

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de mayo de 2011 (12.05.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/054992 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/552 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070709

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de noviembre de 2010 (04.11.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200902108
4 de noviembre de 2009 (04.11.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT - Edificio 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BAÑULS POLO, Maria Jose** [ES/ES]; Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **GONZÁLEZ PEDRO, Maria Victoria** [ES/ES]; Puebla de Valverde 2-20, E-46014 Valencia (ES). **MAQUIEIRA CATALA, Angel** [ES/ES]; Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **PUCHADES PLA, Rosa** [ES/ES]; Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR THE CHEMICAL MODIFICATION OF TANTALUM PENTOXIDE SURFACES

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE MODIFICACIÓN QUÍMICA DE SUPERFICIES DE PENTÓXIDO DE TÁNTALO

(57) Abstract: The present invention relates to a novel method for the modification of at least one tantalum pentoxide surface, characterized in that said method comprises, at least, the following steps: a) the preparation of a solution of at least one organosilane that comprises in the structure thereof at least one group selected from a thiol group, a primary or secondary amino group and an isocyanate or isothiocyanate group; b) the placing of the tantalum pentoxide surface in said solution until the tantalum pentoxide surface is modified. A further subject of the present invention will be the use of said modified tantalum pentoxide surfaces preferably in waveguide-based optical detection devices and covalent biomolecule anchoring devices.

(57) Resumen: 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.



WO 2011/054992 A1

- 1 -

**Procedimiento de modificación química de superficies de
pentóxido de tántalo**

CAMPO TÉCNICO

5 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
10 ácidos nucleicos o proteínas, con aplicación en el desarrollo de técnicas de detección basadas en guías de onda ópticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 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.

20 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
25 (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.

30 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
35 mediante fluorescencia o colorimetría y, en menor medida, por espectroscopía de masas, utilizando para ello

- 2 -

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 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.

35 Hasta el momento, la mayor parte de las modificaciones químicas de óxidos metálicos que se han llevado a cabo se

- 3 -

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
5 (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
10 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-
15 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
20 superficies de óxidos, entre las que cabe citar: ácidos hidroxámicos 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.*
25 *Soc.*, **1997**, *119*, 259); ácidos fosfónicos sobre mica (Woodward, J. T., et al., *Langmuir*, **1996**, *12*, 3626), óxidos de circonio, titanio o silicio circonizado (Gao, W., et al., *Langmuir*, **1996**, *12*, 6429) y óxido de silicio (Midwood, K. S., et al., *Langmuir*, **2004**, *20*, 5501-5505).

30 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 alcan-fosfatos y alcan-fosfonatos ω -sustituidos, que han demostrado ser compuestos muy efectivos para la
35 formación de SAMs sobre superficies de óxidos de metales de transición como óxido de titanio (Tosatti, S. et al,

- 4 -

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 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
10 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
15 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 pentóxido de tántalo con organosilanos, que permita la
20 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
30 número de etapas necesarias para conseguir la inmovilización del receptor.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo
35 procedimiento para la modificación de al menos una

- 5 -

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 200nm, y más preferentemente entre 130 y 170nm.

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 pentóxido 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

- 6 -

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
5 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 3h, y más preferentemente
10 1,5h, 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,
15 mediante la formación de puentes disulfuro.

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
20 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
25 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
30 metanol.

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

- 7 -

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 5h, más preferentemente, durante 2h. Finalmente, las superficies de pentóxido de tántalo así tratadas se lavarán con agua y se secarán, preferentemente, mediante aire a presión.

20

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.

35

- 8 -

Una vez las superficies de pentóxido de tántalo hayan sido sumergidas en esta disolución durante un tiempo de 1 a 3h, preferentemente 1,5h, 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.

10

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.

20

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.

25

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

30

35

- 9 -

pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de cisteína de dicha proteína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La **figura 1** muestra los resultados de la inmovilización de diferentes concentraciones (de 5-50 µg/ml) de GAR-Cy5 (anticuerpo de cabra contra conejo marcado con Cy5) sobre la superficie modificada y sobre controles, donde el Assay
10 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 µg/mL GAR-Cy5 sobre la superficie
15 modificada y sobre controles, donde *E1* 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
20 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-
25 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
30 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.

35 La **figura 7** muestra los resultados del ensayo de inmovilización de la sonda de oligonucleótido sobre la

- 10 -

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 espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FITR) 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 trietoxisilano 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 150nm de espesor. Al cabo de 1,5h, los chips fueron lavados con metanol y se secaron con aire a presión.

30

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

- 11 -

de las caras de un soporte de sustratos de vidrio (chips) formando una capa de 150nm de espesor. Al cabo de 1,5h, 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 trietoxisilano 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 150nm de espesor. Al cabo de 1,5h, 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

- 12 -

distintas diluciones de GAR-Cy5 (5, 10, 25 y 50 µg/mL) y se depositaron sobre la superficie tratada siguiendo el procedimiento descrito para la inmovilización de oligonucleótidos.

5 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.

10 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
15 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

20 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
25 ambiente, depositando aproximadamente 50nL por punto. Tras 2h 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
30 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
35 4.1, se inmovilizó la sonda aminada a distintas concentraciones (1, 5, 10 y 25 µM) y tras bloquear con OVA

- 13 -

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 2h 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.

10

Ej. 4.5.- Comparación de resultados

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.

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.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de modificación de al menos una superficie de pentóxido de tántalo, caracterizado porque
5 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
10 isotiocianato;
- b) la introducción en dicha disolución de la superficie de pentóxido de tántalo hasta obtenerse la superficie de pentóxido de tántalo modificada.
- 15 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.
- 20 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
25 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
30 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 una cualquiera de las
35 reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el

- 15 -

organosilano se trata de trimetoxisililpropil etilendiamina.

7. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 6,
5 caracterizado porque la disolución comprende de un 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.

10 8. Procedimiento, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende una etapa posterior de lavado, seguida de una etapa adicional de secado.

15 9. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 8, caracterizado porque cuando el organosilano comprende al menos un grupo amino primario o secundario, dicho procedimiento comprende una etapa adicional, posterior al secado, de tratamiento de la superficie de pentóxido de
20 tántalo modificada con una disolución que comprende al menos un compuesto con al menos dos grupos aldehído o al menos dos grupos isotiocianato.

10. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 9,
25 caracterizado porque la disolución comprende de un 0,05 a un 1% de glutaraldehído en una solución reguladora de fosfato salino; o de un 0,5 a un 1% de p-fenilendiisotiocianato en un disolvente aprótico.

30 11. Procedimiento, de acuerdo a una de las reivindicaciones 9 ó 10, caracterizado porque dicho tratamiento se lleva a cabo durante un tiempo de 1 a 5 horas, tiempo tras el cual la superficie de pentóxido de tántalo es lavada y secada.

- 16 -

12. Procedimiento, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el organosilano se trata de 3-isocianatopropil trietoxisilano.
- 5 13. Procedimiento, de acuerdo a la reivindicación 12, caracterizado porque la disolución comprende una disolución 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.
- 10 14. Procedimiento, de acuerdo a las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado porque comprende una etapa posterior de lavado con hexano, seguida de una etapa adicional de secado.
- 15 15. Procedimiento, de acuerdo a las reivindicaciones 8 ó 14, caracterizado porque el secado se lleva a cabo mediante aire a presión.
- 20 16. Superficie de pentóxido de tántalo modificada caracterizada porque comprende al menos un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino, un grupo aldehído y un grupo isocianato o isotiocianato.
- 25 17. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada caracterizada porque comprende al menos un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino, un grupo aldehído y un grupo isocianato o isotiocianato, para la realización de ensayos.
- 30 18. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada, de acuerdo a la reivindicación 17, donde dichos ensayos se tratan de ensayos de hibridación.
- 35 19. Uso de una superficie de pentóxido de tántalo modificada, de acuerdo a la reivindicación 17, donde dichos ensayos se tratan de inmunoensayos.

- 17 -

20. Método de inmovilización de al menos una sustancia sobre una superficie de pentóxido de tántalo modificada caracterizada porque dicha superficie comprende al menos un
5 grupo seleccionado entre un grupo amino, un grupo aldehído y un grupo isocianato o isotiocianato.

21. Método, de acuerdo a la reivindicación 20, caracterizado porque dicha sustancia es un ácido nucleico
10 cuya inmovilización se produce mediante la formación de enlaces covalente entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un grupo amino de dicho ácido nucleico.

15 22. Método, de acuerdo a la reivindicación 20, caracterizado porque la sustancia es una proteína cuya inmovilización se produce mediante la formación de enlaces covalente entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de lisina de dicha
20 proteína.

23. Método de inmovilización de al menos una sustancia sobre una superficie de pentóxido de tántalo modificada caracterizada porque dicha superficie comprende al menos un
25 grupo tiol.

24. Método, de acuerdo a la reivindicación 23, caracterizado porque la sustancia es un ácido nucleico cuya inmovilización se produce mediante la formación de enlaces
30 covalentes entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un grupo tiol de dicho ácido nucleico.

25. Método, de acuerdo a la reivindicación 24, caracterizado porque la sustancia es una proteína cuya inmovilización se produce mediante la formación de puentes

- 18 -

disulfuro entre la superficie de pentóxido de tántalo modificada y al menos un residuo de cisteína de dicha proteína.

- 5 26. Soporte caracterizado porque comprende al menos una superficie de pentóxido de tántalo modificada, donde dicha superficie comprende al menos un grupo seleccionado entre un grupo tiol, un grupo amino, un grupo aldehído y un grupo isocianato o isotiocianato.
- 10 27. Soporte, de acuerdo a la reivindicación 26, caracterizado porque la superficie de pentóxido de tántalo depositada se encuentra formando una capa de 100 a 200nm de espesor.
- 15 28. Soporte, de acuerdo a una de las reivindicaciones 26 ó 27, caracterizado porque comprende, además, al menos una sustancia inmovilizada sobre dicho soporte.
- 20 29. Soporte, de acuerdo a la reivindicación 28, caracterizado porque dicha sustancia es una proteína o un ácido nucleico.

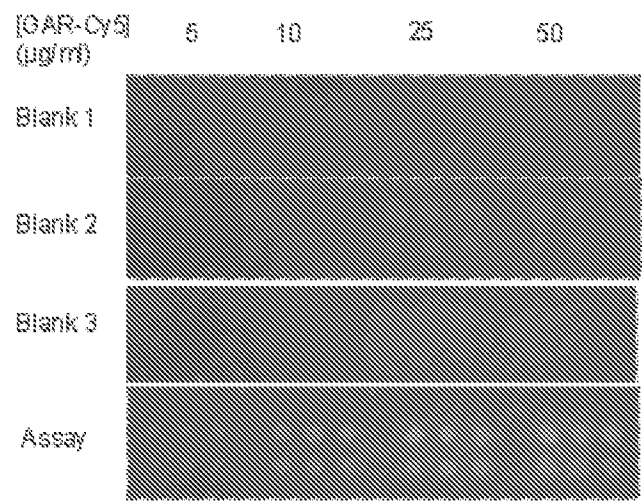


FIG. 1

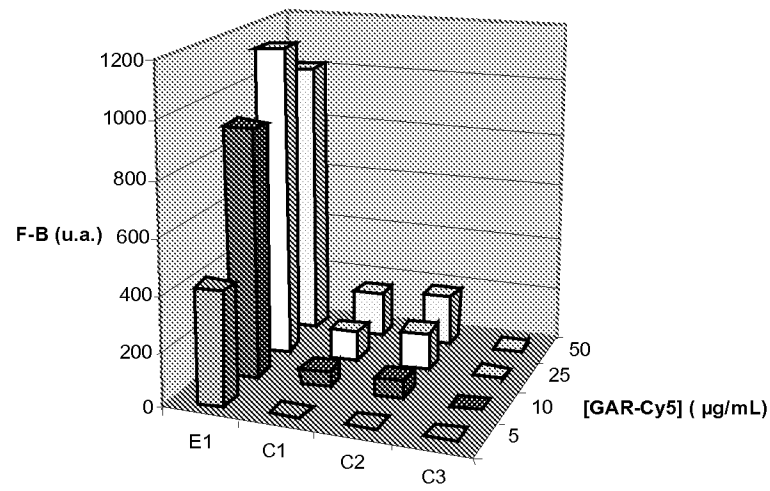


FIG. 2

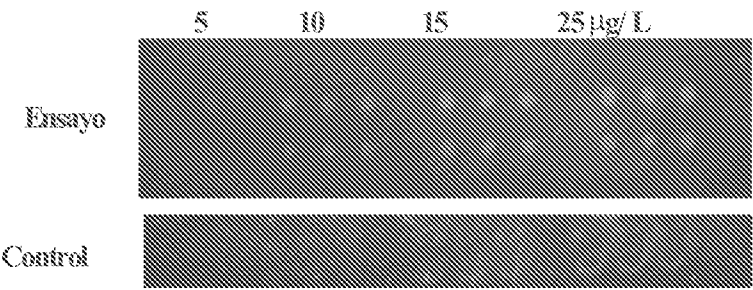


FIG. 3

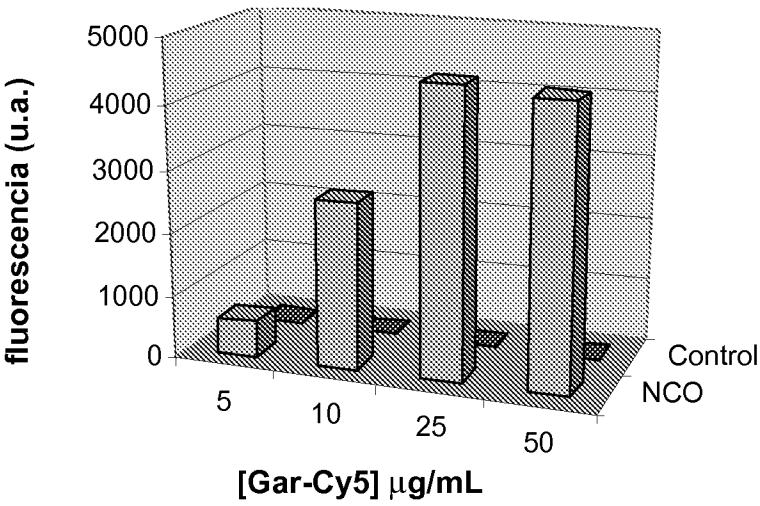


FIG. 4

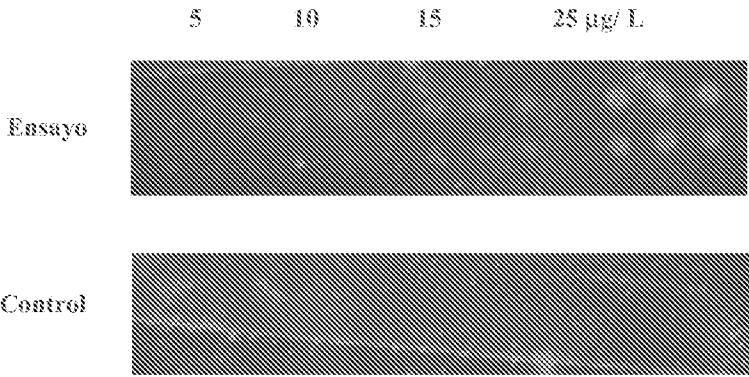


FIG. 5

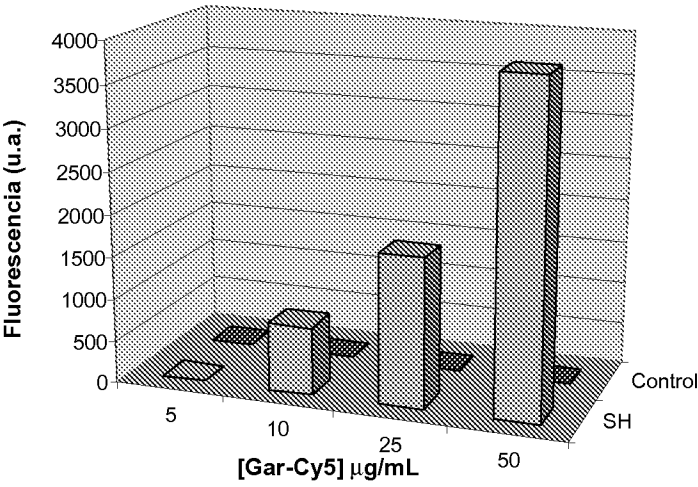


FIG. 6

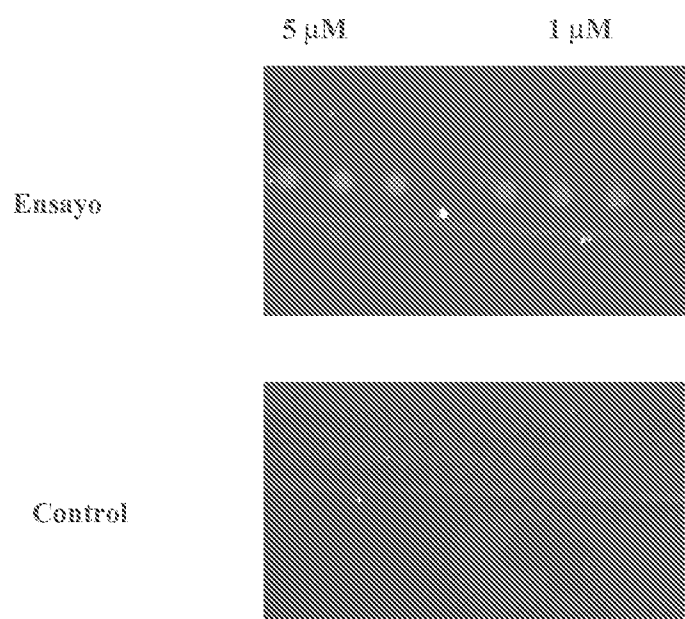


FIG. 7



FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2010/070709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/552 (01.01.2006)

G01N33/553 (01.01.2006)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, NPL, CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POLZIUS,R. ET AL. "Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides" Biosensors & Bioelectronics. 1996. Vol.5 N°5 pages 503-514; paragraphs Introduction, Experimental Setup, Assay procedure and Fig 4.	1-3,8-11,16-20,26-29
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. May 1993. Vol.13, N° 1-3, pages 1-488; paragraph 2.1	1-3,8-11,16-20,26-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18/01/2011

Date of mailing of the international search report
(15/03/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
V. Balmaseda Valencia

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493048

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2010/070709

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MÜLLER, R. ET AL. "Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility" Biosensors. December 2005. Vol.26 N°34, pages 6962-6972; paragraphs 1, 2.1-2.4.	1,2,812-16,20,26-29
X	SCHMITT, R. ET AL. "Evanescent field Sensors Based on Tantalum Pentoxide Waveguides - A Review" Sensors 28-02-2008 Vol.8, pages 711-738; paragraph 3.	19-20,26-29

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2010/070709

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/552 (01.01.2006)

G01N33/553 (01.01.2006)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP, NPL, CAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	POLZIUS,R. ET AL. "Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides" Biosensors & Bioelectronics. 1996. Vol.5 Nº5 páginas 503-514; apartados Introduction, Experimental Setup, Assay procedure y Fig 4.	1-3,8-11,16-20,26-29
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, Nº 1-3, páginas 1-488; apartado 2.1	1-3,8-11,16-20,26-29

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
18/01/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15 de marzo de 2011 (15/03/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
V. Balmaseda Valencia

Nº de teléfono 91 3493048

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2010/070709

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
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.	1,2,812-16,20,26-29
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.	19-20,26-29