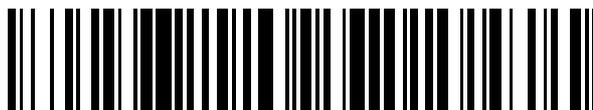


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 549**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2007** **E 07708571 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 1982184**

54 Título: **Composición de sol para biochip de sol-gel para inmovilizar una sonda sobre un sustrato sin tratamiento de la superficie y método para su rastreo**

30 Prioridad:

27.01.2006 KR 20060008926

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

23.05.2014

73 Titular/es:

KIM, SO YOUN (100.0%)
111-804 Yeoksam Purgio Apt., 754- 1
Yeoksam-2dong Gangnam-gu
Seoul 135-082, KR

72 Inventor/es:

KIM, SO YOUN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 462 549 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de sol para biochip de sol-gel para inmovilizar una sonda sobre un sustrato sin tratamiento de la superficie y método para su rastreo.

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método para el rastreo de una composición de sol para los biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de elevado peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, al uso de una composición de sol rastreada por dicho método, y a un biochip de sol-gel que comprende dicha composición de sol inmovilizado sobre el mismo.

10

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

15

El biochip es un ejemplo representativo de la nueva tecnología que combina tecnología de materiales tal como la nanotecnología (NT), la biotecnología (BT), que es contenido y campo aplicado de la tecnología de materiales y la tecnología de información (IT) para analizar una gran cantidad de resultados. El biochip se forma sometiendo a micromatrices de alta densidad diversos tipos de biomateriales sobre una unidad de área de una superficie de un soporte sólido. Las tecnologías de biochips incluyen una tecnología para inmovilizar biomateriales, una tecnología para hacer biocompatible a la superficie del chip, la tecnología de micromatrices de biomateriales, una tecnología de ensayo para llevar a cabo diversas reacciones biológicas en un chip producido, una tecnología para detectar los resultados de la reacción, una ingeniería de proteínas para producir biomateriales a ser inmovilizados y la tecnología de recombinación genética.

20

25

Un chip de proteína representativo de los biochips se forma sometiendo intensamente a micromatrices diversas proteínas en una unidad de área de la superficie de un soporte sólido. Al utilizar el chip de proteína, es posible llevar a cabo un experimento para múltiples propósitos, tales como el diagnóstico de enfermedades, rastreo de alto rendimiento (HTS – siglas en inglés), ensayo de la actividad enzimática y similares, con una pequeña cantidad de muestras.

30

Ha habido intentos de producir el chip de proteína empleando los mismos principios y factores técnicos que en la producción de chips de ADN, que ya han sido desarrollados y utilizados comúnmente. En general, la mayoría de los chips de ADN comúnmente utilizados se producen inmovilizando ADN en un sustrato de vidrio, cuya superficie ha sido tratada previamente con un material de revestimiento. Cuando el chip de proteína se fabrica de acuerdo con un método similar al utilizado en la producción de chips de ADN, es decir, cuando el chip de proteína se fabrica inmovilizando proteínas sobre un sustrato de vidrio cuya superficie ha sido tratada previamente con un material de revestimiento, es probable que se produzcan diversos problemas debido a la diferencia en las propiedades físicas y químicas entre las proteínas diana a ser inmovilizadas.

35

40

Chip de proteína previo se produjo por la inmovilización de proteínas sobre un sustrato de vidrio tratado en superficie y se utilizó para llevar a cabo un simple ensayo de unión. El comportamiento del chip de proteína se determinó por la actividad de la proteína inmovilizada y era difícil trabajar con éxito (MacBeath y Schreiber, *Science* 289:1760, 2000). Tales problemas son provocados por la desnaturalización, inactivación y degradación de las proteínas que resultan de la diferencia en las propiedades físicas y químicas inherentes de proteínas.

45

Con el fin de resolver estos problemas, se han realizado investigaciones y estudios en la tecnología de tratamiento en superficie para la inmovilización de proteínas adecuadas para las características de proteínas que se distinguen de las de ADN y en materiales para la inmovilización de proteínas. Tal investigación y estudios se centran en un método para realizar la inmovilización en la superficie de un chip de proteína al tiempo que se mantiene la actividad de la proteína. Ejemplos de los mismos incluyen un portaobjetos recubierto con hidrogel (PerkinElmer), chip Versalinx (ProLinx), chip PDC, que es un biochip disponible comercialmente de Zyomyx, etc.

50

En particular, el portaobjetos recubierto con hidrogel es una tecnología que utiliza un gel de poli(acrilamida) tridimensional, en el que un vidrio suizo con una superficie ópticamente nivelada, tratada con silano, se utiliza como un material de base y sobre el mismo se aplica un polímero de acrilamida modificado en la superficie para mejorar la fuerza de unión y la estabilidad estructural de una proteína. En este caso, la proteína se inmoviliza mediante un enlace covalente con un grupo funcional de gel de poli(acrilamida). También, el chip Versalinx de ProLinx comprende una monocapa de auto-ensamblaje de poli(L-lisina)-g-poli(etilenglicol) formada sobre una de TiO₃, en el que una proteína se inmoviliza sobre la superficie monoestratificada de auto-ensamblaje, con lo cual se puede mejorar la actividad de la proteína. Estos métodos forman una micro-estructura tridimensional e inmovilizan covalentemente proteínas sobre una superficie modificada a fin de mantener las actividades de las proteínas dentro de

55

60

manchas. Además de estos métodos, también es posible hacer un tipo de chips de micro-pocillos mediante microprocesamiento para producir chips en estado de disolución. En Loh, Med. Device Technol. 10(1): 24-30, 1999 se revisan las capacidades y aplicaciones de la modificación de la superficie del plasma en aplicaciones biomédicas.

5 Mientras tanto, un proceso de sol-gel es una tecnología que se ha utilizado para hacer una micro-estructura por microprocesamiento, y, en particular, es una tecnología constituida por formar una red de unión por un proceso suave e inmovilizar biomoléculas dentro de la red de unión por métodos distintos a un enlace covalente, en lugar de fijar químicamente las biomoléculas a un material inorgánico (Gill, I. y Ballesteros, A., *Trends Biotechnol.*, 18:282, 2000). Biomoléculas, incluidas enzimas, se inmovilizan en una matriz de sol-gel sólida para uso en la producción de biocatalizadores o biosensores (Reetz *et al.*, *Adv. Mater.*, 9:943, 1997). Especialmente, la matriz de sol-gel también se utiliza en la detección del desarrollo de color óptico debido a su transparencia y propiedad óptica (Edminston *et al.*, *J. Coll. Interf. Sci.*, 163:395, 1994). También, se sabe que las biomoléculas no sólo son químicamente estabilizadas, sino también térmicamente estabilizadas cuando se inmovilizan sobre una matriz de sol-gel (Dave *et al.*, *Anal. Chem.*, 66:1120, 1994).

15 El documento WO 2004/099776 describe un soporte de biochip, que consiste en un sustrato que porta al menos una capa porosa de material en una primera cara, en donde la capa está prevista para asegurar la fijación de moléculas biológicas sobre y en el interior de dicha capa, y en donde la capa es una capa delgada de material óptica, preparada mediante un proceso de sol-gel, y un método de injertar moléculas biológicas en la superficie y en el interior de la capa delgada de material preparada por el proceso de sol-gel en la primera cara del soporte de biochip. El documento WO 2004/092250 describe un material biocompatible que comprende una composición obtenida al hidrolizar un compuesto de silicio monomérico que tiene al menos un grupo hidrolizable o condensable fijado al átomo de silicio del compuesto con otro compuesto monomérico que tiene al menos un grupo químicamente reactivo fijado al átomo de metal o metaloide del compuesto para formar un material compuesto de siloxano híbrido; y el uso del material biocompatible en un dispositivo sensor tal como un biosensor o biochip.

20 En el caso del biosensor, la reacción sol-gel se utiliza como un método de modelar mediante la formación de una micro-estructura sobre un soporte sólido, así como para la simple inmovilización. En esta memoria, el método de modelar incluye conformar un sol en estado líquido utilizando un molde mediante la dinámica de fluidos, gelatinizar el material conformado y separar el molde para formar un modelo. Por ejemplo, una tecnología designada como tecnología de micro-modelación en capilares (MIMIC – siglas en inglés) es para modelar de sílice mesoscópica (Kim *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.* 82:239, 1995; Marzolin *et al.*, *Adv. Mater.* 10: 571, 1998; Schuller *et al.*, *Appl. Optics* 38:5799, 1999).. Esta tecnología se puede utilizar en la modelación básica de la ingeniería de micro-fluidos.

35 Sin embargo, puesto que la actividad de la proteína puede verse afectada por diversos factores tales como el pH, es importante establecer las condiciones para el mantenimiento de la actividad mediante la adición de proteína a partir de su estado de sol en el proceso de sol-gel. Para este propósito, se proponen tecnologías para modelar una proteína mezclando previamente la proteína con un sol usando diversas condiciones suaves tales como pH neutro (Kim *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 73:331 a 337, 2001), pero existen problemas, debido a que el proceso de sol-gel progresa rápidamente a pH neutro para formar un gel y pueden producirse grietas o el gel se vuelve opaco, de acuerdo con la elección de los aditivos.

45 Para superar los problemas descritos anteriormente, los autores de esta invención desarrollaron previamente un biochip usando una reacción de sol-gel (patente coreana abierta a inspección publicación Nº 10-2004-0024510). Específicamente, en la técnica anterior, dado que no existía tecnología mediante la cual se pudiera inmovilizar una matriz de sol-gel que contiene biomateriales, incluidas proteínas, sobre un sustrato de chip en forma de manchas, no existía biochip alguno en el que una matriz de sol-gel que tiene biomateriales inmovilizados sobre el mismo se integrara en forma de manchas. En la patente anterior, se desarrolló una tecnología de tratamiento de la superficie de un sustrato de chip con un material de revestimiento especial y, por lo tanto, por vez primera se pudo preparar un biochip empleando una reacción de sol-gel sobre el sustrato del chip. Mediante la tecnología de tratamiento de la superficie del sustrato de chip de acuerdo con la patente anterior, una mezcla de sol que contiene biomateriales puede ser integrada en el sustrato del chip en forma de manchas, una reacción de sol-gel para gelificar la mezcla de sol se puede producir sobre el sustrato de chip, y las matrices de sol-gel pueden ser inmovilizadas sobre el sustrato de chip. En particular, en la patente anterior, a diferencia de los biochips anteriores que tienen biomateriales inmovilizados sobre la superficie del sustrato de chip por enlaces covalentes, se desarrolló un biochip que comprende biomateriales atrapados y encapsulados en los poros de manchas de tipo gel, que se integran y se inmovilizan sobre un sustrato de chip.

60 Sin embargo, en el caso de este biochip, con el fin de inmovilizar las manchas de gel que contiene biomaterial sobre el sustrato, la superficie del sustrato debería ser tratada con un agente de revestimiento tal como poli(acetato de vinilo), y la mezcla de sol debería ser manchada sobre el sustrato tratado en superficie. Por lo tanto, este biochip es desventajoso en términos de coste o de producción en masa y tiene una limitación debido a que no se puede

aplicar a biochips que tienen una superficie o forma que no puede ser revestida.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han hecho muchos esfuerzos para encontrar una composición de material para su uso en la encapsulación de sol-gel, que pueda unirse fuertemente a un sustrato que no se sometió a tratamiento superficial esencial para el uso comercial de los biochips. Como resultado, los autores de la presente invención han diseñado un método eficaz para el rastreo de una composición de sol y encontraron una composición de sol que se puede unir fuertemente a una superficie del sustrato y, por lo tanto, puede soportar un lavado intenso durante el proceso de análisis de biochips y, al mismo tiempo, puede proporcionar buenos resultados de ensayo, completando así la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de una composición de sol para sustratos de PMMA o sustratos de oro o sustratos de obleas de silicio, rastreados por dicho método, así como un biochip de sol-gel que comprende dicha composición de sol inmovilizada sobre el mismo.

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener un primer banco de composiciones de sol en el que al menos un monómero de silicato, seleccionado del grupo que consiste en ortosilicato de tetrametilo (TMOS), metiltrimetoxisilano (MTMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), etiltrimetoxisilano (ETrEOS), trimetoxisilano (TMS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS) y trimetoxisilicato de 3-aminopropilo (3-ATMS), y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en silicato de poliglicerilo (PGS), digliceril-silano (DGS), 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMOS), uretano óxido de (N-trietoxisililpropil)-O-poliétileno (PEOU), glicerol y polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular de 100-10.000, se mezclan uno con otro en tampón a diversas relaciones; (b) salpicar el primer banco de composiciones de sol sobre un sustrato diana que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico; (c) medir la adherencia, el aspecto, la transmitancia y el tiempo de gelificación de las manchas formadas en la etapa (b), y seleccionar, en base a los resultados de la medición, composiciones, que no muestran el desprendimiento de manchas, incluso cuando se raspan con una punta después del lavado, tienen un diámetro de la mancha de 100-800 μm , al tiempo que mantienen una forma circular, muestran una autofluorescencia menor que la fluorescencia de fondo, y tienen un tiempo de gelificación de 4-48 horas en un tubo y un tiempo de gelificación de 1-4 horas en las manchas del sustrato, obteniendo con ello un segundo banco de composiciones de sol; (d) añadir una sonda al segundo banco de composiciones de sol y salpicar el segundo banco que contiene la sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico; y (e) medir la tasa de inmovilización de las manchas para la sonda, y la especificidad entre la sonda y una sustancia diana, y seleccionar, en base a los resultados de la medición, una composición de sol en donde la tasa de inmovilización de la sonda es de al menos 70% y la relación de las señales específicas/señales no específicas de la sonda y la sustancia diana es al menos 3.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en donde la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA (tratado con plasma) que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende: 17,5-25 partes en peso de TMOS; 5-15 partes en peso de MTMS; 2,5-15 partes en peso de GPTMOS; 12,5 partes en peso de HCl 10 mM; 25 partes en peso de agua destilada; 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda. La presente invención también proporciona un biochip de sol-gel, en el que dicha composición de sol está inmovilizada sobre un sustrato de PMMA (tratado con plasma) que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, y comprende: 22,5-25 partes en peso de TMOS; 7,5-10 partes en peso de MTMS; 2,5-5 partes en peso de GPTMOS; 12,5 partes en peso de HCl 10 mM; 25 partes en peso de agua destilada; 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda. La presente invención también proporciona un biochip de sol-gel, en el que dicha composición de sol está inmovilizada sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende: 16,2-18,7 partes en peso de TMOS; 3,7-6,2 partes en peso de MTMS; 13,7-16,2 partes en peso de GPTMOS; 0,01-20 partes en peso de un adhesivo; 12,5 partes en peso de HCl 10 mM; 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada; 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda. La presente invención también proporciona un biochip de sol-gel, en el que dicha composición de sol está inmovilizada sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de (obleas de) silicio que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende: 5-30 partes en peso de TMOS; 2-35 partes en peso de MTMS; 1-15 partes en peso de GPTMOS; 0,01-20 partes en peso de un adhesivo; 12,5 partes en peso de HCl 10 mM; 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada; 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y 12,5 partes en peso de una disolución de la sonda. La presente invención también proporciona un biochip de sol-gel, en el que dicha composición de sol está inmovilizada sobre un sustrato de (obleas de) silicio que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

Lo anterior y otros objetos, características y realizaciones de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones que se acompañan.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra un método de análisis que emplea un biochip del tipo de placa de 96 pocillos de acuerdo con la presente invención.

30 La FIG. 2 es un diagrama de flujo que muestra un método para el rastreo de una composición de sol que forma manchas sobre un sustrato no tratado en superficie.

La FIG. 3 muestra propiedades físicas de la formulación de chip de proteína seleccionada del método de rastreo de acuerdo con la presente invención.

35 La FIG. 4 muestra los resultados de diagnóstico del VIH, obtenidos mezclando proteína antígeno p24 del VIH con la composición de sol obtenido a través del proceso de rastreo de la invención, inmovilizando la proteína antígeno en una placa de 96 pocillos sin tratamiento de la superficie y realizando el diagnóstico de un paciente con VIH utilizando el antígeno inmovilizado.

40 La FIG. 5 muestra resultados de diagnóstico, obtenidos al mezclar un marcador de VHC con la composición de sol obtenida mediante el procedimiento de rastreo de la invención, inmovilizar el marcador en una placa de 96 pocillos sin tratamiento de la superficie y realizar el diagnóstico de la hepatitis C utilizando el marcador inmovilizado.

45 La FIG. 6 muestra el límite de detección (sensibilidad) para el chip de proteína de sol-gel de acuerdo con la presente invención. A la izquierda se dan los resultados del diagnóstico de la hepatitis C realizado utilizando un biochip que tiene una composición de sol utilizada de acuerdo con la presente invención inmovilizada sobre el mismo, y a la derecha se representa un diagrama gráfico que muestra los resultados obtenidos al analizar cuantitativamente los resultados del diagnóstico utilizando un programa de software de cuantificación.

50 La FIG. 7 muestra un chip de oro fabricado mediante el salpicado de una composición de sol rastreada de acuerdo con el método de la invención sobre un sustrato de oro (Au).

55 La FIG. 8 es un chip semiconductor fabricado mediante el salpicado de una composición de sol rastreada de acuerdo con el método de la invención sobre un sustrato semiconductor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y REALIZACIONES PREFERIDAS

60 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener una primer banco de composiciones de sol en el que al menos un monómero de silicato,

seleccionado del grupo que consiste en ortosilicato de tetrametilo (TMOS), metiltrimetoxisilano (MTMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), etiltrimetoxisilano (ETrEOS), trimetoxisilano (TMS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS) y trimetoxisilicato de 3-aminopropilo (3-ATMS), y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en silicato de poliglicerilo (PGS), digliceril-silano (DGS), 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMOS), uretano óxido de (N-trietoxisililpropil)-O-polietileno (PEOU), glicerol y polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular de 100-10.000, se mezclan uno con otro en tampón a diversas relaciones; (b) salpicar el primer banco de composiciones de sol sobre un sustrato diana que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico; (c) medir la adherencia, el aspecto, la transmitancia y el tiempo de gelificación de las manchas formadas en la etapa (b), y seleccionar, en base a los resultados de medición, composiciones, que no muestran el desprendimiento de manchas, incluso cuando se raspan con una punta después del lavado, tienen un diámetro de la mancha de 100-800 μm , al tiempo que mantienen una forma circular, muestran una auto-fluorescencia menor que la fluorescencia de fondo, y tienen un tiempo de gelificación de 4-48 horas en un tubo y un tiempo de gelificación de 1-4 horas en las manchas del sustrato, obteniendo con ello un segundo banco de composiciones de sol; (d) añadir una sonda al segundo banco de composiciones de sol y salpicar el segundo banco que contiene la sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico; y (e) medir la tasa de inmovilización de las manchas para la sonda, y la especificidad entre la sonda y una sustancia diana, y seleccionar, en base a los resultados de la medición, una composición de sol en donde la tasa de inmovilización de la sonda es de al menos 70% y la relación de las señales específicas/señales no específicas de la sonda y la sustancia diana es al menos 3.

En la presente invención, la sonda es preferiblemente una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en proteínas, oligopéptidos, ácidos nucleicos, sustancias de bajo peso molecular, microorganismos, hongos y materiales medicinales a base de hierbas, y el sustrato es preferiblemente uno cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en placas de polímeros, metales, obleas de silicio, vidrio y LCD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA (tratado con plasma) que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico comprende los siguientes componentes, así como un biochip de sol-gel que comprende dicha composición de sol inmovilizada sobre un sustrato de PMMA (tratado con plasma) que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico:

17,5-25 partes en peso de TMOS;
 5-15 partes en peso de MTMS;
 2,5-15 partes en peso de GPTMOS;
 12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
 25 partes en peso de agua destilada;
 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, y comprende los siguientes componentes, así como un biochip de sol-gel que comprende dicha composición inmovilizada sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico:

22,5-25 partes en peso de TMOS;
 7,5-10 partes en peso de MTMS;
 2,5-5 partes en peso de GPTMOS;
 12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
 25 partes en peso de agua destilada;
 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.

En el uso de la composición de sol, dicha sonda es preferiblemente proteína, más preferiblemente el antígeno del VHC, y en el biochip de sol-gel dicho sustrato es preferiblemente una placa de 96 pocillos.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende los siguientes componentes, así como un biochip de sol-gel que comprende dicha composición inmovilizada sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico:

16,2-18,7 partes en peso de TMOS;

3,7-6,2 partes en peso de MTMS;
 13,7-16,2 partes en peso de GPTMOS;
 0,01-20 partes en peso de HCl 10 mM;
 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada;
 5 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.

En el uso de la composición de sol, dicho adhesivo es preferentemente 1010 y/o 1020, y dicha sonda es preferiblemente proteína.

10 Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de silicio que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende los siguientes componentes, así como un biochip de sol-gel que comprende dicha composición inmovilizada sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un
 15 disolvente orgánico:

5-30 partes en peso de TMOS;
 2-35 partes en peso de MTMS;
 1-15 partes en peso de GPTMOS;
 0,01-20 partes en peso de un adhesivo;
 20 12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada;
 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 12,5 partes en peso de una disolución de la sonda.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "tratamiento de la superficie" es la expresión descrita en la patente anterior (patente coreana abierta a inspección pública N° 10-2004-0024510) de los autores de la presente invención y se refiere al revestimiento de la superficie de un sustrato para uso en biochips de sol-gel con una disolución de un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular tal como poli(acetato de vinilo), disuelto en un disolvente orgánico tal como cloruro de metileno o tetrahidrofurano.

30 En calidad de biomateriales que se pueden inmovilizar en el biochip de acuerdo con la presente invención, es posible utilizar todos los biomateriales que se pueden unir específicamente a una sustancia diana para permitir la unión entre ellos para ser analizados. Preferiblemente, los biomateriales incluyen ácidos nucleicos que incluyen ADN, ARN o PNA, proteínas y oligopéptidos. Además, también es posible inmovilizar diversos compuestos,
 35 incluidas sustancias de bajo peso molecular y sustancias naturales.

Ejemplos no limitantes de proteínas entre los biomateriales, las cuales se pueden integrar sobre la superficie del sustrato de chip con alta densidad de acuerdo con la presente invención, incluyen p24 del VIH, Combo, RgpIII, núcleo del VHC, NS3, NS5, E1/E2, antígenos de superficie del VHB y anticuerpos, IgG-Cy3, antígenos o
 40 anticuerpos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, antígenos o anticuerpos para el diagnóstico del cáncer, incluyendo AFP (alfa fetoproteína), PSA, CA1-1 y glipicano, y enzimas que se utilizan en la medición de la actividad. También, además de proteínas, antígenos y anticuerpos, es posible inmovilizar sustancias de bajo peso molecular para uso en el desarrollo de nuevos fármacos, y sustancias naturales, incluidas plantas nativas, microorganismos, hongos y materiales medicinales a base de hierbas, utilizando la composición de sol.

45 De acuerdo con la presente invención, una mezcla de sol que tiene una composición seleccionada mediante rastreo se puede salpicar sobre un sustrato tipo placa de 96 pocillos sin tratamiento de la superficie, y un biochip que tiene una sonda inmovilizada sobre el mismo utilizando la mezcla de sol, se puede diagnosticar y analizar utilizando dispositivos automatizados existentes para ensayos inmunológicos sin la introducción de nuevos dispositivos. El
 50 proceso de análisis se muestra en la FIG. 1. En calidad de placa de 96 pocillos se puede utilizar cualquier placa de polímero disponible comercialmente de cualquier fabricante, sin limitación particular alguna, pero en la presente invención se utilizó una placa de 96 pocillos (NUNC, SPL) para inmovilizar manchas y fabricar un chip. También, tal como se muestra en la FIG. 1, los dispositivos automatizados se pueden utilizar, por ejemplo, con Axym (Abott) y un dispositivo de Roche.

55 En el caso de un chip de proteína, el diámetro de las manchas es preferiblemente de aproximadamente 100-500 μm , y se integran preferiblemente 1-1000 manchas por pocillo. En los Ejemplos que figuran más adelante, se fabricó un chip que tiene 100 puntos/cm², pero es posible integrar manchas a una alta densidad de hasta 1000 puntos/cm².

60 En el caso de un biochip fabricado utilizando una reacción de sol-gel en la presente invención, los resultados de la reacción se pueden obtener en el espacio de 30 minutos a 2 horas, a diferencia de un método de diagnóstico

inmunológico que requiere un largo tiempo de reacción, o un método de diagnóstico de biochip existente.

El chip de proteína fabricada de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en el diagnóstico marcando un antígeno con un colorante fluorescente de la misma manera que un ensayo de tipo sándwich tal como un método de diagnóstico inmunológico. En este caso, en una etapa de medición de los resultados, los resultados del diagnóstico se pueden analizar y cuantificar utilizando un escáner de fluorescencia a través de un programa de software. El chip de proteína fabricado de acuerdo con la presente invención puede sustituir a un método de diagnóstico inmunológico de la enzima del VIH, VHC, VHB y similares.

En la composición de sol utilizada de acuerdo con la presente invención, dado que los biomateriales se pueden añadir en un estado de disolución, se pueden integrar proteínas o sustancias de bajo peso molecular a alta densidad. Por lo tanto, es posible llevar a cabo un rastreo de alto rendimiento (HTS – siglas en inglés) utilizando el biochip fabricado. También, dado que las enzimas para uso en una medición de la actividad de proteínas se pueden integrar en la mezcla de sol, el biochip fabricado se puede utilizar en la medición de la actividad enzimática. Las enzimas para la medición de la actividad incluyen enzimas que se utilizan en análisis de toxicidad, análisis del medio ambiente y análisis de bacterias en los alimentos. Por lo tanto, el biochip de tipo placa de 96 pocillos de acuerdo con la presente invención puede aplicarse para el diagnóstico de enfermedades y puede ser utilizado no sólo en tecnologías fundamentales para el desarrollo de nuevos fármacos, sino también en el análisis del medio ambiente y el análisis de toxicidad.

La FIG. 1 muestra un método de análisis que emplea el biochip de tipo placa de 96 pocillos de acuerdo con la presente invención. En la presente invención, una composición de sol puede ser inmovilizada de forma estable en una placa de 96 pocillos, sin tratamiento de la superficie, y puede ser analizado utilizando un dispositivo de diagnóstico inmunológico existente de la misma manera.

Además, la composición de sol de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a un biosensor desarrollado anteriormente para aumentar la sensibilidad del mismo. La composición de sol se puede inmovilizar sobre polímeros, superficies de metal, incluido el oro, superficies de semiconductores, incluido el silicio, superficies de polímeros transparentes, superficies de vidrio, incluido el espejo, para aumentar la sensibilidad de las mismas. Para facilitar la detección, una sustancia diana se marca preferiblemente con un inductor de la señal tal como un colorante fluorescente. La detección de la unión entre el biomaterial y la sustancia diana se puede realizar utilizando diversos métodos, incluido un método de detección de la fluorescencia, un método de detección electroquímica, un método de detección que utiliza un cambio en la masa, un método de detección que utiliza un cambio en la carga eléctrica y un método de detección que utiliza una diferencia en las propiedades ópticas, de acuerdo con las propiedades de un sustrato al que se une una sustancia diana marcada con un inductor de la señal.

Cuando se utiliza la composición de gel de acuerdo con la presente invención, diversos tipos de proteínas, antígenos, anticuerpos, sustancias de bajo peso molecular y bacterias se pueden integrar en un máximo de 1000 manchas por pocillo. La composición utilizada de acuerdo con la presente invención se puede utilizar típicamente en el rastreo de un banco de sangre para procesos de compatibilidad en la transfusión de sangre (marcadores de enfermedades infecciosas, por ejemplo, VIH I, II, VHC, VHB, malaria, *H. pylori*, sífilis, etc.) en un proceso de recogida de sangre, y un marcador para el diagnóstico de cáncer en general y un marcador para el diagnóstico de un cáncer específico se puede integrar en un sustrato al mismo tiempo y se puede utilizar en el diagnóstico. Además, de acuerdo con la presente invención, se puede desarrollar un grupo de productos, incluido POCT, que puede detectar enfermedades y bacterias sin un marcador fluorescente, utilizando diversos metales y sustratos semiconductores. También, se pueden integrar al mismo tiempo marcadores sensibles a la contaminación del medio ambiente, en particular la contaminación del agua, de manera que la contaminación del agua puede ser detectada enseguida.

Ejemplo

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle mediante ejemplos. Sin embargo, se ha de entender que estos ejemplos se pueden modificar en otras diversas formas, y el alcance de la presente invención no pretende estar limitado a tales ejemplos. Estos ejemplos se dan para describir de una manera más completa la presente invención para una persona experta en la técnica.

Ejemplo 1: Rastreo de composiciones de sol que son específicas para un sustrato y biomateriales y, al mismo tiempo, pueden ser inmovilizadas directamente sobre el sustrato

Una composición de sol-gel, que puede soportar el lavado fuerte, incluso cuando se inmoviliza directamente sobre un sustrato no tratado en superficie y, al mismo tiempo, tiene excelentes propiedades físicas cuando se fabrica para formar un biochip, se rastreó rápidamente por el método de rastreo de la invención (FIG. 2). La FIG. 2 es un

diagrama de flujo que muestra un método para el rastreo de una composición de sol que forma manchas sobre un sustrato no tratado en superficie, y la FIG. 3 muestra ejemplos de composiciones seleccionadas y excluidas en el método de rastreo de la FIG. 2. Se puede observar que las composiciones excluidas no podían inmovilizar biomateriales tales como proteínas sin el tratamiento en superficie y se desprendieron por completo durante un proceso de lavado.

En primer lugar, aproximadamente 100.000 composiciones de sol basadas en monómeros de silicato fueron salpicadas sobre un sustrato y fueron medidas con respecto a una fuerte adherencia capaz de resistir el lavado en un proceso de análisis, propiedades físicas capaces de mantener constante la forma de manchas, el tiempo de gelificación, la transmitancia óptica y la baja auto-fluorescencia. De las composiciones salpicadas, un total de 700 composiciones fueron rastreadas en principio, las cuales no se desprendían incluso cuando fueron raspadas con una punta después del lavado, tenían un diámetro de la mancha de 100 - 800 μm , al tiempo que mantenían una forma circular, tenían una auto-fluorescencia menor que la fluorescencia de fondo, y tenían un tiempo de gelificación de 4-48 horas en un tubo y un tiempo de gelificación de 1-4 horas en las manchas del sustrato.

Entre las 700 composiciones de sol, a la vista del rendimiento de inmovilización de los biomateriales y de la sensibilidad en un análisis inmunológico, se seleccionaron composiciones en las que la tasa de inmovilización de una sonda era de más del 70% y la relación de las señales específicas/señales no específicas de la sonda y la sustancia diana era de al menos 3.

Finalmente, cuando los biomateriales eran sustancias de bajo peso molecular, proteínas y anticuerpos, se obtuvieron 2 composiciones, 7 composiciones y 8 composiciones, respectivamente.

En lo que sigue se describirá con mayor detalle el método para el rastreo de composiciones de sol de acuerdo con la presente invención.

Selección primaria de las composiciones de sol

Se añadieron monómeros de silicatos (TMOS, MTMOS, TEOS, TrEOS, TMS, MTMS y 3-ATMS), compuestos intermedios (PGS y DGS) y aditivos (GPTMOS, PEOU, glicerol, PEG200, PEG400 y PEG8000) a una disolución de HCl 10 mM para tener diversas composiciones. Finalmente, se añadieron tampones que tienen diferentes pHs (4-9), concentraciones (0-500 mM) y sales (potasio y amonio) a cada una de las composiciones. Como resultado, se obtuvieron más de 100.000 composiciones, y estas composiciones se integraron en una placa de PMMA (poli(metacrilato de metilo)) comercialmente disponible, y se ensayaron para la adherencia, la aparición de manchas, el tiempo de gelificación, la transmitancia y el fondo.

La adherencia se ensayó por raspado intenso de manchas después del lavado, en que el sustrato se lavó intensamente tres veces con 1 x PBS (que contiene Tween® al 10%) a 1200 rpm durante 5 minutos, y luego se seleccionaron composiciones de manchas que no fueron eliminadas incluso cuando se rascaron directamente con una punta. La aparición de las manchas se observó directamente con un microscopio óptico para seleccionar las manchas, que conservaban una forma circular y tenían un diámetro de la mancha de 100-800 μm . El tiempo de gelificación se midió tanto en un tubo y en las manchas, y se seleccionaron composiciones que muestran un tiempo de gelificación de más de 4 horas en el tubo y un tiempo de gelificación de más de 1 hora en la mancha. Con respecto a la transmitancia óptica, se seleccionaron las composiciones en las que se determinó que tenían una auto-fluorescencia más baja que la fluorescencia de fondo utilizando un escáner por láser (GenePix 4100, Axon Instrument).

Selección de composiciones óptimas

La tasa de inmovilización de las manchas de cada una de las composiciones rastreadas en principio se midió mediante la comparación de las señales de un péptido inmovilizado marcado con Cy-3, una proteína BSA y un anticuerpo, antes y después de un proceso de lavado. Para el análisis de la actividad, se añadió una proteína BSA (500 ng/ μl) a cada una de las composiciones rastreadas en principio, y las mezclas resultantes fueron integradas en una placa de tipo portaobjetos de PMMA junto con la proteína. Se deja que el portaobjetos reaccione con un anticuerpo de BSA marcado con Cy-3 (Sigma) durante 30 minutos, y luego se lavó intensamente con una disolución de lavado (1 x PBS, Tween® al 0,1% (Sigma)), seguido de secado. Para analizar la sensibilidad de las señales, se escanearon las manchas del portaobjetos, y el valor de la señal al valor de fondo se cuantificó usando el software Pro 4.0 de GenePix (Axon Instrument) con el fin de analizar la sensibilidad de la señal.

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 1 que figura a continuación, dos composiciones entre las composiciones rastreadas en principio mostraron una tasa de inmovilización de más de 70% para la sustancia de bajo peso molecular contenida en el mismo, 7 composiciones mostraron una tasa de inmovilización de más de 80%

para la proteína contenida en el mismo y 8 composiciones mostraron una tasa de inmovilización de aproximadamente 90% para el anticuerpo.

Tabla 1: Tasa de inmovilización de las composiciones de sol de las sustancias diana a inmovilizar

5

	Tasa de inmovilización (%)		
	molécula pequeña	proteína	anticuerpo
Composiciones de sol para moléculas pequeñas (2)	75,5	50,5	43,2
Composiciones de sol para proteínas (7)	21,1	82,7	74,5
Composiciones de sol para anticuerpos (8)	1,2	10,3	88,9

Análisis de la superficie

10 La superficie de las manchas se observó usando un microscopio SEM (S-4800 SEM, Hitachi Co.). El revestimiento conductor para la observación por el SEM se realizó utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica de haces de iones con un objetivo de iridio (aproximadamente 20 nm de espesor), después de que las manchas gelificaran por completo. El tamaño de los poros se midió utilizando un programa de software para el análisis de las imágenes (Image-Pro Plus, MediaCybernetics). El número de poros se midió en 9 zonas diferentes (576 nm x 430 nm), y la media de la densidad de los poros se calculó como $[\sum \text{área de poros}]/[\text{área total (576 nm x 430 nm)}]$.

Análisis de manchas internas en la disolución

15 Imágenes de manchas internas se midieron al aire usando el dispositivo TappingMode™ AFM (MultiMode SPM, Nanoscope IIIa, Veeco Instrument). Las manchas se seccionaron utilizando un micrófono vertical.

Análisis del perfil de escaneo de las manchas

20 Imágenes de las manchas se midieron a través de una forma de reflexión estándar utilizando un microscopio de escaneo por láser con-focal (LSM 5 pascal, Carl Zeiss Inc). Se midió que el perfil del escaneo para el centro de las manchas era de un espesor menor que 63 μm y un diámetro menor que 380 μm.

25 Para medir la distribución de la proteína y el anticuerpo en las manchas después del análisis inmunológico, la imagen de la tomografía vertical de las manchas internas fue fotografiada con un CLSM (LSM 5 pascal, Carl Zeiss Inc). La resolución más alta del eje z utilizando un motor paso a paso era de 50 nm, y las resoluciones más altas del eje x y el eje y con un módulo de escaneo eran x100 y x40, respectivamente. Para fotografiar imágenes con un CLSM, micro-manchas que contienen una proteína p24 se integraron primero en un portaobjetos de vidrio, se dejó que el portaobjetos que tiene las manchas que contienen proteína p24 integradas sobre el mismo reaccionara con el anticuerpo de p24 durante 1 hora, y después se lavó intensamente. A continuación, se dejó que el portaobjetos reaccionara con un anticuerpo secundario marcado con Cy3 durante 20 minutos, se lavó y se secó, y se fotografiaron las imágenes por CLSM del mismo.

Medición de la especificidad entre marcador y sustancia diana y la actividad de los mismos

35 Para medir la especificidad y la actividad de la interacción proteína-proteína en un sustrato de sol-gel, una proteína p24 como una proteína de antígeno del VIH se mezcló con la composición de sol IV de la Tabla 2 que figura a continuación y se inmovilizó. El análisis inmunológico se realizó con diluciones en serie de suero que contenía un anticuerpo VIH correspondiente a la proteína p24. Al mismo tiempo, para confirmar la adsorción no específica del anticuerpo VIH, una proteína BSA se inmovilizó sobre el mismo chip en el sustrato de sol-gel. La interacción no específica que se produce durante la reacción de una proteína (4 - 1BB) que no tiene relación con las manchas de una composición de sol que no contiene proteína era muy bajo. Sin embargo, con el anticuerpo BSA o 4-1BB contra el antígeno BSA o 4-1BB, la interacción específica se manifestó en manchas exactas.

45 La Tabla 2 muestra las propiedades de 7 composiciones de sol para la inmovilización de proteínas, rastreadas mediante la presente invención. En la Tabla 2, la composición 0 es una composición comparativa que consiste sólo en TMOS y MTMS.

50 Entre dichas 7 composiciones para la inmovilización de proteínas, las composiciones IV mostraron los mejores resultados con respecto a las señales y a la relación señal/fondo. La composición IV tenía una baja relación de TMOS en comparación con las otras composiciones, contenía PEG de alto peso molecular, y mostraba una alta densidad de poros y un bajo contenido no específica de anticuerpos.

Tabla 2: Análisis de las propiedades de las composiciones para la inmovilización de proteínas

Composiciones de sol	Composición	Actividad	Propiedades de los poros de la mancha		Capacidad de adsorción
			tamaño (nm)	Densidad	
0	25,5% de TMOS, 12,5% de MTMS	1,1475	12,4	0,07	1993,33
I	17,5% de TMOS, 12,5% de MTMS, 4% de PGS	3,45084	21,9	0,188	578,29
II	20,5% de TMOS, 10,5% de MTMS 5% de PEOU	6,35116	21,3	0,102	304,06
III	25,5% de TMOS, 12,5% de MTMS 3% de PEG400	18,8969	27,8	0,349	265,66
IV	25,5% de TMOS, 12,5% de MTMS 5% de PEG8000	37,43029	21,5	0,259	14,69
V	25,5% de TMOS, 12,5% de MTMS 2,5% de glicerol	16,58053	21,9	0,139	77,24
VI	25,0% de TMOS, 7,5% de MTMS 5% de GPTMOS	3,45084	17,6	0,053	517,62
VII	10% de MTMS	5,3421	20,4	0,119	99,64

Ejemplo 2: Diagnóstico inmunológico enzimático de enfermedades a través de la inmovilización de manchas de chips de proteínas de sol-gel inmovilizadas en una placa de 96 pocillos

5 En este Ejemplo, las composiciones de sol seleccionados en el Ejemplo 1 se midieron utilizando un proceso de diagnóstico ELISA automatizado que se utiliza actualmente para el diagnóstico de la hepatitis. El proceso de diagnóstico automatizado comprendía un proceso de lavado intenso y, por lo tanto, entre las composiciones rastreadas, se utilizó una composición en la que las manchas mostraban una fuerte adherencia y podían mantener la forma circular característica de las mismas, incluso después del lavado. La composición de sol utilizada en este

10 Ejemplo se optimizó de manera que las manchas formadas podían soportar incluso un raspado físico utilizando Abbott AxSYM y un dispositivo Elecsys de Roche.

15 En este Ejemplo, cuando el material de una placa de 96 pocillos para la composición seleccionada a través de este proceso era PMMA tratado con plasma, una mezcla de la composición de sol para la inmovilización y una disolución de proteínas consistía en 17,5-25 partes en peso de TMOS, 5-15 partes en peso de MTMS, 2,5-15 partes en peso de GPTMOS, 12,5 partes en peso de HCl 10 mM, 25 partes en peso de agua destilada, 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8) y 12,5 partes en peso de una disolución de proteínas.

20 En el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 17,5-25 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era baja, debido a una densidad de poros excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y en el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen

25 MTMS en una cantidad mayor que el límite superior de la gama de 5-15 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era baja, debido a una densidad de poros excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y el caso de composiciones que contienen MTMS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen GPTMOS en una cantidad mayor que el límite superior del

30 intervalo de 2,5-15 partes en peso, se produjo un gran número de reacciones no específicas debido a la alta capacidad de adsorción de las manchas, y en el caso de composiciones que contienen GPTMOS en un cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue fácilmente inmovilizada debido al tamaño de poros grande.

35 Utilizando el antígeno de VIH, proteína p24 como una disolución de proteínas, manchas de sol-gel se integraron en una placa de 96 pocillos. Como resultado tal como se muestra en la FIG. 4, cuatro muestras mostraron una

reacción específica para la proteína p24 del VIH, lo cual indica que las muestras eran VIH-positivas. La proteína podía ser fuertemente inmovilizada de forma tridimensional en la placa de 96 pocillos hecha de PMMA tratado con plasma utilizando la mezcla de sol-gel, y los resultados de reacciones antígeno-anticuerpo podían ser confirmados usando el biochip a través del dispositivo de diagnóstico automatizado existente y un método de ensayo.

5 También, una mezcla de una composición de sol y una disolución de proteínas, para la inmovilización en una placa de 96 pocillos hecha de PMMA comercial no tratado con plasma, se componía de 22,5-25 partes en peso de TMOS, 7,5-10 partes en peso de MTMS, 2,5-5 partes en peso de GPTMOS, 12,5 partes en peso de HCl 10 mM, 25 partes en peso de agua destilada, 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8) y 12,5 partes en peso de una disolución de proteínas.

10 En el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 22,5-25 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era baja, debido a una densidad de poros excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y en el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen MTMS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 7,5-10 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era baja, debido a una densidad de poros excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y en el caso de composiciones que contienen MTMS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen GPTMOS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 2,5-5 partes en peso, se produjo un gran número de reacciones no específicas debido a la capacidad de adsorción alta de las manchas, y en el caso de composiciones que contienen GPTMOS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue fácilmente inmovilizada debido al tamaño de poros grande.

15 La composición optimizada se mezcló con un antígeno del VHC y se integró en una placa de 96 pocillos hecha de PMMA no tratado con plasma, preparando de esta manera un biochip. Utilizando el biochip, se realizó un ensayo en 79 pacientes (negativos: 25 personas, y positivos: 54 personas) con el kit VHC EIA de Roche. La FIG. 5 muestra los resultados del análisis de sangre de 12 pacientes. Como puede verse en la FIG. 5, los resultados del ensayo, obtenidos utilizando el biochip, eran completamente consistentes con los resultados de ensayo obtenidos utilizando el método ELISA existente, lo que sugiere que el biochip de la invención tenía una alta reproducibilidad de los resultados. El biochip de acuerdo con la presente invención tenía un alto comportamiento, una alta sensibilidad, un alto rendimiento y una alta precisión, y podía realizar mediciones a bajo coste, sugiriendo que sustituiría a los métodos existentes de diagnóstico ELISA. También, el biochip de la invención podía inmovilizar la proteína en una cantidad mayor que en el método de diagnóstico inmunológico existente, de manera que los falsos positivos de los mismos podían reducirse en comparación con el método de diagnóstico existente y, por lo tanto, se podía realizar el diagnóstico de la hepatitis más preciso.

20 También, con el fin de examinar si el análisis cuantitativo se puede realizar utilizando el biochip de la invención, se realizaron ensayos sobre los límites de detección y los intervalos de cuantificación a través de diluciones en serie de muestras de pacientes (FIG. 6). Como resultado, se demostró la distribución cuantitativa. A partir de los resultados del ensayo, se pudo ver que, cuando se utilizó el biochip de acuerdo con la presente invención, también se podía realizar el análisis cuantitativo, el cual no se pudo realizar en métodos de diagnóstico inmunológico existentes.

Ejemplo 3: Fabricación y análisis de biochip utilizando sustrato chip de oro

25 En este Ejemplo, se seleccionó una composición de sol para la inmovilización en un sustrato de chip de oro de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1 usando un chip de oro (Au) utilizado en un sistema de SPRi. En el caso del chip de oro, los adhesivos (1010 y 1020; LG Chemical Co., Ltd., Corea), en calidad de aditivos, se añadieron a la composición de sol para la inmovilización. La mezcla de sol después del salpicado se modificó en una sustancia, que era transparente como el vidrio y tenía poros, pero la mezcla de sol no se inmovilizó sobre el chip de oro, cuya superficie estaba revestida con Au. En este Ejemplo, con el fin de inmovilizar manchas de sol sobre la superficie del chip de oro, se utilizaron aditivos, y la composición de la mezcla de sol utilizada se componía de 16,2-18,7 partes en peso de TMOS, 3,7-6,2 partes en peso de MTMS, 13,7-16,2 partes en peso de GPTMOS, 0,01-20 partes en peso de adhesivos (1010, 1020, etc.), 12,5 partes en peso de HCl 10 mM, 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada, 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8), y 12,5 partes en peso de una disolución de proteínas.

30 En el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 16,2-18,7 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era baja, debido a una densidad de poros

excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y en el caso de composiciones que contienen TMOS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen MTMS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 3,7-6,2 partes en peso, la tasa de inmovilización de la sustancia diana era bajo, debido a una densidad de poros excesivamente baja y a un tamaño de poros pequeño, y en el caso de composiciones que contienen MTMS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue inmovilizada debido a una densidad de poros excesivamente alta y a un tamaño de poros grande. En el caso de composiciones que contienen GPTMOS en una cantidad mayor que el límite superior del intervalo de 13,7-16,2 partes en peso, se produjo un gran número de reacciones no específicas debido a la alta capacidad de adsorción de las manchas, y en el caso de composiciones que contienen GPTMOS en una cantidad menor que el límite inferior de dicho intervalo, la sustancia diana no fue fácilmente inmovilizada debido al tamaño de poros grande.

La mezcla fue salpicada sobre el chip de oro de la misma manera que en los Ejemplos 2 y 3, y luego se sometió a ensayo para una proteína p24. La diferencia del ensayo del chip de oro a partir del ensayo del biochip inmovilizado en la placa de 96 pocillos era que una se realizó reacción de anticuerpo primario y los resultados se podían detectar sin una reacción secundaria marcada por fluorescencia. Los resultados del chip de oro sometido a la reacción primaria podían ser leídos midiendo y representando en imágenes un cambio en la resonancia que se produce durante la reacción, utilizando el sistema SPR (FIG. 7). El chip de oro podía inmovilizar una gran cantidad de proteínas y podía detectar la unión proteína-proteína directamente sin marcaje químico alguno y, por lo tanto, tenía una alta sensibilidad.

Ejemplo 4: Inmovilización y detección electroquímica de manchas en el chip de semiconductores

Este Ejemplo se refiere a un sistema en el que se inmovilizó una mezcla de sol conductora sobre el electrodo positivo de un chip semiconductor para uso en mediciones electroquímicas, y se midió la diferencia en la resistencia eléctrica antes y después de que se produjera una reacción entre los mismos para vigilar la reacción. Una superficie de metal utilizada en este Ejemplo era una oblea de silicio utilizada con mayor frecuencia en electrodos, pero era difícil en la técnica anterior para fijar una sustancia de polímero a la oblea de silicio sin tratamiento de la superficie, debido a que la superficie de la misma era muy uniforme y lisa. Sin embargo, en este Ejemplo, una composición de sol para la inmovilización en los electrodos se rastreó de acuerdo con el método del Ejemplo 1 y se mezcló con la proteína p24, y la mezcla se inmovilizó sobre una oblea de semiconductor.

La composición de sol para chips semiconductores, utilizada en este Ejemplo, se componía de 5-30 partes en peso de TMOS, 2-35 partes en peso de MTMS, 1-15 partes en peso de GPTMOS, 0,01-20 partes en peso de adhesivos, 12,5 partes en peso de HCl 10 mM, 23,7- 24,5 partes en peso de agua destilada, 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8) y 12,5 partes en peso de una solución de la sonda.

Utilizando el chip de semiconductores sobre el que se inmovilizaron la composición de sol y la proteína p24, se midió la diferencia en la resistencia eléctrica antes y después de una reacción de acuerdo con un método de medición electroquímico, y los resultados de la medición se muestran en la FIG. 8. Como se muestra en la FIG. 8, la sensibilidad aumentó significativamente, y podía reducirse la relación fondo a ruido. Por lo tanto, el chip de semiconductores de acuerdo con este Ejemplo es económico y, al mismo tiempo, es útil para la fabricación de sistemas de análisis de biochips de pequeño tamaño.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Tal como se ha descrito anteriormente en detalle, la presente invención proporciona el método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato no tratado en superficie. También, la presente invención proporciona el uso de una composición de sol para sustratos de PMMA, sustratos de chips de oro y sustratos de obleas de silicio, rastreados por dicho método, y un biochip de sol-gel preparado utilizando dicha composición de sol. El biochip de acuerdo con la presente invención es conveniente y económico, ya que puede emplear sistemas de reacción existentes y sistemas de análisis mediante la inmovilización de manchas de tipo gel que contiene biomaterial directamente en placas de 96 pocillos, que son ampliamente utilizados en los bioensayos. También, el biochip puede proporcionar buenos resultados de análisis, ya que se produce una menor modificación de biomateriales inmovilizados sobre el biochip. En particular, cuando el biochip se utiliza en un método de análisis sin una sonda, además del análisis de fluorescencia, el problema de sensibilidad que se produce en el método de análisis previo puede ser resuelto mediante la unión firme de manchas de sol-gel tridimensionales y, por lo tanto, se espera que el biochip sea útil para el desarrollo de productos, incluido POCT.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel, que se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) obtener un primer banco de composiciones de sol en el que al menos un monómero de silicato, seleccionado del grupo que consiste en ortosilicato de tetrametilo (TMOS), metiltrimetoxisilano (MTMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), etiltrimetoxisilano (ETrEOS), trimetoxisilano (TMS), trimetoxisilicato de metilo (MTMS) y trimetoxisilicato de 3-aminopropilo (3-ATMS), y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en silicato de poliglicerilo (PGS), digliceril-silano (DGS), 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMOS), uretano óxido de (N-trietoxisililpropil)-O-polietileno (PEOU), glicerol y polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular de 100-10.000, se mezclan uno con otro en tampón a diversas relaciones;
- 10 (b) salpicar el primer banco de composiciones de sol sobre un sustrato diana que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico;
- 15 (c) medir la adherencia, el aspecto, la transmitancia y el tiempo de gelificación de las manchas formadas en la etapa (b), y seleccionar, en base a los resultados de la medición, composiciones, que no muestran el desprendimiento de manchas, incluso cuando se raspan con una punta después del lavado, tienen un diámetro de la mancha de 100-800 μm , al tiempo que mantienen una forma circular, muestran una auto-fluorescencia menor que la fluorescencia de fondo, y tienen un tiempo de gelificación de 4-48 horas en un tubo y un tiempo de gelificación de 1-4 horas en las manchas del sustrato, obteniendo con ello un segundo banco de composiciones de sol;
- 20 (d) añadir una sonda al segundo banco de composiciones de sol y salpicar el segundo banco que contiene la sonda sobre un sustrato que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico; y
- 25 (e) medir la tasa de inmovilización de las manchas para la sonda, y la especificidad entre la sonda y una sustancia diana, y seleccionar, en base a los resultados de la medición, una composición de sol en donde la tasa de inmovilización de la sonda es de al menos 70% y la relación de las señales específicas/señales no específicas de la sonda y la sustancia diana es al menos 3.
- 30 2. El método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sonda es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en proteínas, oligopéptidos, ácidos nucleicos, sustancias de bajo peso molecular, microorganismo, hongos y materiales medicinales a base de hierbas.
- 35 3. El método para el rastreo de una composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en placas de polímeros, metales, obleas de silicio, vidrio y LCD.
- 40 4. Uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en donde la composición de sol utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico comprende:
- 45 17,5-25 partes en peso de TMOS;
5-15 partes en peso de MTMS;
2,5-15 partes en peso de GPTMOS;
12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
25 partes en peso de agua destilada;
11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.
- 50 5. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha sonda es proteína.
- 55 6. Un biochip de sol-gel, en el que la composición de sol utilizada en una de las reivindicaciones 4 ó 5 está inmovilizada sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.
- 60 7. Uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol se utiliza para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, y comprende:
- 22,5-25 partes en peso de TMOS;
7,5-10 partes en peso de MTMS;
2,5-5 partes en peso de GPTMOS;
12,5 partes en peso de HCl 10 mM;

25 partes en peso de agua destilada;
 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.

- 5 8. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha sonda es proteína.
9. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha proteína es antígeno de VHC.
- 10 10. Un biochip de sol-gel, en que la composición de sol utilizada en una de las reivindicaciones 7 u 8 está inmovilizada sobre un sustrato de PMMA que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.
- 15 11. El biochip de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho sustrato es una placa de 96 pocillos.
12. Uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende:
- 20 16,2-18,7 partes en peso de TMOS;
 3,7-6,2 partes en peso de MTMS;
 13,7-16,2 partes en peso de GPTMOS;
 0,01-20 partes en peso de un adhesivo;
 12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
- 25 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada;
 11-13 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
 10-15 partes en peso de una disolución de la sonda.
13. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho adhesivo es 1010 y/o 1020.
- 30 14. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha sonda es proteína.
- 35 15. Un biochip de sol-gel, en que la composición de sol utilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 está inmovilizada sobre un sustrato de oro que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.
- 40 16. Uso de una composición de sol para biochips de sol-gel, en que la composición de sol, utilizada para inmovilizar una sonda sobre un sustrato de silicio que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico, comprende:
- 45 5-30 partes en peso de TMOS;
 2-35 partes en peso de MTMS;
 1-15 partes en peso de GPTMOS;
 0,01-20 partes en peso de un adhesivo;
 12,5 partes en peso de HCl 10 mM;
 23,7-24,5 partes en peso de agua destilada;
 12,5 partes en peso de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,8); y
- 50 12,5 partes en peso de una disolución de la sonda.
17. El uso de la composición de sol para biochips de sol-gel de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha sonda es proteína.
- 55 18. Un biochip de sol-gel, en que la composición de sol utilizada en una de las reivindicaciones 16 ó 17 está inmovilizada sobre un sustrato de silicio que no está revestido con un agente de revestimiento sintético de alto peso molecular disuelto en un disolvente orgánico.

FIG. 1

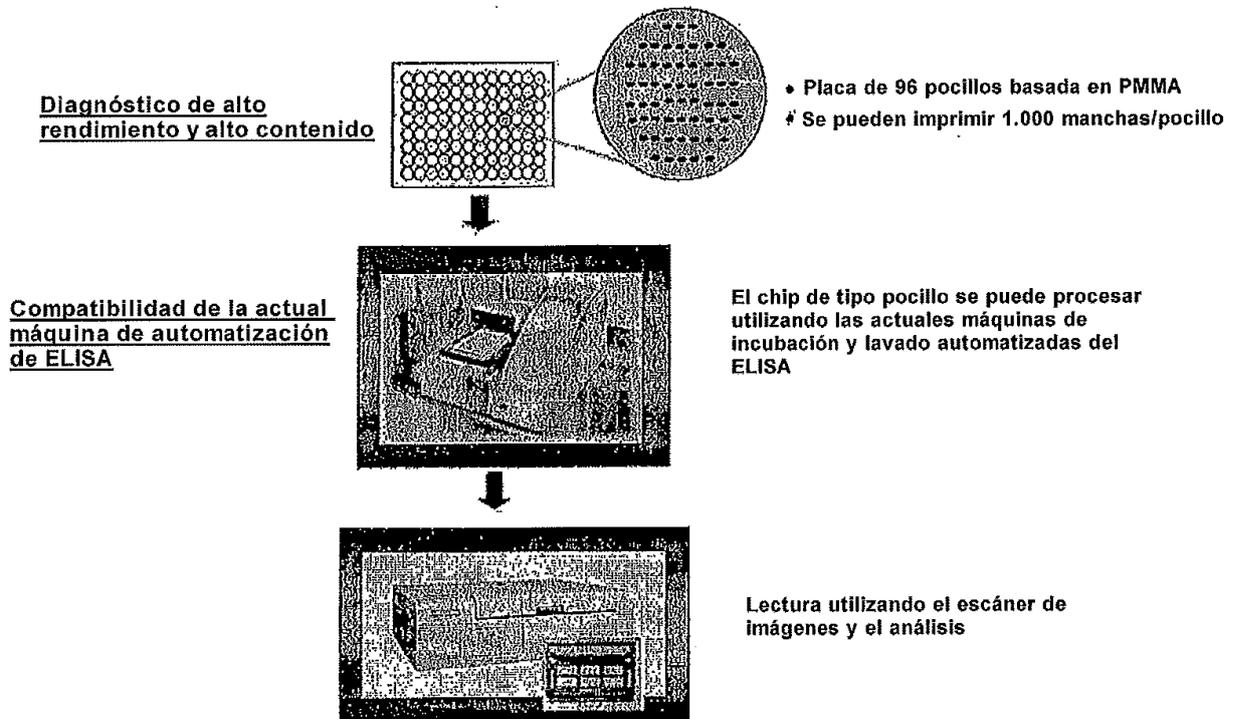


FIG. 2

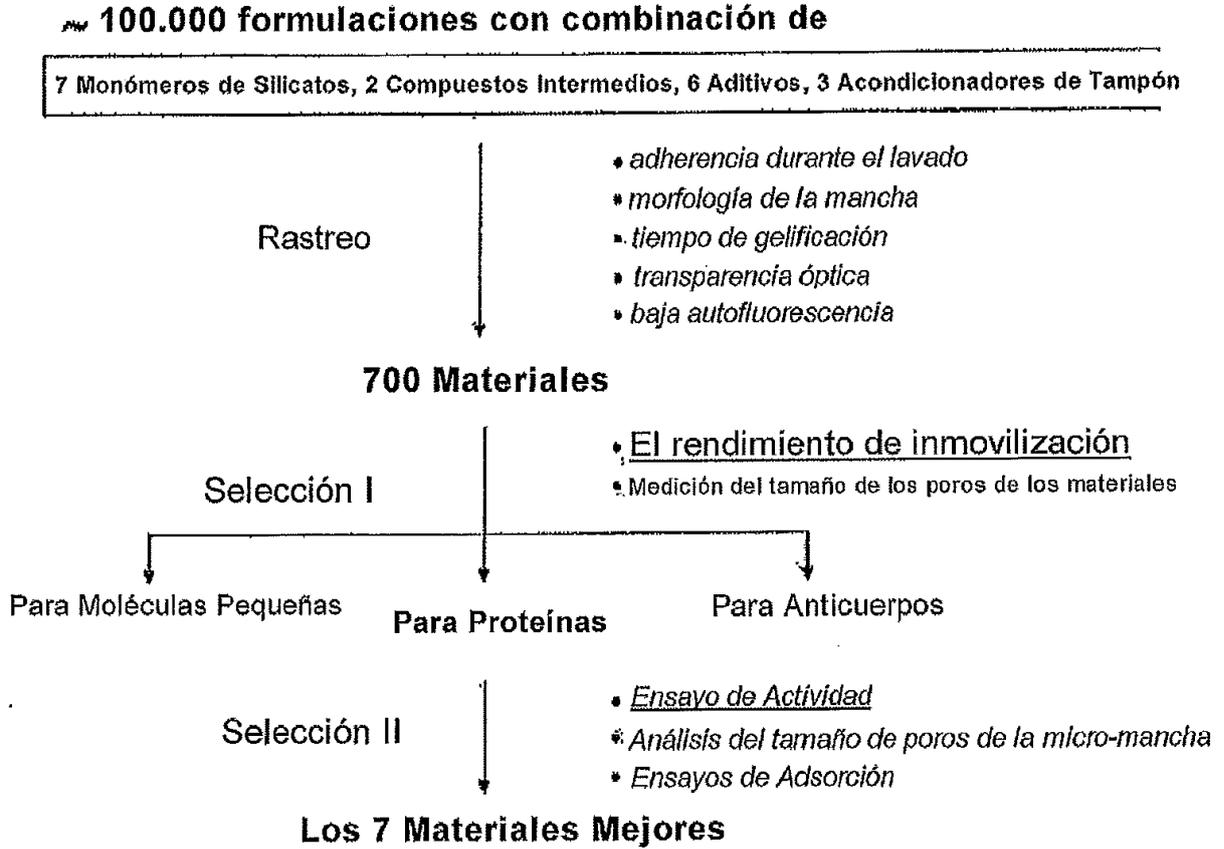


FIG. 3

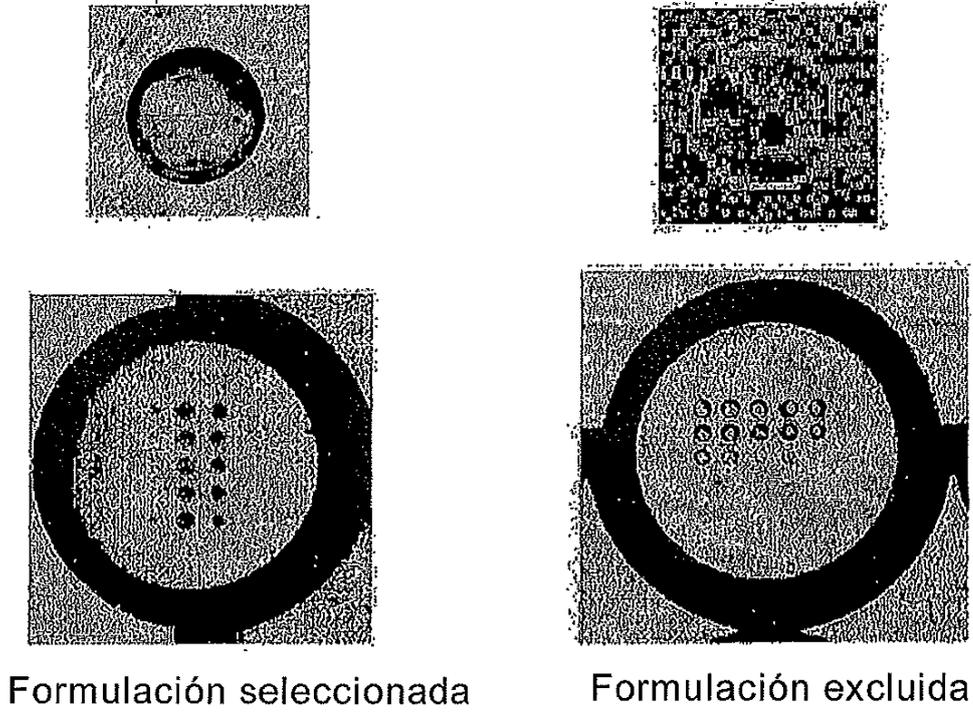


FIG. 4

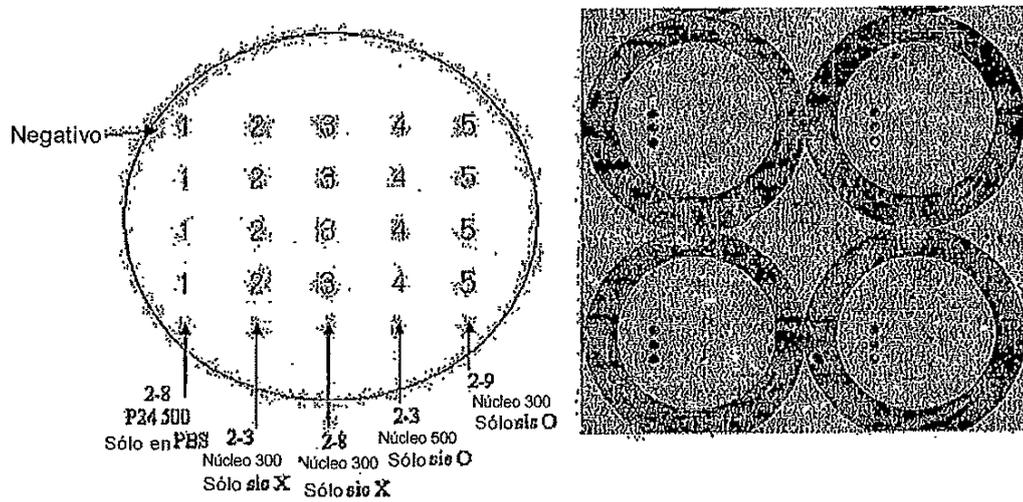
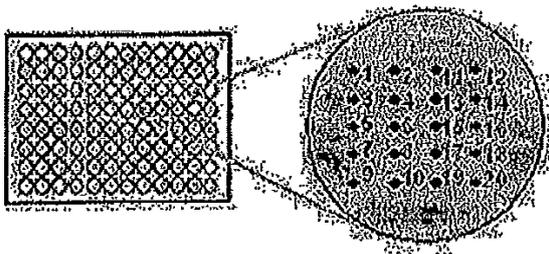


FIG. 5



- 1, 2 Control Negativo
- 3-6 Núcleo de VHC
- 7-10 NS5 de VHC
- 11-14 NS3 de VHC
- 15-18 E1/E2 de VHC
- 19, 20 Control Positivo

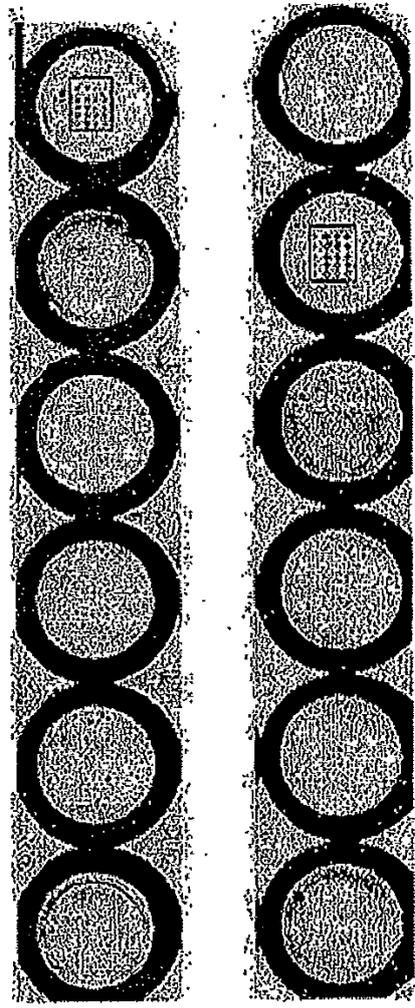


FIG.6



Negativo N° 8

Positivo N° 37
sin dilución (175)

dilución 1:10

dilución 1:100

dilución 1:1000

dilución 1:10000

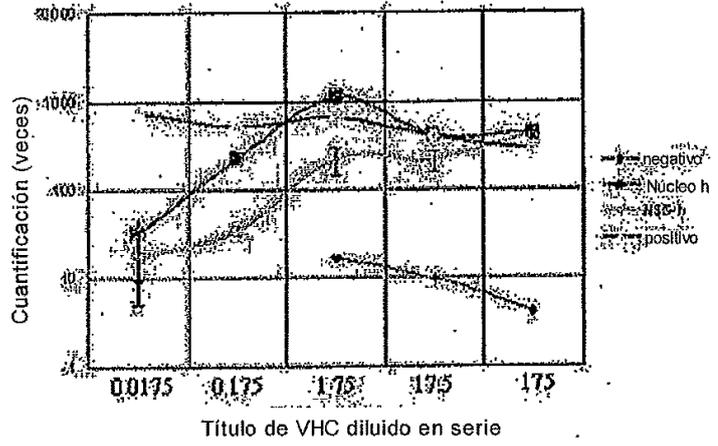
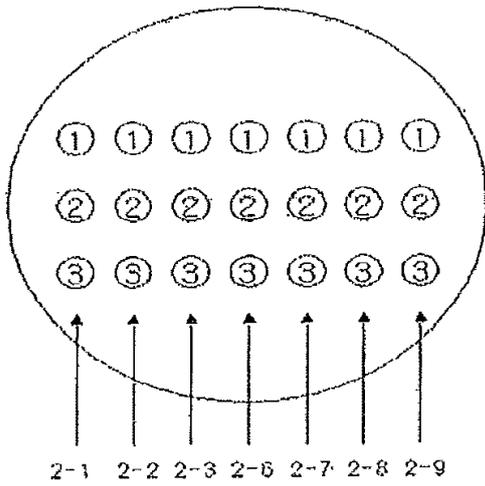


FIG. 7



1 : Negativo
 2 : núcleo 100ng
 3 : Positivo (α-R-cy3 1/100)

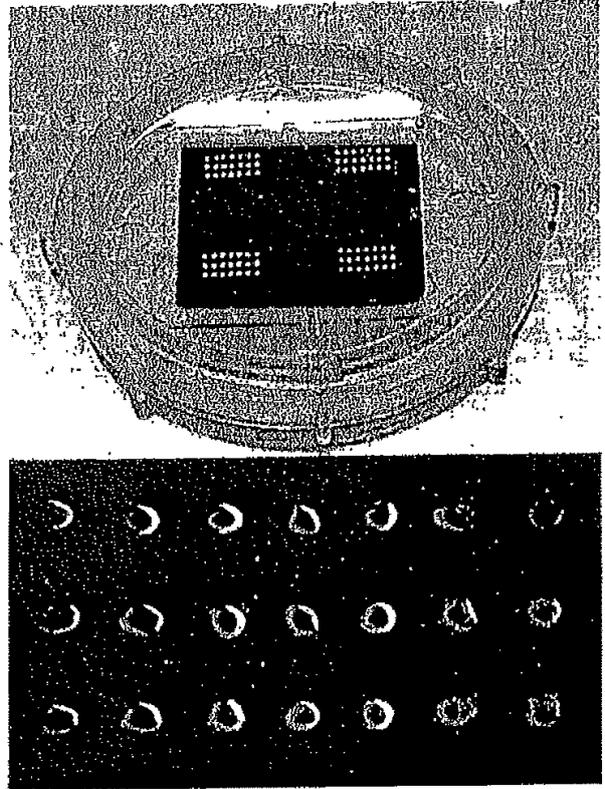


FIG. 8

