleicos de diferentes pesos moleculares, tanto monocatenarios, como bicatenarios conteniendo al menos un grupo amino o un grupo tiol. Estos ácidos nucleicos podrán ser inmovilizados mediante su unión covalente con al menos un grupo isotiocianato, isocianato, aldehído o tiol de la superficie de pentóxido de tántalo modificada.

Asimismo, en una realización particular adicional de la invención, dichas biomoléculas podrán consistir en proteínas o moléculas PNAs. En este caso, la inmovilización se producirá mediante la formación de enlaces covalentes entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de lisina de la proteína o bien mediante la formación de puentes disulfuro entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de cisteína de dicha proteína.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de la inmovilización de diferentes concentraciones (de 5-50 $\mu\text{g/ml}$) de GAR-Cy5 (anticuerpo de cabra contra conejo marcado con Cy5) sobre la superficie modificada y sobre controles, donde el *Assay* corresponde a la superficie modificada; el *Blank 1* a la superficie sin tratamiento; el *Blank 2* a la superficie sin amin-organosilano y el *Blank 3* a la superficie sin glutaraldehído.

La figura 2 representa la intensidad de emisión de fluorescencia para 5-50 $\mu\text{g/mL}$ GAR-Cy5 sobre la superficie modificada y sobre controles, donde *EI* corresponde a la superficie modificada, *C1* a la superficie sin tratamiento; *C2* a la superficie sin amin-organosilano y *C3* a la superficie sin glutaraldehído.

La figura 3 muestra los resultados de la inmovilización de GAR-Cy5 a diferentes concentraciones, sobre la superficie tratada con 3-isocianatopropiltriethoxisilano y sobre un control de la superficie sin tratar.

La figura 4 representa la intensidad de emisión de fluorescencia neta para concentraciones crecientes de GAR-Cy5, sobre la superficie modificada con isocianato y sobre un control de la superficie sin tratar.

La figura 5 muestra los resultados de la inmovilización de GAR-Cy5 a diferentes concentraciones sobre la superficie tratada con mercaptosilano y sobre un control de la superficie sin tratar.

La figura 6 representa la intensidad de emisión de fluorescencia neta para concentraciones crecientes de GAR-Cy5, sobre la superficie modificada con grupo tiol y sobre un control de la superficie sin tratar.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de inmovilización de la sonda de oligonucleótido sobre la superficie tratada con isocianato (a concentraciones de sonda de 1 y 5 μM).

La figura 8 muestra los resultados del ensayo de hibridación de la cadena complementaria a la sonda inmovilizada sobre la superficie tratada con isocianato (a concentraciones de sonda de 10 y 25 μM y a concentración de hibridación de 50 nM).

A continuación se recogen, a modo de ejemplo y con carácter no limitante, una serie de realizaciones particulares correspondientes a la presente invención.

En dichos ejemplos, la presencia de los grupos introducidos en la superficie de pentóxido de tántalo se comprobó empleando distintos ensayos de detección cualitativa en síntesis en fase sólida, así como técnicas de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTR) mediante reflectancia total atenuada (ATR) y medida del ángulo de contacto.

Ej. 1.

Introducción de grupos tiol

En este ejemplo, se procedió a preparar una disolución de 3-mercaptopropil triethoxisilano al 2,3% y agua al 3,7% en una mezcla 0,15M de ácido acético en metanol. A continuación se sumergieron en dicha disolución las superficies de pentóxido de tántalo depositadas sobre una de las caras de un soporte de sustratos de vidrio (chips) formando una capa de 150 nm de espesor. Al cabo de 1,5 h, los chips fueron lavados con metanol y se secaron con aire a presión.

Ej. 2.

Introducción de grupos amino y aldehydización

En este ejemplo, se procedió a preparar una disolución de trimetoxisililpropil etilendiamina al 2,3% y agua al 3,7% en una mezcla 0,15M de ácido acético en metanol. A continuación se sumergieron en dicha disolución las superficies de pentóxido de tántalo depositadas sobre una de las caras de un soporte de sustratos de vidrio (chips) formando una capa de 150 nm de espesor. Al cabo de 1,5 h, los chips fueron lavados con metanol y se secaron con aire a presión. Posteriormente, se trataron con una disolución al 0,1% de glutaraldehído en PBS1x, durante 2 horas. Finalmente, se lavaron con agua y se secaron con aire a presión.

Ej. 3.

Introducción de grupos isocianato

En este ejemplo, se procedió a preparar una disolución de 3-isocianato propil triethoxisilano al 2,3% y agua al 0,01% en hexano. A continuación se sumergieron en dicha disolución las superficies de pentóxido de tántalo depositadas sobre una de las caras de un soporte de sustratos de vidrio (chips) formando una capa de 150 nm de espesor. Al cabo de 1,5 h, los chips fueron lavados con metanol y se secaron con aire a presión.

Ej. 4.

Efectividad del procedimiento

Para demostrar la efectividad del procedimiento en el anclaje de bioreceptores, se realizaron los siguientes ensayos:

- Inmovilización de anticuerpo marcado con Cy5 y lectura de la fluorescencia resultante;
- Realización de inmunoensayos utilizando Cy5 como trazador;
- Inmovilización de oligonucleótidos marcados con Cy5 y registro de la señal de fluorescencia;
- Hibridaciones con sondas inmovilizadas a través del correspondiente grupo funcional y la diana marcada con Cy5 y lectura de la fluorescencia resultante.

Ej. 4.1.

Inmovilización de anticuerpos (I)

Con el material modificado con grupos isocianato se procedió a la inmovilización de anticuerpos de cabra contra conejo marcados con Cy5 (GAR-Cy5). Para ello se prepararon distintas diluciones de GAR-Cy5 (5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y se depositaron sobre la superficie tratada siguiendo el procedimiento descrito para la inmovilización de oligonucleótidos.

Tras 2 h de incubación en cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente, se lavó la superficie con PBS1x, se secó y se midió la fluorescencia con una cámara CCD, según se muestra en las figuras 3 y 4.

Ej. 4.2.

Inmovilización de anticuerpos (II)

La inmovilización de los anticuerpos se llevó a cabo sobre soportes modificados con 3-mercaptopropil trietoxisilano empleando un anticuerpo modificado con Cy5, mediante la reacción de formación de puentes disulfuro. Se procedió de manera similar a lo descrito para el ejemplo anterior, obteniéndose los resultados que se muestran en las figuras 5 y 6.

Ej. 4.3.

Inmovilización de oligonucleótidos aminados

Diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 μM) de un oligonucleótido aminado en 3' o 5' y marcado con Cy5 en 5' o 3' fueron depositadas sobre las superficies funcionalizadas con isocianato con ayuda de un robot de impresión. Se crearon matrices de 2x3 puntos, con un 90% de humedad ambiente, depositando aproximadamente 50 nL por punto. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente en cámara oscura y húmeda, los chips se lavaron con PBS1x, se secaron, y se leyó la fluorescencia con una cámara CCD.

Este mismo procedimiento se empleó sobre chips sin tratamiento químico y se comparó la fluorescencia obtenida en ambos casos, según se muestra en la figura 7.

Ej. 4.4.

Hibridación en chip

Empleando la metodología de inmovilización del ejemplo 4.1, se inmovilizó la sonda aminada a distintas concentraciones (1, 5, 10 y 25 μM) y tras bloquear con OVA 1% en PBS1x durante 30 minutos, se trató el chip con una disolución de hibridación (6xSSC, 0,6% SDS, 0,1% DNA esperma de salmón y 2% BSA) conteniendo distintas concentraciones de la cadena complementaria a la sonda inmovilizada, marcada con Cy5. Después de 2 h de incubación y los correspondientes lavados, se procedió a registrar la fluorescencia de la superficie, observándose eficacia en la hibridación para concentraciones de hasta 50 nM de la cadena complementaria, según se muestra en la figura 8.

Ej. 4.5.

Comparación de resultados

5 En todos los ejemplos anteriores se comprobó que el anclaje covalente de oligonucleótidos o anticuerpos proporciona mayor intensidad de fluorescencia y mejor relación señal/ruido que los oligonucleótidos anclados a la superficie mediante interacciones inespecíficas de control, según se muestra en la figura 1.

10 Por otro lado, la fluorescencia de fondo también resultó prácticamente inalterada tras el tratamiento químico, en relación a la fluorescencia de fondo de la superficie sin tratar, disminuyendo un 7,5% para el caso del isocianato, aumentando un 8% para el glutaraldehído y aumentando un 3,5% para el mercaptano, lo que demuestra la adecuación del procedimiento para el objeto de la invención.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de modificación de al menos una superficie de pentóxido de tántalo, **caracterizado** porque comprende, al menos, las siguientes etapas:
- a) la preparación de una disolución de al menos un organosilano seleccionado de un grupo que consiste en un organosilano que comprende en su estructura al menos un grupo tiol, trimetoxililpropil etilendiamina y 3-isocianatopropil trietoxisilano, donde cuando el organosilano consiste en 3-isocianatopropil trietoxisilano, la disolución comprende de un 1 a un 4% de 3-isocianatopropil trietoxisilano y de un 0,01 a un 0,1% de agua en un disolvente aprótico;
 - b) la introducción en dicha disolución de la superficie de pentóxido de tántalo hasta obtenerse la superficie de pentóxido de tántalo modificada;
 - c) el lavado y secado de dicha superficie de pentóxido de tántalo modificada;
- y donde, cuando el organosilano se trata de trimetoxililpropil etilendiamina, el procedimiento comprende una etapa adicional posterior al secado de tratamiento de la superficie de pentóxido de tántalo modificada con una disolución que comprende al menos un compuesto con al menos dos grupos isotiocianato.
2. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque la superficie de pentóxido de tántalo se encuentra depositada sobre al menos una cara de un soporte sólido.
3. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque el soporte sólido se trata de un soporte de vidrio.
4. Procedimiento, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el organosilano se trata de 3-mercaptopropil trietoxisilano.
5. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 4, **caracterizado** porque la disolución comprende de un 1 a un 4% de 3-mercaptopropil trietoxisilano y de un 2 a un 5% de agua en una mezcla 0,05 a 0,25M de ácido acético en metanol.
6. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque la disolución comprende de un 1 a un 4% de trimetoxililpropil etilendiamina y de un 2 a un 5% de agua en una mezcla 0,05 a 0,25M de ácido acético en metanol.
7. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado** porque la disolución que comprende al menos un compuesto con al menos dos grupos isocianato consiste en una disolución de un 0,5 a un 1% de p-fenilendiisotiocianato en un disolvente aprótico.
8. Superficie de pentóxido de tántalo modificada obtenible a partir de un procedimiento de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada de acuerdo a la reivindicación 8 para la realización de ensayos.
10. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada, de acuerdo a la reivindicación 9, donde dichos ensayos consisten en ensayos de hibridación.
11. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada, de acuerdo a la reivindicación 9, donde dichos ensayos consisten en inmunoensayos.
12. Método de inmovilización de al menos una sustancia sobre una superficie de pentóxido de tántalo modificada de acuerdo a la reivindicación 8.
13. Método, de acuerdo a la reivindicación 12, **caracterizado** porque dicha sustancia es un ácido nucleico.
14. Método, de acuerdo a la reivindicación 12, **caracterizado** porque dicha sustancia es una proteína.
15. Método, de acuerdo a la reivindicación 12, donde dicha superficie de pentóxido de tántalo modificada comprende al menos un grupo tiol.
16. Método, de acuerdo a la reivindicación 15, **caracterizado** porque la sustancia es un ácido nucleico cuya inmovilización se produce mediante la formación de enlaces covalentes entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un grupo tiol de dicho ácido nucleico.

ES 2 339 096 B2

17. Método, de acuerdo a la reivindicación 15, **caracterizado** porque la sustancia es una proteína cuya inmovilización se produce mediante la formación de puentes disulfuro entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de cisteína de dicha proteína.

5 18. Soporte **caracterizado** porque comprende al menos una superficie de pentóxido de tántalo modificada de acuerdo a la reivindicación 8.

10 19. Soporte, de acuerdo a la reivindicación 18, **caracterizado** porque la superficie de pentóxido de tántalo depositada se encuentra formando una capa de 100 a 200 nm de espesor.

20. Soporte, de acuerdo a una de las reivindicaciones 18 ó 19, **caracterizado** porque comprende, además, al menos una sustancia inmovilizada sobre dicho soporte.

15 21. Soporte, de acuerdo a la reivindicación 20, **caracterizado** porque dicha sustancia es una proteína o un ácido nucleico inmovilizada de manera biodisponible para el reconocimiento específico posterior de al menos un analito.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

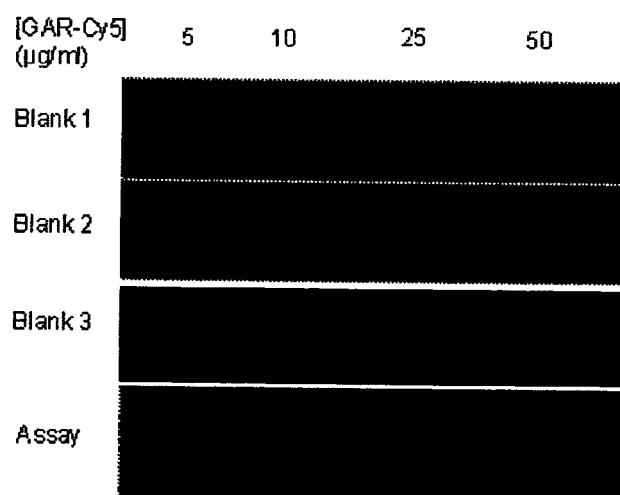


FIG. 1

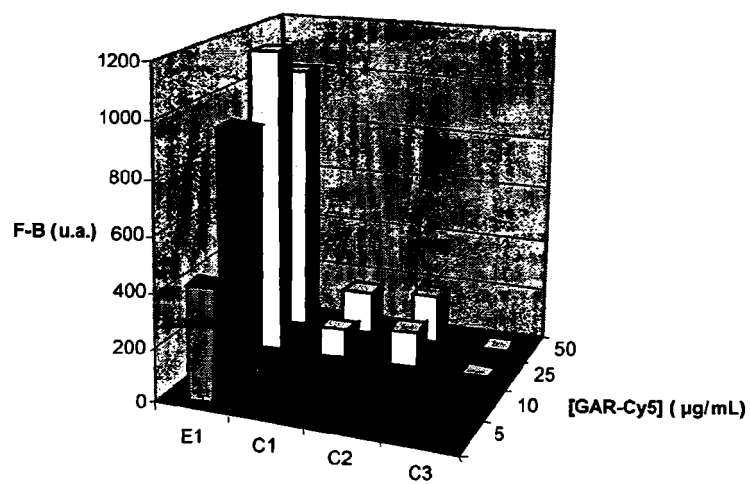


FIG. 2

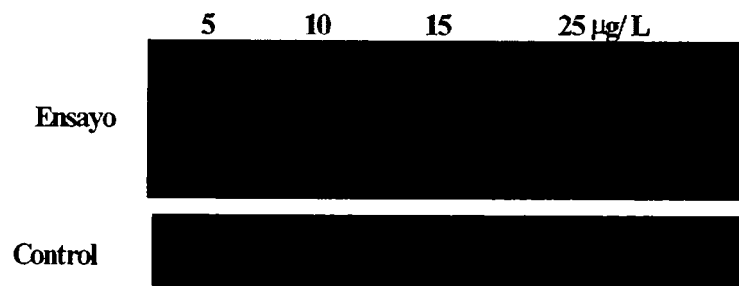


FIG. 3

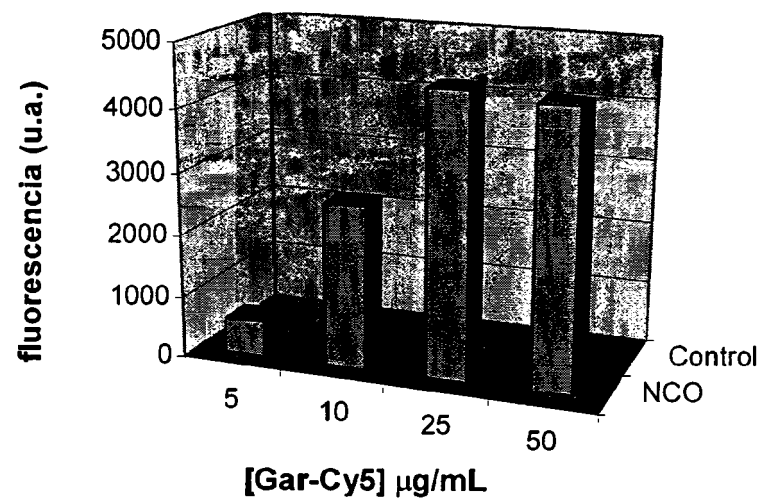


FIG. 4



FIG. 5

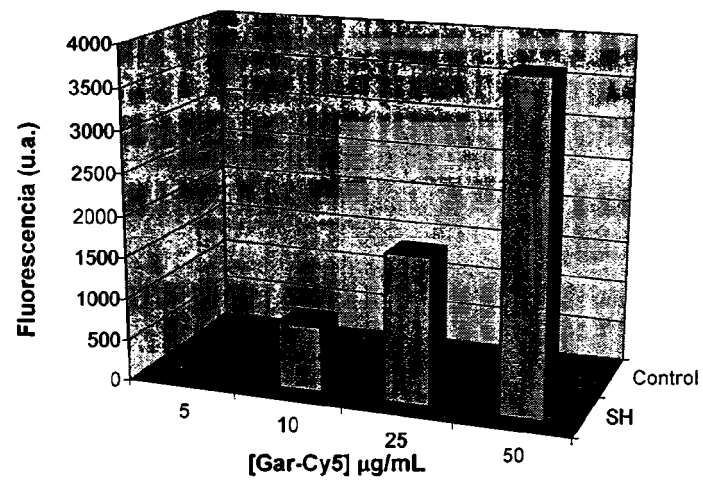


FIG. 6

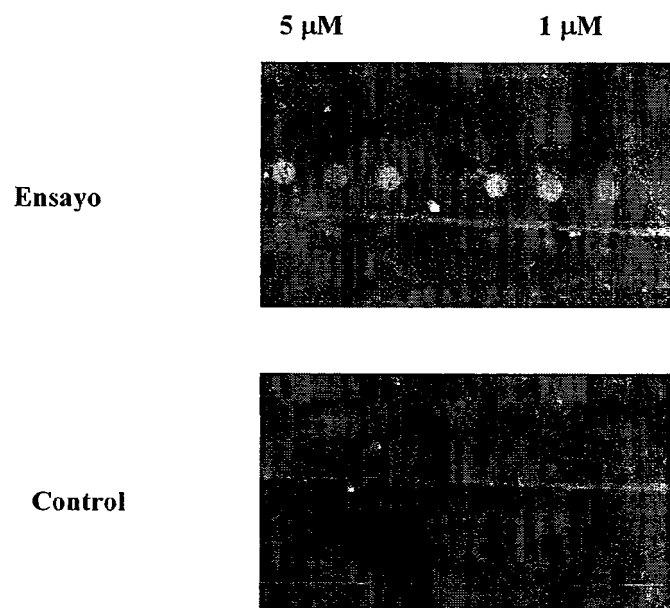


FIG. 7

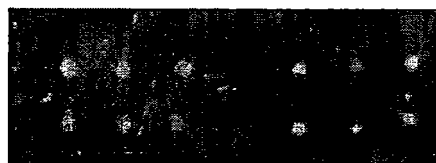


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 339 096

⑫ Nº de solicitud: 200902108

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.11.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/552** (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	POLZIUS, R. et al. "Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides" Biosensors & Bioelectronics. 1996. Vol. 5 N° 5 páginas 503 apartados Introduction, Experimental Setup, Assay procedure y Fig 4.	1-3,8-11, 16-20, 514; 26-29
X	KREMER, F.J.B. et al. "Immobilization and activity of Concanavalin A on tantalum pentoxide and silicon dioxide surfaces " Sensors and Actuators B: Chemical. Mayo 1993. Vol. 13, N° 1-3, páginas 1-488; apartado 2.1.	1-3,8-11, 16-18, 26-29
X	MÜLLER, R. et al. "Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility" Biosensors. Diciembre 2005. Vol. 26 N° 34, páginas 6962-6972; apartados 1, 2.1-2.4.	1,2,8,12- 16,20, 26-29
X	SCHMITT, R. et al. "Evanescent field Sensors Based on Tantalum Pentoxide Waveguides - A Review" Sensors 28-02-2008 Vol. 8, páginas 711-738; apartado 3.	16-20, 26-29

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

30.04.2010

Examinador

V. Balmaseda Valencia

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,XPESP,NPL,HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-7,21-25	SÍ
	Reivindicaciones	1-3,8-16-20,26-29	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-7,21-25	SÍ
	Reivindicaciones	1-3,8-16-20,26-29	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	Biosensors & Bioelectronics Vol.5 N°5 páginas 503-514.	1996
D02	Sensors and Actuators B: Chemical. Volumen 13, N° 1-3	May 1993
D03	Biosensors. Vol.26 N°34, páginas 6962-6972	Dic-2005
D04	Sensors Vol.8, páginas 711-738	28-02-08

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

El objeto de la presente invención es un procedimiento de modificación química de una superficie de pentóxido de tantalio, la superficie resultante, el uso de dicha superficie para la realización de ensayos, un método de inmovilización de sustancias sobre la misma y el soporte resultante de la inmovilización de dichas sustancias.

En el documento D01 se realiza un estudio comparativo de distintos métodos de inmovilización de biomoléculas sobre inmuno-sensores basados en la onda evanescente (grating couplers) que utilizan guías de onda de pentóxido de tantalio. Uno de ellos comprende la silanización con aminopropiltrietoxisilano de una superficie de pentóxido de tantalio (con espesor de 160nm) depositado sobre un soporte de vidrio. A continuación, el tratamiento de la superficie de pentóxido de tantalio modificada con una disolución de glutaraldehído (2v/v) en una disolución reguladora de fosfato salino y finalmente la inmovilización de la proteína G a través de los grupos aldehído (apartados Introduction, Experimental Setup, Assay procedure y Fig 4).

En el documento D02 se estudia la inmovilización y actividad de Concanavalina A sobre superficies de pentóxido de tantalio y dióxido silicio. Dicha inmovilización comprende el tratamiento de una superficie de pentóxido de tantalio (depositado sobre una oblea de silicio) con una solución al 10% de gamma-aminopropiltrietoxisilano en tolueno a 80°C durante 4 horas, el lavado con metiletilcetona, la derivatización de los grupos amino con una solución de glutaraldehído al 2.5% durante media hora y, finalmente, la inmovilización de la Concanavalina A (apartado 2.1).

El documento D03, relativo a la inmovilización del colágeno sobre superficies de acero inoxidable, describe el recubrimiento de una oblea de silicio con pentóxido de tantalio formando una capa con un espesor de 100nm, la silanización de la superficie resultante bien con aminopropiltrietoxisilano o bien con isocianotopropiltrietoxisilano en tolueno y atmósfera de argón y, por último, la inmovilización del colágeno sobre la misma (apartados 2.1-2.4).

En el documento D04 se realiza un resumen de los distintos sensores de campo evanescente basados en guías de onda de pentóxido de tantalio dadas sus altas prestaciones para la detección de biomoléculas. Así mismo, destaca la importancia de optimizar las propiedades de la superficie de pentóxido de tantalio dependiendo de la biomolécula a analizar (mediante, por ejemplo, la silanización de la superficie de pentóxido de tantalio con 3-aminopropiltietoxisilano o 4-aminobutildimetilettoxisilano) para su aplicación en ensayos tales como hibridación e inmunoensayos (apartado 3).

Así por tanto, las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 1-3, 8-20 y 26-29 derivan, directamente y sin equívoco, de los documentos D01-D04. En consecuencia, se considera que dichas reivindicaciones carecen de novedad y actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 de L.P.).

La diferencia entre las reivindicaciones 4-7 y 21-25 radica en que ninguno de los documentos citados D01-D04 describe un procedimiento de modificación de superficies de pentóxido de tantalio con 3-mercaptopropiltrietoxisilano o trimetoxisililpropil etilendiamina que permita la inmovilización de ácidos nucleicos (a través de un enlace covalente con un grupo amino del ácido nucleico) o proteínas (bien a través de enlace covalente con un residuo de lisina de dicha proteína o bien a través de la formación de puentes disulfuro con un residuo de cisteína de dicha proteína). De este modo, se consigue una mayor intensidad de fluorescencia y una mejor relación señal ruido de la sustancia inmovilizada.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 4-7 y 21-25 son nuevas e implican actividad inventiva conforme a los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.